

**LUIZA MARTINS LONGARETTI**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIGENOTÓXICOS E  
ANTIMUTAGÊNICOS DO PRÉ-TRATAMENTO COM  
MELATONINA EM UM MODELO DE CÂNCER DE PELE DO  
TIPO MELANOMA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado apresentado  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade do  
Extremo Sul Catarinense para obtenção  
do título de Mestre em Ciências da  
Saúde

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vanessa  
Moraes de Andrade

Coorientadora: Prof. Dr. Flávia Karine  
Rigo

**CRICIÚMA  
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

L849a Longaretti, Luiza Martins.

Avaliação dos efeitos antigenotóxicos e antimutagênicos do pré-tratamento com melatonina em um modelo de câncer de pele do tipo melanoma em camundongos / Luiza Martins Longaretti. - 2018.

81 p. : il.; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2018.

Orientação: Vanessa Moraes de Andrade.

Coorientação: Flávia Karine Rigo.

1. Melanoma - Tratamento. 2. Pele - Câncer. 3. Melatonina – Uso terapêutico. 4. Dano ao DNA. 5. Antioxidantes – Efeitos colaterais. I. Título.

CDD 23. ed. 616.99477



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.

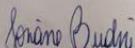
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

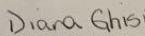
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)**

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

#### ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 304

Com início às 09h30 (nove e trinta) do dia trinta do mês de janeiro de 2018 (dois mil e dezoito), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Luiza Martins Longaretti**, sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Dra. Vanessa Moraes de Andrade, intitulada "**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO COM MELANONINA SOBRE PARÂMETROS GENÉTICOS EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE CÂNCER DE PELE DO TIPO MELANOMA**". A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada; Prof. Dr. Paulo César Lock Silveira (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Prof.<sup>a</sup> Dra. Gabriela Trevisan (Universidade Federal de Santa Maria - UFSM) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 10h30 (dez e trinta), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Prof.<sup>a</sup> Dra. Josiane Budni, Coordenadora Adjunta do Programa. Criciúma, 30 (trinta) de janeiro de 2018 (dois mil e dezoito).

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Josiane Budni  
Coordenadora Adjunta do PPGCS

  
Diana Ghisi Daniel  
Secretária



## **FOLHA INFORMATIVA**

A dissertação foi elaborada seguindo a resolução nº 07/2015/colegiado de Coordenação do PPGCS e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LABIM) do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.



*Dedico este trabalho à minha família, especialmente aos meus avós Adão e Maria Luiza, como retribuição de todo apoio e educação que me proporcionaram.*





## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus pelo poder da vida.

Agradeço aos meus avós, Adão e Maria Luiza, pois são meus pais, avós e meu porto seguro que estão sempre me dando suporte para seguir em frente. Agradeço aos meus tios, Bibianna e Guto e meu primo Augusto, que sempre acreditaram na minha capacidade de voar alto. Não são os laços de sangue, mas os compromissos sentimentais que determinam o valor de uma família.

Agradeço ao Michael, pessoa com quem amo partilhar a vida, por todo o amor ao longo desses anos. Agradeço também a sua família pela companheirismo e carinho em mim depositados. Aquilo que o coração ama, se torna eterno.

Agradeço à minha orientadora, Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Vanessa Andrade, que me deu a oportunidade de crescer profissionalmente e ao longo desses anos vem me ensinando com ética. Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.

Agradeço à minha coorientadora, Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Flávia Rigo, que esteve comigo durante toda a realização deste trabalho, contribuindo brilhantemente para que ele se tornasse possível e também pela sua alegria contagiante. Decida-se a sorrir. Seja conhecido como uma pessoa feliz, agradável e alegre. Que lega!

Agradeço imensamente à Jéssica Luciano, que esteve comigo durante toda a execução deste trabalho, persistindo do início ao fim. Já, este trabalho também é seu. Reciprocidade, é isso que faz as coisas darem certo.

Agradeço às minhas amigas, Ângela, Giulia, Maiara, Samanta e Sinthia. Vocês são o combustível para me fazerem seguirem em frente. Obrigada por apoiarem as minhas decisões. Os bons amigos conhecem todas as nossas histórias, os melhores amigos fazem parte delas.

Agradeço a Adri, por ter me acompanhado durante toda a minha vida acadêmica, me ajudando sempre que eu precisasse; a Marina e a Nathália, por todo o suporte nos momentos em que precisei e também pela convivência diária, dividindo todas as angústias e alegrias. Companheirismo é mais do que ser motivo de sorrisos ensolarados. É permanecer ao lado nos dias de olhos nublados e chuvosos.

Agradeço aos amigos que pude firmar durante o mestrado, Giulia e Gustavo. Vocês ajudaram muito a vencer esta importante etapa da minha vida. Obrigada por estarem comigo nesta jornada. O caminho da vida não teria tanto sentido sem a companhia de bons amigos.



Agradeço à Thais Vilela, por ter me ajudado na parte escrita desta dissertação.

Agradeço a todos os alunos de iniciação científica do GPGTOX, por terem executado da melhor forma possível todas as atividades pertinentes para que este trabalho pudesse se tornar real.

Agradeço à Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Paula Rohr, por ter contribuído brilhantemente para a minha vida acadêmica, desde a época de graduação.

Agradeço ao grupo da Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Flávia Rigo, especialmente à Alessandra e à Bethina, pois graças à elas este trabalho pode ser efetuado.

Agradeço ao grupo do Prof. Dr. Ricardo Pinho, por suas contribuições para que este trabalho se tornasse mais completo.

Agradeço ao Prof. Dr. Ricardo Andrez, por ter aceitado o convite para contribuir para que este trabalho se tornasse melhor. Agradeço também pela ótima convivência no laboratório durante este período, alegrando a todos a sua volta.

Agradeço à minha banca, Gabriela Trevisan e Paulo Locks, por contribuir para que este trabalho se torne melhor e também por acrescentar na minha vida profissional.

Agradeço aos funcionários do Centro de Experimentação Animal, Deivid, Heron, Elige e Sandra, pela paciência e ajuda durante a elaboração deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que de uma forma ou de outra contribuíram e ainda contribuem para que eu me torne uma pessoa melhor pessoal e profissionalmente. A todos vocês minha eterna gratidão. Não há no mundo exagero mais belo do que a gratidão.



*“Ninguém é tão grande que não possa aprender, nem tão pequeno que não possa ensinar”.*  
*Esopo*



## RESUMO

**Introdução:** Os cânceres foram as doenças crônicas não transmissíveis responsáveis por cerca de 75% das mortes no Brasil em 2016. O melanoma é um câncer de pele que acomete os melanócitos e devido ao seu alto potencial metastático em pulmão, fígado, cérebro e ossos, é responsável pelo maior número de mortes relacionado aos cânceres de pele. As causas do melanoma podem ser de origens genéticas e ambientais, sendo que a radiação ultravioleta do tipo A é a mais importante no desenvolvimento deste câncer, levando à formação de espécies reativas de oxigênio que podem danificar macromoléculas, tais como o DNA. Nesse contexto, antioxidantes estão sendo estudados com o objetivo de atenuar os danos causados pelo melanoma, sendo assim, a melatonina se encaixa neste cenário por suas propriedades antitumorais, anti-inflamatórias e potencial eliminação de radicais livres. Várias pesquisas têm estudado o efeito da melatonina em pessoas com cânceres de pele, sendo que este hormônio tem se mostrado eficaz em diminuir os danos ao DNA. Com isso, os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos do pré-tratamento com melatonina sobre parâmetros genéticos em um modelo experimental de câncer de pele do tipo melanoma.

**Metodologia:** Para tanto, foram utilizados 32 camundongos machos C57BL/6, divididos em quatro grupos: Grupo 1 - Animais com 30 dias de idade que iniciaram o consumo de veículo (água + etanol 0,004%), receberam tampão fosfato (PBS) aos 60 dias de idade e continuaram o consumo de veículo por mais 30 dias (n=6), Grupo 2 – Animais com 30 dias de idade que iniciaram o consumo de melatonina, com administração de PBS aos 60 dias de idade e continuaram com o consumo de melatonina por mais 30 dias (n=6); Grupo 3 – Animais com 30 dias de idade que iniciaram o consumo de veículo (água + etanol 0,004%), receberam células de melanoma B16F10 aos 60 dias de idade e continuaram com consumo de veículo por mais 30 dias (n=10); Grupo 4 – Animais com 30 dias de idade que iniciaram o consumo de melatonina, receberam administração de células de melanoma B16F10 aos 60 dias de idade e continuaram com o consumo de melatonina por mais 30 dias (n=10). As células de melanoma foram inoculadas na pata traseira direita e o tumor foi quantificado ao término do experimento. Ao final dos tratamentos, a amostra sanguínea foi coletada e os animais foram submetidos à eutanásia e as amostras biológicas sangue, pulmão, fígado, córtex e medula óssea foram coletadas para as análises genotóxicas, através do Ensaio Cometa, Teste de Micronúcleos e avaliação de metástases.

**Resultados:** A indução do câncer foi demonstrada através da



medida do tumor na pata dos animais. Além disso, o tumor causou danos ao DNA nos tecidos analisados em ambos os parâmetros avaliados, Índice de Danos e Frequência de Danos, sendo que a melatonina foi capaz de reverter estes danos em sangue, fígado, córtex e medula óssea. Não foram observadas metástases nos tecidos analisados. Conclusão: Os resultados demonstram que a melatonina apresentou efeitos antígeno-tóxicos e antimutagênicos frente a este modelo de câncer de pele do tipo melanoma.

**Palavras-chaves:** Melanoma; Células B16F10; Melatonina; Danos no DNA; Antioxidante.



## ABSTRACT

**Introduction:** Cancers were chronic non-transmissible diseases responsible for about 75% of deaths in Brazil in 2016. Melanoma is a skin cancer that affects melanocytes and because of its high metastatic potential in lung, liver, brain and bone, is responsible by the highest number of deaths related to skin cancers. The causes of melanoma can be of genetic and environmental origin, and type A ultraviolet radiation is the most important in the development of this cancer, leading to the formation of reactive oxygen species that can damage macromolecules such as DNA. In this context, antioxidants are being studied in order to reduce the damage caused by melanoma, so melatonin adjust in this scenario because of its antitumor, anti-inflammatory and free radical scavenging properties. Several studies have studied the effect of melatonin in people with skin cancers, and this hormone has been shown to be effective in reducing DNA damage. Therefore, the objectives of this study were to evaluate the effects of pre-treatment with melatonin on genetic parameters in an experimental model of skin cancer of the melanoma type. **Methodology:** For this purpose, 32 male C57BL/6 mice were used, divided into four groups: Group 1 - Animals with 30 days old who started vehicle consumption (water + 0.004% ethanol), administration of phosphate buffer (PBS) at 60 days of age and continued vehicle consumption for a further 30 days (n = 6), Group 2 - Animals with 30 days of age who started consuming melatonin, administered PBS at 60 days of age and continued with the consumption of melatonin for another 30 days (n = 6); Group 3 - Animals with 30 days of age who started vehicle consumption (water + 0.004% ethanol) received B16F10 melanoma cells at 60 days of age and continued with vehicle consumption for another 30 days (n = 10); Group 4 – 30 day old animals that started consuming melatonin and administration B16F10 melanoma cells at 60 days of age and continued to consume melatonin for another 30 days (n = 10). Melanoma cells were inoculated into the right hind paw and the tumor quantified at the end of the experiment. At the end of the treatments, the blood sample was collected and the animals were submitted to euthanasia and the biological samples blood, lung, liver, cortex and bone marrow were collected for the genotoxic analysis, through the Comet Assay, Micronucleus Test and evaluation of metastasis. **Results:** The cancer induction was demonstrated by measurement of paw tumor of animals. In addition, the tumor causes DNA damage in tissues analyzed in both parameters, Damage Index and Frequency of Damage, and melatonin was able to reverse these damages



in blood, liver, cortex and bone marrow. No metastases were observed in the tissues analyzed. Conclusion: The results demonstrate that melatonin showed antigenotoxic and antimutagenic effects against this model of melanoma skin cancer.

**Keywords:** Melanoma; B16F10 cells; Melatonin; DNA damage; antioxidant.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Desenho experimental pré-tratamento.....	43
Figura 2: Pulmão de camundongos C57BL/6 inoculados com células de melanoma B16F10, apresentando nódulos metastáticos.....	44
Figura 3: Classe de danos analisadas através do Ensaio Cometa.....	45
Figura 4: Avaliação visual do tamanho da pata traseira dos animais no 30º dia no grupo PBS + veículo (A) e grupo melanoma + veículo (B).....	48
Figura 5: Análise de metástase em pulmão (A), fígado (B) e córtex (C) de camundongos submetidos ao modelo animal de melanoma.....	49
Figura 6: ID e FD no DNA em células de sangue de camundongos tratados com melatonina e submetidos ao modelo experimental de melanoma, avaliados através do Ensaio Cometa.....	49
Figura 7: ID e FD no DNA em células de pulmão de camundongos tratados com melatonina e submetidos ao modelo experimental de melanoma, avaliados através do Ensaio Cometa.....	49
Figura 8: ID e FD no DNA em células de fígado de camundongos tratados com melatonina e submetidos ao modelo experimental de melanoma, avaliados através do Ensaio Cometa.....	51
Figura 9: ID e FD no DNA em células de córtex de camundongos tratados com melatonina e submetidos ao modelo experimental de melanoma, avaliados através do Ensaio Cometa.....	52



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ingestão média diária de líquidos por animal.....	47
Tabela 2: Medida do tamanho da pata traseira dos animais no 30º dia nos diferentes grupos.....	48
Tabela 3: Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMn) em medula óssea de camundongos submetidos a um modelo de melanoma metastático.....	53



## LISTA DE ABREVIATURAS

CAT – Catalase;  
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais;  
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal;  
CP – Ciclofosfamida;  
DCNT – Doenças crônicas não transmissíveis;  
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium;  
DNA – Ácido desoxirribonucleico;  
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético;  
ENC – Eritrócitos normocromáticos;  
ENCMn – Eritrócitos normocromáticos micronucleados;  
EPC – Eritrócitos policromáticos;  
EPCMn – Eritrócitos policromáticos micronucleados;  
ERO – Espécies reativas de oxigênio;  
FD – Frequência de danos;  
GPx – Glutathione peroxidase  
GST - Glutathione-S-transferase;  
ID – Índice de danos;  
INCA – Instituto Nacional do Câncer;  
MN – Micronúcleo;  
MT1 MT2 – Receptores de melatonina do tipo 1 e 2;  
NADPH - Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida;  
PBS – Tampão fosfato salino;  
SOD – Superóxido dismutase;  
UV – Radiação ultravioleta;  
UVA – Radiação ultravioleta tipo A.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>32</b>
1.1 CÂNCER DE PELE DO TIPO MELANOMA.....	32
1.2 INSTABILIDADE GENÔMICA NO CÂNCER DO TIPO MELANOMA.....	33
1.3 TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO.....	35
1.4 MELATONINA.....	36
1.5 JUSTIFICATIVA.....	39
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
3.1 CRITÉRIOS ÉTICOS.....	41
<b>3.1.1 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....</b>	<b>41</b>
3.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DA MELATONINA.....	41
3.3 INDUÇÃO DO MELANOMA.....	41
3.4 DESENHO EXPERIMENTAL.....	42
3.5 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DO TUMOR.....	43
3.6 AVALIAÇÃO DE METÁSTASES.....	43
3.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	44
3.8 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE.....	44
<b>3.8.1 Ensaio Cometa.....</b>	<b>44</b>
<b>3.8.2 Teste de Micronúcleos (MN).....</b>	<b>46</b>
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
4.1 INGESTÃO DE LÍQUIDOS.....	47
4.2 MEDIDA DO TUMOR.....	47
4.3 AVALIAÇÃO DE METÁSTASES.....	49
4.4 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE.....	49
<b>4.4.1 Ensaio Cometa.....</b>	<b>49</b>
<b>4.4.2 Teste de Micronúcleo.....</b>	<b>52</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>7 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>
<b>APÊNDICE A – CARTA DE ACEITE CEUA.....</b>	<b>81</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CÂNCER DE PELE DO TIPO MELANOMA

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são consideradas um grande problema de saúde pública, sendo responsáveis por cerca de 72% das mortes no Brasil (INCA, 2016a). Entre as DCNT, encontram-se os cânceres e em 2017 mais de um milhão de novos casos foram diagnosticados (American Cancer Society, 2017).

O câncer é um conjunto de doenças que têm como característica em comum a proliferação desordenada e maligna de células cancerígenas que invadem tecidos e órgãos, podendo haver metástases (INCA, 2016b). Os fatores de risco para o câncer podem ser ambientais, como é o caso da exposição excessiva à radiação solar, considerada a principal causa dos cânceres de pele (INCA, 2016b). Os cânceres de pele, por sua vez, são os mais comuns dos tipos de cânceres da população clara (Leiter et al., 2014), apresentando um risco de cerca de 10 vezes maior do que a população negra, asiática ou hispânica (Ries et al., 2000; Markovic et al., 2007) correspondendo a uma estimativa de 30% dos novos casos de cânceres no Brasil no ano de 2017 (INCA, 2016b).

O câncer de pele é dividido em duas categorias: melanoma e não melanoma (Michèle et al., 2016). O não-melanoma inclui carcinomas de células basais e escamosas, adquirindo um curso mais benigno e com características localmente agressivas. De acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2016b), as estimativas para 2017 foram cerca de 180 mil novos casos deste tipo de câncer. Por outro lado, o câncer de pele do tipo melanoma, originário dos melanócitos (células produtoras de pigmento da pele, localizados na camada basal da epiderme) (Caramel et al., 2013; Li et al., 2015), possui características malignas e agressivas que apresentam crescentes incidências na maioria dos países do mundo (Nikolaou e Stratigos, 2014).

O melanoma acomete uma heterogeneidade de células, incluindo as endoteliais, do sistema imune e fibroblastos, que estão envolvidos em um tumor específico na matriz extracelular (Brychtova et al., 2011). A interação recíproca entre as células tumorais e as células do estroma contribui para o processo de transformação, incentivando o crescimento, angiogênese e inflamação (Li et al., 2007). Este tipo de câncer é mais raro, representando menos de 2% de todos os cânceres de pele. Contudo, é responsável pela maior parte dos cânceres relacionados à mortalidade, quando diagnosticado tardiamente (American Cancer Society, 2015).

As taxas de sobrevivência de cinco anos para os pacientes afetados pelo melanoma estão acima de 95% quando presente apenas como doença localizada. No entanto, este número cai significativamente para 61,7 e 15,2% para indivíduos com metástases regionais e distantes, respectivamente. A alta resistência desses tumores para a terapia causa a alta mortalidade dos pacientes com metástases distantes (Siegel et al., 2013).

A incidência de melanoma vem aumentando exponencialmente nas últimas sete décadas (Godar, 2011; Merrill et al., 2015). Em 2013, estimou-se que aproximadamente 77 mil pacientes foram diagnosticados com melanoma na América, e destes, acredita-se que 9480 morreram devido à doença (Siegel et al., 2013). De acordo com estimativas feitas pelo INCA (2016b), anualmente 5670 pessoas são diagnosticadas com melanoma no Brasil, sendo que 3000 são homens e 2670 são mulheres, contabilizando cerca de 1570 mortes.

Os melanomas em estágio inicial podem ser tratados com sucesso, principalmente através da excisão cirúrgica da lesão tumoral primária. No entanto, os melanomas de estágio avançado são difíceis para tratar, uma vez que a doença se espalha além da lesão primária, para órgãos distantes (Liu et al., 2013). Dessa forma, o melanoma é considerado um câncer bastante agressivo e pode se disseminar a partir de um tumor primário pequeno, podendo haver metástases em nódulos linfáticos, pulmão, fígado, cérebro e ossos (Xie et al., 2006; Braeuer et al., 2014). Em decorrência deste potencial e à resistência terapêutica deste tipo de tumor (Tucker, 2008; Greinert, 2009), o melanoma é considerado o mais sério da sua categoria (Situm et al., 2007).

## 1.2 INSTABILIDADE GENÔMICA NO CÂNCER DO TIPO MELANOMA

Os fatores de risco para o desenvolvimento de melanoma podem ser genéticos e ambientais (Balch et al., 2009; Friedman et al., 2009; Nelson e Tsao, 2009), sendo que a exposição à radiação ultravioleta (UV) desempenha um papel importante na progressão do melanoma maligno (Chang et al., 2009). Dessa forma, estudos apontam que o estresse oxidativo, imunossupressão, resposta inflamatória e danos ao DNA (Madan et al., 2010; Gordon, 2013) contribuem para iniciação, progressão e metástases do melanoma (Garibyan e Fisher, 2010). Zaidi et al. (2011) em experimento realizado com camundongos, observaram que as respostas inflamatórias da pele induzidas por radiação UV podem ativar a proliferação e migração de melanócitos. Além disso, Bald et al. (2014)

relataram que as alterações microambientais causadas pela radiação UV promovem o desenvolvimento do melanoma, estimulando a sobrevivência, expansão e disseminação de melanócitos com DNA danificado.

Há muito tempo vem se relatando o processo de transformação dos melanócitos normais em células de melanoma, como no estudo de Harlyn (1985), onde essa transformação é caracterizada por um longo processo. A fase de crescimento horizontal é o primeiro passo para o fenótipo invasivo, no qual os melanócitos sofrem alterações que oferecem uma vantagem proliferativa e de sobrevivência. Em seguida ocorre uma fase de crescimento vertical, em que as células tumorais invadem profundamente a derme/hipoderme, sendo que as células do melanoma metastático podem, eventualmente, romper o endotélio e seguirem para locais distantes (Harlyn, 1985).

A radiação ultravioleta do tipo A (UVA), componente predominante da luz solar, é considerada um carcinógeno (El Ghissassi et al., 2009) e exerce um papel significativo no desenvolvimento do melanoma (Cadet e Douki, 2011), levando à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), associada a uma diminuição significativa das defesas antioxidantes (Valko et al., 2006). As ERO podem danificar proteínas, lipídeos e o DNA, estando envolvidas na fisiopatologia de várias doenças, incluindo o câncer (Wan e Winn, 2006; Lee e Lee, 2006). Os danos ao DNA podem ser na forma de mutações, deleções, amplificações de genes e rearranjos (Sander et al., 2004; Nishigori et al., 2004). Além disso, pode ocorrer a interrupção da síntese e reparo, através da inibição e/ou inativação das proteínas chaves antioxidantes (Eiberger et al., 2008), levando à instabilidade genômica (Hair et al., 2010).

É fundamental que o reparo do DNA seja mantido para a integridade genômica da pele, pois polimorfismos em genes de reparo do DNA podem contribuir afetando a suscetibilidade genética, podendo levar ao desenvolvimento do câncer. Indivíduos com defeitos hereditários nos genes de reparo por excisão de nucleotídeos, que removem lesões do DNA, (Wood et al., 2005), têm baixo reparo das lesões no material genético induzidas pela radiação UV, resultando em carcinoma de células escamosas, células basais e câncer de pele do tipo melanoma (Lehmann et al., 2011).

Os cânceres humanos surgem através de um processo de várias mutações (Hanahan e Weinberg, 2000), sendo que algumas delas podem ativar oncogenes específicos de linhagens celulares, como é o caso do BRAF, mutado em cerca de 50 a 70% nos casos de melanoma (Davies et al., 2003). Como descrito por Friedman et al. (2009), a alta incidência de

mutações somáticas no gene BRAF tem sido detectada em pacientes com melanoma primário, sendo que algumas terapias atuam inibindo esse gene (Bollag et al., 2010).

Por outro lado, o melanoma é um câncer que é amplamente resistente a drogas citotóxicas ou à radiação e isso pode ser atribuído, em parte, por este câncer prejudicar a resposta apoptótica dependente de p53 (Smalley et al., 2007). O p53 é um gene supressor de tumor, sendo que suas principais funções biológicas incluem a regulação da progressão do ciclo celular, apoptose, senescência, diferenciação celular e reparo do DNA (Soussi e Beroud, 2001). O p53 codifica uma fosfoproteína que, através da via MAP quinase, atua na manutenção do estado de não malignidade das células, sendo que no melanoma essa via sofre mutações que acarretam na proliferação celular das células tumorais deste câncer (Bannin et al., 1998). Funcionalmente, a proteína p53 atua como um fator de transcrição, vinculada a sequências específicas do DNA, sendo assim, pode ativar ou não a expressão gênica. Mais recentemente, o p53 também demonstrou desempenhar papéis no metabolismo, necrose, autofagia, acumulação de ERO e manutenção de células estaminais (Hager e Gu, 2014).

Nas células normais, o p53 é frequentemente indetectável (Sherr, 2001), no entanto, em diferentes vias estressoras, incluindo o estresse ocasionado pelo câncer ou danos ao DNA, a quantidade de p53 é aumentada devido à sua baixa degradação (Munger et al., 1992; Gembarska et al., 2012), sendo que mutações inativando-o estão presente em aproximadamente metade de todos os cânceres humanos (Soussi e Beroud, 2001).

### 1.3 TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DO MELANOMA

O melanoma é um dos cânceres humanos mais agressivos (Lo e Fisher, 2014) e quando diagnosticado precocemente, tem alta chances de cura, no entanto, o melanoma avançado é altamente resistente a todas as formas atuais de terapêuticas disponíveis (Meier et al., 2007), tais como quimioterapia, radioterapia (RT) e imunoterapia (Sasse et al., 2007), com isso, novas abordagens devem ser desenvolvidas com o objetivo de potencializar o efeito dessas terapêuticas (Kirkwood et al, 2012).

A RT possui como mecanismo de ação a indução de danos ao DNA das células de melanoma (Helleday et al., 2008), no entanto, as células cancerígenas têm resistência a RT, uma vez que possuem capacidade de reconhecer e reparar o dano induzido ao seu material genético (Pourquier e Robert, 2011).

Atualmente, há dois quimioterápicos, vemurafenib e o ipilimumab, que são utilizados para o tratamento do melanoma. As pessoas com este tipo de câncer de pele que fazem uso deste fármaco aumentam sua sobrevivência de 6 meses para até 10 meses (Hodi et al., 2010). Porém, o vemurafenib e o ipilimumab não são eficazes ao atuar na resistência deste câncer aos outros tratamentos citados acima, como quimioterapia, radioterapia e imunoterapia (Hodi et al., 2010; Chapman et al., 2011).

Neste cenário, a pesquisa científica tem se voltado a estudar novas abordagens para a prevenção do desenvolvimento do melanoma, como a quimioprevenção, considerando a sua crescente incidência associada com a mortalidade decorrente das complicações desta grave doença, tais como as metástases (Ho e Tsao, 2015).

Dessa forma, novos tratamentos eficazes e seguros contra o melanoma que exerçam atividade preventiva e eficiente, são urgentemente necessários. Pensando, portanto, na prevenção do genoma e dos agravos à saúde causados pelos cânceres de pele, a melatonina vem sendo bastante estudada. Alguns estudos têm relatado os efeitos positivos do tratamento com melatonina em pacientes com diferentes tipos de cânceres avançados, tais como no estudo de Seely et al. (2012) onde foi realizada uma revisão sistemática em 21 ensaios clínicos sobre o impacto da melatonina isoladamente ou em associação com a quimioterapia. Estes autores concluíram que pacientes com câncer, que incluíam uma grande variedade de tipos de células cancerígenas biologicamente e clinicamente distintas, incluindo câncer de mama, colorretal, pulmão e células renais, glioblastoma, melanoma e outros, que fazem uso da melatonina de forma oral, tiveram uma melhor taxa de sobrevivência, taxa de resposta ao tratamento e diminuição da progressão da doença, além de diminuir os efeitos secundários relacionados à quimioterapia, incluindo trombocitopenia, neurotoxicidade e fadiga.

#### 1.4 MELATONINA

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), hormônio derivado do aminoácido triptofano, é essencialmente produzida pela glândula pineal e outros órgãos, incluindo a retina, trato gastrointestinal, pele, medula óssea e linfócitos (Acuña-Castroviejo et al., 2014). Essa molécula lipofílica é rapidamente ligada à albumina, se difunde pelo sangue e, com isso, se espalha por todo o corpo (Tricoire et al., 2002).

A melatonina tem múltiplos meios para realizar seus efeitos, atuando através de receptores acoplados à proteína G (MT1 e MT2), que são expressos em numerosas áreas do sistema nervoso central e em tecidos

periféricos para modular atividades biológicas diversas (Reiter et al., 2010; Slominski et al., 2012; Reiter et al., 2014; Lacoste et al., 2015).

A síntese e secreção da melatonina são reguladas pela intensidade da luz (Skene e Arendt, 2006), controlando o ritmo circadiano, a indução do sono e melhorando a imunidade (Reiter et al., 2000). Em estudo realizado por Kim et al. (2015), eles observaram que o nível de produção da melatonina dependia da raça, gênero e idade, sendo que a produção deste hormônio foi maior em afro-americanos do que em caucasianos. A melatonina não só contribui no controle do ritmo circadiano, mas também está envolvida na modulação do sistema imune, prevenção da inflamação, eliminação de radicais livres, ação neurotransmissora (Galano et al., 2011; Mauriz et al., 2013), e por último, mas não menos importante, tem propriedade oncostática (Bonfont-Rousselot e Collin, 2010; Reiter et al., 2010; Fernández-Mar et al., 2012).

Uma redução nos níveis circulantes de melatonina, polimorfismos dos genes do receptor da melatonina e distúrbios circadianos estão associados a uma série de doenças fisiológicas e patológicas, incluindo o envelhecimento, síndrome metabólica, diabetes tipo 2, doenças imunes, hipertensão, vários distúrbios do humor e cognitivos e o câncer (Cutando et al., 2012; Bizzarri et al., 2013; Wei et al., 2015; Ma et al., 2016). Devido ao seu amplo espectro de ações, existem múltiplos mecanismos subjacentes à capacidade da melatonina para inibir o crescimento tumoral. Estes incluem, entre outros, os seus variados efeitos antioxidantes, a modulação do ciclo celular, a indução da apoptose, a inibição da atividade da telomerase, a capacidade de diminuir a metástase, efeitos anti-angiogênese, inibição da absorção do fator de crescimento, estimulação da diferenciação celular e ativação do sistema imunológico (Reiter, 2004; Mediavilla et al., 2010).

De acordo com Li et al. (2013), a melatonina possui propriedades anti-inflamatórias e antitumorais que atuam contribuindo para a inibição da progressão do câncer em diferentes tipos de tumores, tais como o de melanoma e de origem epitelial (Cos e Sánchez-Barceló, 2000). O mecanismo subjacente a esses recursos parece envolver vários processos, incluindo a inibição da captação de fator de crescimento de ácido graxo por tumores (Blask et al., 2005) e inibição da atividade da telomerase no câncer (Leon-Blanco et al., 2003). Além disso, a melatonina também apresenta possível influência na angiogênese - maior mecanismo responsável pelo crescimento tumoral (Lissoni et al., 2001).

Desde 1993, quando a melatonina foi primeiramente identificada como um captador de radicais livres (Tan et al., 1993), muitos artigos têm sido publicados confirmando a habilidade desta potente molécula antioxidante

em proteger o DNA de danos causados por esses radicais (Galano et al., 2013). Há evidências de que a melatonina tem seus efeitos na reparação do dano em DNA, através de inativação do agente causador de dano, principalmente o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e aumentando a expressão de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) e glutathione peroxidase (GPx), ajudando assim na eliminação de ERO (Sliwinski et al., 2008; Shirazi et al., 2013). Além disso, El-Missiry et al. (2007) relataram que a melatonina apresentou um efeito radioprotetor contra a radiação ionizante no fígado, prevenindo o estresse oxidativo, através do estímulo à glutathione. A melatonina é capaz de entrar na célula difundindo-se através da membrana celular e atuando como um eliminador de radicais livres (Jung e Ahmad, 2006).

Outro ponto importante é que a melatonina é bem tolerada pelo baixo potencial de interação com outras medicações e, em alguns casos, pode reduzir os efeitos de drogas sintéticas devido às suas propriedades de eliminar os radicais livres (Reiter et al., 2002). Nesse contexto, estudo conduzido por Lialiaris et al. (2008) relatou a atividade antioxidante da melatonina em linfócitos humanos intoxicados por melfalano (utilizado para o tratamento de mieloma) (American Cancer Society, 2015), pela redução na troca de cromátides irmãs, diminuindo a genotoxicidade mediada por ERO (Ustundag e Duydu, 2007). Além disso, a melatonina tem sido estudada por sua capacidade de aumentar a eficiência da cadeia transportadora de elétrons, e como consequência, reduzir a perda de elétrons e a geração de radicais livres (Reiter et al., 2002). De fato, Qi et al. (2001) mostraram redução da formação de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, um produto do DNA lesado, sendo a melatonina de 60 a 70 vezes mais efetiva que alguns antioxidantes clássicos.

O uso de melatonina em seres humanos reduziu o crescimento tumoral em alguns casos e aumentou a sobrevivência de pacientes com diferentes tipos de cânceres, tais como gastrointestinais, pulmonares, renais, cerebrais e de pele, em comparação com indivíduos tratados apenas com terapias convencionais, melhorando ainda, a qualidade de vida desses pacientes (Lissoni, 2000). Isso provavelmente está relacionado com a capacidade da melatonina de reduzir a toxicidade dos agentes quimioterapêuticos e da sua ação sinérgica (Lissoni, 2000). Lissoni (2000) também relatou efeitos benéficos substanciais do tratamento de pacientes com câncer com análogos de melatonina. As observações relatadas em todas essas pesquisas clínicas são encorajadoras e indicam que a administração de melatonina é considerada por melhorar a qualidade de vida de pacientes que sofrem com uma variedade de

cânceres, sejam eles de origem gastrointestinais, renais, cerebrais ou de pele (Lissoni, 2000; Vijayalaxmi et al., 2002).

Liu et al. (2013) observaram que a melatonina pode aumentar a capacidade de reparo do DNA contra quebras nas cadeias causadas pelo potente agente mutagênico metilmetanosulfonato, avaliadas através do Ensaio Cometa. Esta pesquisa suporta a hipótese de que a melatonina pode desempenhar um papel protetor no desenvolvimento do câncer, uma vez que o dano e o reparo do DNA desempenham papéis na transformação e progressão de células cancerígenas, sendo que a ação benéfica da melatonina pode estar direta ou indiretamente ligada a esses processos (Gazi et al., 2006).

Outros estudos também foram feitos acerca do potente efeito antígeno-tóxico da melatonina, como o trabalho conduzido por Shokrzadeh et al. (2014), que observaram o efeito da melatonina sobre a genotoxicidade induzida pela ciclofosfamida (CP), fármaco utilizado como quimioterápico que possui efeitos mutagênicos. Em todas as doses utilizadas a melatonina foi capaz de reduzir significativamente a genotoxicidade causada pela CP. Outro estudo também mostrou resultados satisfatórios ao utilizar a CP para avaliar o efeito da melatonina sobre danos no DNA de ratos que foram submetidos à retirada da glândula pineal, sendo que houve uma redução nos danos ao DNA causados pelo fármaco (Ferreira et al., 2013).

## 1.5 JUSTIFICATIVA

Considerando o grave problema de saúde pública que representa o câncer de melanoma, devido ao seu alto potencial de metástase, faz-se necessário a busca por novos tratamentos adjuvantes aos convencionais, com atividade oncostática e com toxicidade baixa, como é o caso da melatonina.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos antigenotóxicos e antimutagênicos do pré-tratamento com melatonina em um modelo de câncer de pele do tipo melanoma em camundongos.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Avaliar a ingestão de líquidos de camundongos em um modelo de câncer do tipo melanoma;
- b) Avaliar o desenvolvimento do tumor em modelo experimental de câncer de pele do tipo melanoma;
- c) Verificar metástases em pulmão, fígado e córtex de camundongos em um modelo de câncer do tipo melanoma;
- d) Avaliar o efeito do pré-tratamento com melatonina sobre os níveis de danos no DNA em sangue, pulmão, fígado, córtex e medula óssea em modelo experimental de câncer de pele do tipo melanoma.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 CRITÉRIOS ÉTICOS**

Foram utilizados 32 camundongos machos C57BL/6 (20 - 30g), com 30 dias de idade. A escolha da linhagem animal se deve ao fato do melanoma se originar nos melanócitos, células localizadas na camada basal da epiderme, que tem como função produzir melanina, sendo que os camundongos C57BL/6 produzem melanina (Li et al., 2015). Os animais foram obtidos do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e alojados em caixas de polietileno, com comida e água ad libitum e mantidos em um ciclo de 12 horas luz-escuro (a luz é ligada às 7h da manhã), com temperatura controlada de  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ . 3.1.1 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

##### **3.1.1 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)**

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (protocolo número 022/2017-1), conforme Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008 da cidade de Criciúma – SC. Os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), lei Arouca nº11.794/2008. Cuidados foram tomados de modo a evitar o mínimo de desconforto e sofrimento para os animais.

#### **3.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DA MELATONINA**

A melatonina (Sigma Aldrich, Brasil) foi dissolvida em etanol absoluto e adicionada à água potável a uma concentração final de etanol de 0,004%. A solução de melatonina foi preparada no escuro e correspondeu a 3 mg/Kg por dia para seres humanos e 2 mg/L para animais (Anisimov et al, 2003). A solução de melatonina foi colocada em garrafas de água protegida da luz e foram trocadas por uma solução fresca duas vezes por semana (Corrales et al., 2014), sendo que o controle para melatonina foi apenas o etanol de 0,004% adicionado na água de beber dos animais.

#### **3.3 INDUÇÃO DO MELANOMA**

Para indução de tumor foram utilizadas células B16F10 ( $2 \times 10^5$  células/mL), uma variante altamente invasiva de melanoma B16 derivado de camundongos C57BL/6 (Poste, 1980). O melanoma foi induzido

através da inoculação de 20  $\mu$ L de células de melanoma B16F10 na pata traseira dos animais com 60 dias de idade. As células de melanoma foram cultivadas em monocamada utilizando meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/streptomicina. Para a inoculação do tumor, as células foram ressuspensas em tampão fosfato (105 células/mL), e após foram injetados 20  $\mu$ L da suspensão de células ou veículo (tampão fosfato – PBS) subcutaneamente na região plantar da pata direita traseira conforme descrito previamente (Sasamura et al., 2003). A medida do tumor foi realizada através da espessura de pata nos diferentes tratamentos utilizando paquímetro digital (Trevisan et al., 2013).

### 3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram randomicamente divididos em quatro grupos referentes ao pré-tratamento (Figura 1) com dez animais nos grupos onde há o modelo de melanoma e seis animais nos grupos que receberam apenas o PBS, sendo eles: Grupo 1 - Animais com 30 dias de idade que iniciaram o consumo de veículo (água + etanol 0,004%), administração de tampão fosfato (PBS) aos 60 dias de idade e continuaram o consumo de veículo por mais 30 dias (n=6), Grupo 2 – Animais com 30 dias de idade que iniciaram o consumo de melatonina, com administração de PBS aos 60 dias de idade e continuaram com o consumo de melatonina por mais 30 dias (n=6); Grupo 3 – Animais com 30 dias de idade que iniciaram o consumo de veículo (água + etanol 0,004%), receberam células de melanoma B16F10 aos 60 dias de idade e continuaram com consumo de veículo por mais 30 dias (n=10); Grupo 4 – Animais com 30 dias de idade que iniciaram o consumo de melatonina receberam células de melanoma B16F10 aos 60 dias de idade e continuaram com o consumo de melatonina por mais 30 dias (n=10). Apenas os grupos câncer (G3 e G4) tinham 10 animais devido à alta mortalidade do câncer de melanoma.

Após o término dos tratamentos, os animais foram submetidos à eutanásia e as amostras biológicas foram coletadas para as análises genotóxicas.

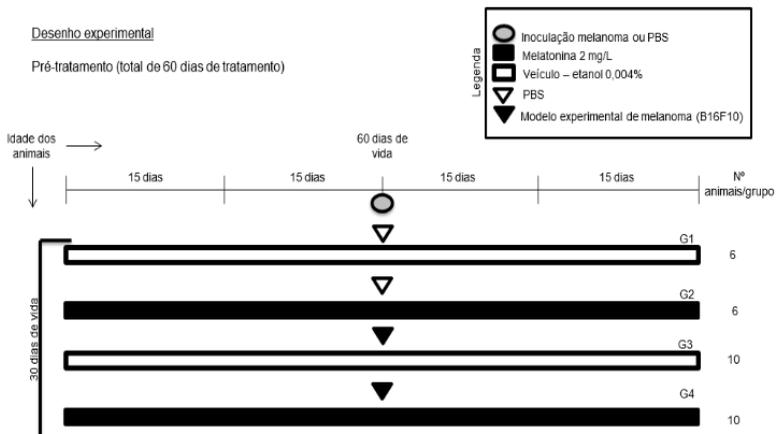


Figura 1: Desenho experimental pré-tratamento.

### 3.5 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DO TUMOR

A avaliação do desenvolvimento dos tumores foi realizada através da espessura da pata utilizando paquímetro digital (Trevisan et al., 2013).

### 3.6 AVALIAÇÃO DE METÁSTASES

A avaliação de metástases foi feita em pulmão, fígado e córtex dos animais submetidos ao modelo de melanoma por observação visual seguida de registro fotográfico e também pela contagem dos focos metastáticos nas superfícies dos mesmos (Figura 2) (Zhang et al., 2015), uma vez que no modelo animal de melanoma as células cancerígenas são facilmente visualizadas devido à produção de melanina (Bobek et al., 2010).



Figura 2: Pulmão de camundongos C57BL/6 inoculados com células de melanoma B16F10, apresentando nódulos metastáticos. Fonte: Cao et al., 2016.

### 3.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Após o término de tratamento dos diferentes grupos analisados, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação com guilhotina, para coleta de sangue e dissecação do córtex, fígado, pulmão e medula óssea. As amostras foram processadas, alíquotadas e armazenadas para posteriores análises moleculares.

### 3.8 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE

Para realização dos testes de genotoxicidade, foram utilizados sangue, fígado, córtex e pulmão dos camundongos para a realização do ensaio cometa e medula óssea, para realização do teste de micronúcleos.

#### 3.8.1 Ensaio Cometa

Para realização do ensaio cometa foram utilizados os seguintes tecidos biológicos: sangue, córtex, fígado e pulmão.

O ensaio cometa foi realizado como descrito por Singh et al. (1988) onde o sangue (alíquotas de 10  $\mu\text{L}$ ) foi coletado e colocado em microtubos heparinizados e refrigerados, e as amostras de córtex, fígado e pulmão foram dissecadas e imersas em tampão Merchant's refrigerado. Em seguida, as amostras dos tecidos foram individualmente homogeneizadas com o auxílio de uma seringa, através do movimento de vai e vem, a fim de obter uma suspensão celular. As células sanguíneas (alíquotas de 10  $\mu\text{L}$ ) e as suspensões celulares (alíquotas de 70  $\mu\text{L}$ ) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (lowmelting) e a seguir distribuídas em dois poços (alíquotas de 70  $\mu\text{L}$ ) em lâminas pré-revestidas com agarose de ponto de fusão normal (1,5%, w/v) e cobertas com duas lamínulas.

Após solidificadas, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram colocadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora de Triton X – 100 e 10% de DMSO) por no mínimo 1 hora, protegidas da luz e incubadas em tampão alcalino novo (pH 12,6) durante 30 minutos para o desnovelamento do DNA. As células foram submetidas a uma corrida de eletroforese, com o mesmo tampão, durante 20 minutos a 30 volts e uma corrente de 300 miliampères e posteriormente foram neutralizadas com solução neutralizadora. Para avaliação dos danos, as lâminas foram coradas com Syber Gold por 30 minutos e visualizadas em microscópio de fluorescência com ampliação de 200x.

Realizou-se avaliação de 100 células por animal e por tecido (50 células em cada lâmina duplicada), essas células foram avaliadas individualmente, sendo classificadas em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda, sendo a classificação 0 para ausência de cauda, até 4 para o comprimento máximo de cauda (Figura 3) (Collins et al., 1997). Através disso tem-se um Índice de Danos (ID) e uma Frequência de Danos (FD em %) para cada animal, sendo que o ID varia de zero (100 x 0 = 0; 100 células observadas completamente sem danos) a 400 (100 x 4 = 400; 100 células observadas com dano máximo) e o FD calcula-se com base no número de células com cauda versus o número de células sem cauda. As diretrizes internacionais e recomendações para o Ensaio Cometa consideraram que o visual de 100 cometas é um método de avaliação bem validado que tem alta correlação com a análise de imagem por computador (Collins et al., 1997). Utilizaram-se controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese com a finalidade de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas.

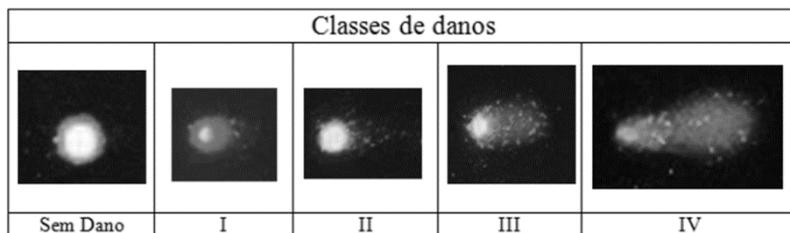


Figura 3: Classe de danos analisadas através do Ensaio Cometa.

### 3.8.2 Teste de Micronúcleos (MN)

O teste de micronúcleos foi realizado de acordo com o programa Gene-Tox da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (Mavournin et al., 1990; Krishna e Hayashi, 2000).

Após a extração da medula óssea, um esfregaço foi preparado diretamente na lâmina com uma gota de soro bovino fetal. As lâminas foram coradas com Giemsa 5%, secas e codificadas para análises às cegas.

Como uma medida de toxicidade na medula óssea, a relação entre eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC) foi analisada em 200 eritrócitos/animal.

A incidência de micronúcleos (MN) foi observada em 2000 EPCs e ENCs para cada animal (ou seja, 1000 a partir de cada uma das duas lâminas preparadas em duplicata), usando microscópio óptico de luz branca com ampliação de 1000x. O número médio de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMn) individual foi utilizado como unidade experimental.

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade das variáveis foi analisada através do teste de Barlett. A análise estatística da medida do tumor foi feita através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguido de post hoc de Tukey e a ingestão de líquidos através do ANOVA de uma via e post hoc Dunn. Para a análise do Ensaio Cometa e Teste de Micronúcleo foram utilizados ANOVA de duas vias, seguido de post hoc de Bonferroni. As análises estatísticas foram feitas pelo programa Graph Pad Prisma. Foram consideradas diferenças significativas quando o  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 INGESTÃO DE LÍQUIDOS

Durante os 60 dias de experimento, o volume dos líquidos consumido foi quantificado e dividido pelo número de animais por gaiola, duas vezes por semana. A Tabela 1 mostra a ingestão média diária de líquidos por animal.

Tabela 1: Ingestão média diária de líquidos por animal.

<i>Grupos</i>	<i>Ingestão diária de líquidos (mL)</i>
<i>PBS + veículo</i>	5,95 ± 1,48
<i>Melanoma + veículo</i>	7,82 ± 3,23
<i>PBS + melatonina</i>	7,68 ± 1,88
<i>Melanoma + melatonina</i>	10,70 ± 3,40*

Dados expressos em média ± desvio padrão. \*Diferença significativa em relação ao grupo PBS + veículo ( $p < 0,05$ ) (ANOVA de uma via, seguido de post hoc de Tukey)

De acordo com os resultados pode-se observar que houve aumento significativo na ingestão de líquidos do grupo melanoma + melatonina em relação ao grupo PBS + veículo, com  $p < 0,05$ , não diferindo dos demais grupos experimentais.

### 4.2 MEDIDA DO TUMOR

Neste trabalho avaliou-se o desenvolvimento do tumor nos animais submetidos ao modelo experimental de melanoma na pata.

A medida do tumor ocorreu no último dia do experimento, sendo que esta foi feita através de visualização e medição com uso de um paquímetro, como pode observado na Figura 4.

Figura 4: Avaliação visual do tamanho da pata traseira dos animais no 30º dia no grupo PBS + veículo (A) e grupo melanoma + veículo (B).



Além disso, para confirmar o desenvolvimento do tumor no grupo melanoma, o mesmo foi quantificado através de paquímetro digital (Tabela 2). Como pode ser observado na tabela 1, os grupos PBS + melatonina e PBS + veículo foram diferentes significativamente do grupo melanoma + melatonina e melanoma + veículo ( $p < 0,05$ ).

Tabela 2: Medida do tamanho da pata traseira dos animais no 30º dia nos diferentes grupos.

<i>Grupos</i>	<i>Medida do tumor (mm)</i>
<i>PBS + veículo</i>	1,53 ± 0,18
<i>Melanoma + veículo</i>	4,03 ± 1,01 <sup>a</sup>
<i>PBS + melatonina</i>	1,77 ± 0,36 <sup>b</sup>
<i>Melanoma + melatonina</i>	4,01 ± 0,78 <sup>a</sup>

Dados expressos em média ± desvio padrão. Foi utilizado o ANOVA de uma via, seguido pelo post hoc de Dunn.

<sup>a</sup>Diferença significativa em relação ao grupo PBS + veículo ( $p < 0,05$ );

<sup>b</sup>Diferença significativa em relação ao grupo melanoma + veículo ( $p < 0,05$ ).

### 4.3 AVALIAÇÃO DE METÁSTASES

A avaliação de metástases foi feita através de visualização, registro fotográfico e contagem dos focos de metástases em caso positivo (Figura 5). No entanto, não foram observados metástases nos tecidos analisados em ambos os grupos que receberam as células de melanoma, tratados ou não com melatonina.



Figura 5: Análise de metástase em pulmão (A), fígado (B) e córtex (C) de camundongos submetidos ao modelo animal de melanoma.

### 4.4 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE

#### 4.4.1 Ensaio Cometa

No Ensaio Cometa foram avaliados danos ao DNA através do ID e FD em células de sangue, pulmão, fígado e córtex dos camundongos tratados com melatonina e submetidos ao modelo experimental de melanoma.

De acordo com a Figura 6 pode-se observar que o grupo PBS + melatonina não demonstrou aumento de danos ao DNA em relação ao grupo PBS + veículo, mostrando que a melatonina não foi genotóxica no sangue nessas condições experimentais. Por outro lado, o grupo melanoma + veículo foi genotóxico, ou seja, causou danos ao DNA dos camundongos submetidos ao modelo experimental de melanoma, quando comparado com o grupo PBS + veículo ( $p < 0,05$ ). Com relação à antigenotoxicidade no sangue periférico dos camundongos, o grupo melanoma + melatonina apresentou valores significativamente menores de ID e FD, parâmetros usados para avaliar os danos ocasionados pelo melanoma ( $p < 0,05$ ).

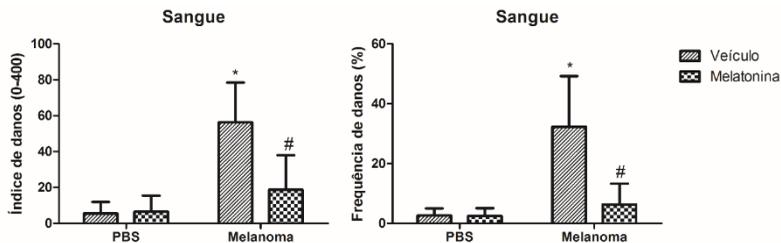


Figura 6: ID e FD no DNA em células de sangue de camundongos tratados com melatonina e submetidos ao modelo experimental de melanoma, avaliados através do Ensaio Cometa. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão (ANOVA duas vias, post hoc de Bonferroni).

\*Diferença significativa em relação ao grupo PBS + veículo ( $p < 0,05$ );

#Diferença significativa em relação ao grupo melanoma + veículo ( $p < 0,05$ ).

Nas células de pulmão (Figura 7) também pode-se observar que a melatonina não foi genotóxica tanto em ID quanto em FD, não apresentando valores que diferiram do grupo controle. Com relação ao grupo melanoma + veículo conclui-se que este foi genotóxico, ou seja, causou danos ao DNA dos camundongos submetidos ao modelo experimental de melanoma, quando comparado com o grupo PBS + veículo ( $p < 0,05$ ). Com relação à antigenotoxicidade, no pulmão, o grupo melanoma + melatonina não apresentou valores significativamente menores de danos em ambos os parâmetros avaliados ( $p > 0,05$ ) em relação ao grupo melanoma + veículo.

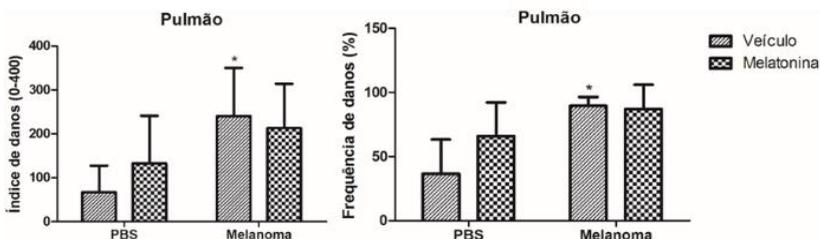


Figura 7: ID e FD no DNA em células de pulmão de camundongos tratados com melatonina e submetidos ao modelo experimental de melanoma, avaliados através do Ensaio Cometa. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão (ANOVA duas vias, post hoc de Bonferroni).

\*Diferença significativa em relação ao grupo PBS + veículo ( $p < 0,05$ ).

No fígado (Figura 8) a melatonina também não causou danos no DNA e o modelo experimental de melanoma foi genotóxico também neste órgão, ou seja, causou danos ao DNA dos camundongos submetidos ao modelo experimental de melanoma, quando comparado com o grupo PBS + veículo (ID e FD) ( $p < 0,05$ ). Já a melatonina se mostrou antigênóxica no parâmetro ID, revertendo significativamente os danos ocasionados pelo melanoma ( $p < 0,05$ ) no grupo melanoma + veículo.

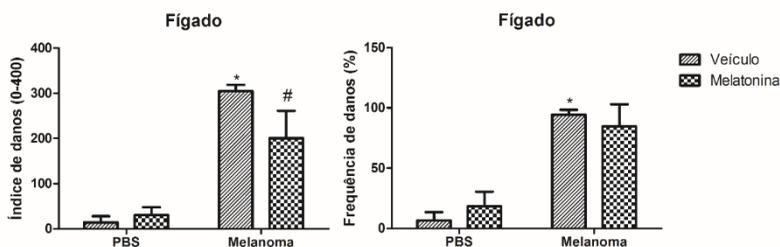


Figura 8: ID e FD no DNA em células de fígado de camundongos tratados com melatonina e submetidos ao modelo experimental de melanoma, avaliados através do Ensaio Cometa. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão (ANOVA duas vias, post hoc de Bonferroni).

\*Diferença significativa em relação ao grupo PBS + veículo ( $p < 0,05$ );

#Diferença significativa em relação ao grupo melanoma + veículo ( $p < 0,05$ ).

No ID e FD do córtex (Figura 9) os grupos PBS + veículo e PBS + melatonina foram semelhantes, não causando danos ao DNA das células de córtex. Já o grupo melanoma + veículo se mostrou genotóxico, apresentando valores mais elevados de ID do que os grupos PBS. Neste órgão, a melatonina foi capaz de reverter esses danos ( $p < 0,05$ ), mostrando uma diferença entre o grupo melanoma + melatonina e PBS + melatonina ( $p < 0,05$ ). Na FD não foram observadas diferenças significativas entre todos os grupos.

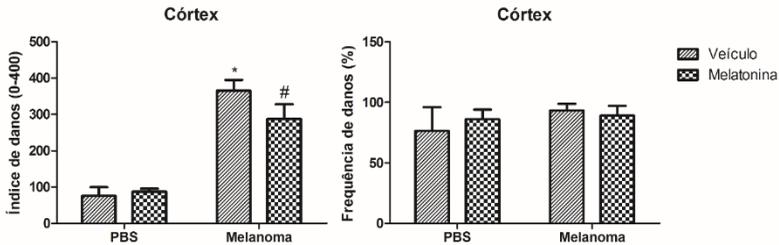


Figura 9: ID e FD no DNA em células de córtex de camundongos tratados com melatonina e submetidos ao modelo experimental de melanoma, avaliados através do Ensaio Cometa. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão (ANOVA duas vias, post hoc de Bonferroni).

\*Diferença significativa em relação ao grupo PBS + veículo ( $p < 0,05$ );

#Diferença significativa em relação ao grupo melanoma + veículo ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.2 Teste de Micronúcleo

Em relação à mutagenicidade, a Tabela 3 expressa o número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMn) em medula óssea dos camundongos machos C57BL/6 submetidos ao modelo de melanoma metastático. Assim, pode-se observar que o grupo melanoma apresentou diferença significativa no número de micronúcleos quando comparado com o grupo PBS + veículo ( $p < 0,05$ ) e a melatonina apresentou atividade antimutagênica reduzindo significativamente o número de MN no grupo melanoma + melatonina quando comparado ao grupo melanoma + veículo ( $p < 0,05$ ).

Tabela 3: Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMn) em medula óssea de camundongos submetidos a um modelo de melanoma metastático. Foram analisadas 2000 células por amostra e os dados são apresentados na tabela como média  $\pm$  desvio padrão.

<b><i>Tratamento</i></b>	<b><i>EPCMn</i></b>	<b><i>ENCMn</i></b>	<b><i>EPC/ENC</i></b>
<i>PBS + veículo</i>	0,67 $\pm$ 0,82	0,17 $\pm$ 0,41	0,56 $\pm$ 0,03
<i>Melanoma + veículo</i>	3,5 $\pm$ 2,38 <sup>a</sup>	2,3 $\pm$ 2,11 <sup>a</sup>	0,54 $\pm$ 0,08
<i>PBS + melatonina</i>	0,83 $\pm$ 0,75	0,5 $\pm$ 0,84	0,56 $\pm$ 0,05
<i>Melanoma + melatonina</i>	1,09 $\pm$ 0,89 <sup>b</sup>	0,45 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup>	0,48 $\pm$ 0,11

<sup>a</sup>Diferença significativa em relação ao grupo PBS + veículo ( $p < 0,05$ ); ANOVA duas vias, post hoc de Bonferroni;

<sup>b</sup>Diferença significativa em relação ao grupo melanoma + veículo ( $p < 0,05$ ); ANOVA duas vias, post hoc de Bonferroni.

## 5 DISCUSSÃO

A incidência global de melanoma continua a aumentar mais rapidamente do que qualquer outra malignidade. Apesar dos consideráveis esforços de pesquisa, não há terapia curativa disponível nos casos de melanoma metastático avançado (Segura et al., 2010), uma vez que este tipo de câncer é resistente a várias terapêuticas disponíveis. Assim, uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares que regem o desenvolvimento e a progressão do melanoma é de grande importância no desenvolvimento de melhores abordagens para o diagnóstico e tratamento deste câncer (Sun et al., 2014). Neste cenário, a melatonina surge como uma promessa por estar associada com a inibição do desenvolvimento de vários tipos de cânceres (Cutando et al., 2012), devido as suas propriedades antiproliferativas, anticancerígenas, antiinflamatórias e anti-angiogênicas (Lissoni, 2002).

No presente estudo, utilizou-se um modelo animal de câncer de pele do tipo melanoma, através da inoculação de células B16F10 na pata traseira direita de camundongos C57BL/6. As células de melanoma B16F10 são um modelo amplamente utilizado para estudar o câncer e agentes antitumorais, uma vez que essa linhagem celular é tipicamente maligna e invasiva (Chen et al., 2011). De fato, os resultados, mostraram que este modelo animal foi eficaz para induzir o tumor nos animais, onde os grupos controle PBS + veículo e PBS + melatonina foram diferentes significativamente dos grupos melanoma. O presente estudo corrobora com outras literaturas, como na pesquisa de Kim et al. (2013), onde também foi observado que as células B16F10 são eficazes em induzir o crescimento do tumor em camundongos Balb-c.

A evolução das células cancerosas em tumores metastáticos é a principal causa da morte em pacientes acometidos pelo câncer, mas os mecanismos subjacentes a essa mudança permanecem evasivos (Jia et al., 2010; Boregowda et al., 2014;). A metástase de células tumorais malignas do tumor primário para locais distantes é um processo complexo envolvendo adesão, migração e proliferação dos melanócitos (Ozawa et al., 2012). Os processos de metástase requerem a destruição da matriz extracelular (ECM) através de enzimas proteolíticas (Jeong et al., 2014). No estudo de Zhang et al. (2015) foram estudadas metástases em pulmão de camundongos fêmeas C57BL/6 com células de melanoma B16F10. Nos resultados foi possível observar que houve metástases após 23 dias da inoculação das células pela veia caudal. Este resultado não foi observado no presente estudo em pulmão, fígado e córtex. Uma hipótese para esta discrepância, é que no estudo de Zhang et al. (2015), eles

utilizaram  $5 \times 10^5$  células B16F10 para inocular nos animais, sendo que no presente estudo foram utilizados  $2 \times 10^5$  células/mL B16F10, seguindo o protocolo de Rigo et al. (2013), além disso, a injeção intravenosa na veia caudal lateral é o modelo mais utilizado para induzir metástases em modelos animais (Chirivi et al., 1994).

Com o intuito de confirmar se os animais ingeriram a melatonina, foi quantificado a sobra de líquidos, duas vezes por semana. Os resultados para esta análise se mostraram inconclusivos, uma vez que o grupo melanoma + melatonina ingeriu mais líquido que os demais grupos, sendo que na literatura não há outro trabalho que corrobore com este achado, uma vez que os artigos não apresentam os resultados de ingestão de líquidos.

Recentemente, descobriu-se que o próprio câncer e, provavelmente, seus estágios pré-cancerosos podem causar estresse em todo o organismo (Vodicka et al., 2010). Esse fato pode, então, levar a diferenças de sensibilidade a danos genotóxicos exógenos em células não relacionadas ao câncer, como em linfócitos periféricos, por exemplo (Najafzadeh et al., 2012). No estudo de Najafzadeh et al. (2012), eles observaram que o dano causado pela radiação UVA foi significativamente maior nos linfócitos de indivíduos com câncer ou estado de pré-câncer quando comparado a indivíduos saudáveis. Dessa forma, os resultados sugerem que as células que não estão próximas do câncer ou as lesões pré-cancerosas podem apresentar maiores danos intrínsecos, devido, por exemplo, ao aumento do estresse oxidativo e, portanto, são mais sensíveis aos danos genotóxicos (Najafzadeh et al., 2012). Nesse contexto, este trabalho avaliou os danos genotóxicos causados pelo modelo animal de melanoma, em sangue, fígado, pulmão, córtex, uma vez que são alvos de metástases deste câncer e também medula óssea, com o objetivo de avaliar a mutagenicidade/antimutagenicidade (Braeuer et al., 2014). Com isso, pode-se observar que houve danos ao DNA dos animais do grupo melanoma, quando comparado com o grupo controle em todos os órgão avaliados. Esses resultados demonstram que os tumores causam potenciais lesões ao DNA em tecidos distantes de onde o mesmo se originou. Além disso, sugere-se que uma fonte de inflamação persistente pode estar associada ao acúmulo de danos do DNA, uma vez que os camundongos foram submetidos à inflamação causada pelas células de melanoma, e que os animais injetados com PBS não apresentaram tal processo inflamatório não elevando assim os danos ao DNA em tecidos distantes (Redon et al., 2010).

Em estudo realizado por Shimabukuro et al. (2011), foi possível observar que o escore de danos ao DNA de 20 indivíduos com melanoma

foi maior que o grupo controle, resultado da instabilidade genômica frequentemente observada nas células tumorais de pacientes. Sendo que essa detecção precoce da instabilidade genômica em pacientes com melanoma é de grande importância para o tratamento e acompanhamento da doença. Outro estudo, conduzido por Abdullah e Orta (2012), avaliou que houve um aumento nas frequências de MN nos pacientes com melanoma maligno comparado aos indivíduos saudáveis, podendo isto estar associado à instabilidade genômica que leva à instabilidade cromossômica, fato este, que pode ser importante na indução e/ou manutenção de lesões que levam ao câncer.

O excessivo estado proliferativo de células cancerígenas é considerado uma propriedade fundamental desta patologia (Hanahan e Weinberg, 2011). A fim de alimentar um estado energeticamente abundante, as células cancerosas alteram suas vias metabólicas existentes para aumentar a entrega de nutrientes (DeBerardinis et al., 2008). A principal consequência da rápida divisão celular é o aumento dos subprodutos metabólicos que são prejudiciais, como a produção excessiva de ERO (Halliwell, 2007). Esse aumento de ERO eleva a capacidade proliferativa, efeitos anti-apoptóticos e o potencial metastático das células cancerosas através da sinalização autócrata resultando em um ambiente oxidativamente hostil dentro da célula (Loo, 2003; Mocellin et al., 2006). Além disso, alguns tipos de câncer, como o melanoma, possuem maneiras de criar um ambiente oxidativo no meio extracelular. No melanoma, os melanócitos tornam-se disfuncionais e poderosos distribuidores de radicais livres (Fruehauf e Trapp, 2008).

De fato, o estresse oxidativo está intimamente ligado ao câncer, e, como consequência, levando à instabilidade genômica e danos ao material genético das células (Poschke et al., 2011). Dessa forma, estudos anteriores têm se preocupado em relatar que a presença de um tumor, ou mesmo seus estágios iniciais, afetam um organismo como um todo, levando ao estresse oxidativo que produz dano sistêmico no DNA (Redon et al., 2010), como pode ser observado no presente estudo.

Há pacientes que possuem o reparo de dano ao DNA deficiente, estando mais propensos ao câncer. Vale ressaltar que a atividade de reparo do DNA pode não ser a mesma na célula normal e na célula tumoral para o mesmo paciente. Consequentemente, o nível de reparo do DNA no tumor pode modular as respostas a tratamentos antitumorais, como quimioterapia ou radioterapia, sendo que a menor atividade de reparo do DNA em células tumorais significa maior eficiência do tratamento antitumoral provavelmente através da indução da apoptose. Já uma maior eficácia no reparo do DNA em células tumorais pode originar tumores

resistentes e, provavelmente, toxicidade para células normais do paciente. No caso do melanoma, as células tumorais apresentam, infelizmente, resistência à maioria das drogas antitumorais (Bradbury e Middleton, 2004).

Nesse contexto, uma revisão sistemática recente de ensaios randomizados e controlados com humanos sugere que os suplementos antioxidantes podem resultar em aumento do tempo de sobrevivência do paciente, diminuir a toxicidade causada pelas terapias disponíveis e/ou inibir o desenvolvimento do tumor (Block et al., 2007). Dessa forma, foi avaliado o efeito genotóxico e o potencial efeito antígeno-tóxico da melatonina sobre os danos no DNA causados pelo melanoma neste estudo.

Como pode ser observado nas figuras 5, 6, 7 e 8, em nenhum dos tecidos analisados a melatonina se mostrou genotóxica ou mutagênica (Tabela 3), permanecendo semelhante ao grupo controle PBS + veículo. Nosso resultado vai de encontro à literatura, como no estudo de Ferreira et al. (2013), onde estes investigaram os potenciais danos ao DNA que a melatonina poderia causar. Para tanto, eles utilizaram ratos pinealectomizados, ou seja, a glândula pineal foi extraída e os mesmos foram suplementados com 1 mg/kg de melatonina no período noturno, durante 15 dias, disponibilizada na água de beber. Com relação aos resultados, eles puderam observar que a melatonina não causou danos ao DNA no sangue dos ratos, assim como o grupo controle. Já os animais que tiveram a retirada da sua glândula pineal, estes tiveram danos significativamente diferentes dos grupos controle e melatonina. Quando esses animais foram suplementados com o hormônio, este foi eficaz em diminuir os danos ao material genético. Dessa forma, o tratamento com melatonina dá suporte para determinar os inegáveis efeitos protetores do hormônio da glândula pineal contra o dano induzido pelo DNA (Ferreira et al, 2013).

Tendo em vista que no presente estudo a melatonina foi capaz de reverter os danos ocasionados pelo câncer do tipo melanoma no tecido sanguíneo, fígado, córtex e medula óssea, pode-se dizer que ela tem potencial efeito antígeno-tóxico e antimutagênico.

No estudo conduzido por Kim et al. (2015), foi avaliado o efeito da melatonina e seus metabólitos, 6-hidroxi-melatonina, N1-acetil-N2-formil-5-metoxicinuramina e 5-metoxitriptamina, em diferentes raças, idades e sexo, sobre a proliferação e melanogênese em melanócitos saudáveis em comparação com células de melanoma humano. Como resultados, os autores puderam observar que embora a produção endógena de melatonina e seus metabólitos seja dependente da demografia dos

indivíduos, todos os metabólitos inibiram a proliferação das células de melanoma.

Outros estudos com animais demonstraram que a melatonina foi capaz de inibir o desenvolvimento de carcinogênese mamária induzida quimicamente. Foram realizadas análises *in vitro* utilizando linhagens celulares de câncer de mama, tais como MCF-7, para investigar os efeitos da melatonina no crescimento celular, síntese de DNA e ciclo celular (Cos et al., 2002; Cos et al., 2006). O papel da melatonina nas vias de reparo do DNA também foi documentado recentemente em um estudo que mostrou um efeito protetor da melatonina contra o dano oxidativo ao DNA, causado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sliwinski et al., 2008).

Ainda no estudo de Ferreira et al. (2013), os ratos pinealectomizados foram submetidos a uma injeção de 50 mg/kg de ciclofosfamida (CP), um dos agentes antitumorais mais utilizados na prática clínica, considerado um agente alquilante. Com isso, eles obtiveram bons resultados no que se refere à antigenotoxicidade, pois a melatonina diminuiu os danos ocasionados pela CP.

No estudo de Ünder et al (2004) foi avaliado o efeito da melatonina sobre a radiação ionizante em cérebro de animais previamente irradiados. Dessa forma, eles puderam observar que o grupo irradiado teve altos níveis de danos no DNA, sendo diferente significativamente do grupo controle, e no grupo irradiado + melatonina, esta foi capaz de diminuir os danos, permanecendo semelhante ao grupo controle sem irradiação.

A diversidade e a complexidade dos efeitos da melatonina estão relacionadas à característica única deste hormônio e seus receptores. A melatonina é uma molécula pequena e altamente lipofílica que pode atravessar a membrana celular e exercer parte de seus efeitos mesmo na ausência de receptores, através de seus efeitos antioxidantes, atuando como eliminadora de radicais livres, estimulando a atividade da glutatona peroxidase (Witt-Enderby et al., 2003). Já o efeito anticarcinogênico da melatonina está relacionado com os receptores de membrana, MT1 e MT2, pertencentes a grande família de receptores acoplados à proteína G, dessa forma, ela exerce seus efeitos de forma direta (Chan et al., 2003; Ho et al., 2001).

No estudo de Blask et al. (2002) foi demonstrado que nas células do carcinoma hepatocelular, a melatonina inibe através de processos mediados por seus receptores de membrana, a absorção e o metabolismo dos ácidos graxos, incluindo o ácido linoleico, importante para o crescimento tumoral deste tipo de câncer, e a sua conversão para a molécula de sinalização mitogênica 13-hidroxi-octadecadienóico (Sauer et al., 1999).

Além de sua capacidade de modificar o crescimento do tumor através da alteração no metabolismo do ácido linoléico, a melatonina pode possuir outros meios para limitar a sobrevivência das células cancerígenas. Leon-Blanco et al. (2003) relataram que a melatonina inibe a atividade da telomerase na linhagem celular de câncer de mama MCF-7, sendo que a telomerase é uma proteína responsável por estender os telômeros de cromossomos eucarióticos, uma vez que esta proteína perde sua função com o envelhecimento celular nas células saudáveis. Essas extensões físicas desempenham um papel fundamental na manutenção da integridade e estabilidade da estrutura cromossômica; na sua ausência, os cromossomos tornam-se instáveis e as células morrem. Contudo, as células cancerígenas possuem a atividade da telomerase aumentada, o que dificulta a apoptose das mesmas (Leon-Blanco et al., 2003).

Interessantemente, no presente estudo, não foi observado o efeito antígeno-tóxico da melatonina no tecido pulmonar. Considerando que o pulmão é o órgão mais comum para a ocorrência de metástases no melanoma (Han et al., 2013; Langley e Fidler, 2007), pode-se acreditar que provavelmente a melatonina está induzindo a apoptose das células cancerígenas, resultado este que não é detectado pelo Ensaio Cometa (Collins, 2004). No estudo de Bonmati-Carrion et al. (2013), eles relataram que baixas concentrações de melatonina ( $10^{-9}$  a  $10^{-5}$  M) reduziram consideravelmente a viabilidade em células de melanoma B164A5 in vitro. Este efeito demonstrou estar associado a um aumento da produção de ERO, que acredita-se estar relacionada com a ativação da via apoptótica (Bejarano et al., 2014). Outros estudos in vitro relatam que a melatonina reduziu a viabilidade celular de células B16 de melanoma, mesmo em concentrações nanomolares (Radogna et al., 2006).

Kilic et al. (2004) em seu estudo relacionado à angiogênese de células cancerígenas, observaram uma inibição da síntese de endotelina-1 (ET-1) pela melatonina. A ET-1 é um potente vasoconstritor e tem sido relacionada à regulação do desenvolvimento do câncer. Este vasoconstritor está elevado no plasma de pacientes com vários tumores sólidos e atua como um poderoso mitógeno, especialmente em cânceres de células epiteliais (Grant et al., 2003). Além disso, a ET-1 protege as células cancerígenas de sofrer apoptose e promover a angiogênese em tumores, estimulando a proliferação de células endoteliais. Kilic et al. (2004) supõem que a melatonina inibe não só enzima que forma ET-1 nas células saudáveis, mas também nas células cancerígenas, podendo proporcionar um mecanismo de proteção adicional pelo qual a melatonina aumenta a apoptose das células cancerígenas e suprime o crescimento tumoral (Sainz et al., 2003).

De uma forma geral a melatonina apresentou efeitos benéficos nos animais submetidos ao modelo de câncer de pele melanoma, tanto efeitos antígenotóxicos quanto antimutagênicos, efeitos estes que se devem ao fato da melatonina apresentar propriedades antioxidantes.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo forneceu evidências de que este modelo animal de câncer de melanoma é eficaz ao induzir genotoxicidade e mutagenicidade e também é útil para avaliar os potenciais efeitos antígenotóxicos e/ou antimutagênicos de diferentes antioxidantes, principalmente nos principais órgãos de metástase deste câncer, sendo eles: fígado, pulmão e cérebro. A melatonina apresentou efeito antígenotóxico e antimutagênico nos principais órgãos de metástase deste tipo de câncer, com exceção do tecido pulmonar, sendo que a hipótese levantada para isso seria que a melatonina está levando as células cancerígenas à apoptose, efeito este que não foi detectado nos testes utilizados.

Em suma, os resultados sugerem que a melatonina pode ser um bom antioxidante usado na atenuação dos efeitos causados pelo melanoma. No entanto, mais estudos são necessários a fim de confirmar o potencial efeito deste hormônio.

## **7 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS**

### **7.1 LIMITAÇÕES**

Para o controle do melanoma poderiam ser utilizados células normais de fibroblastos, no entanto como estamos observando danos ao DNA, qualquer meio externo que não seja compatível com o organismo dos animais utilizados, já é o suficiente para elevar os danos à essa macromolécula.

### **7.2 PERSPECTIVAS**

As perspectivas para concluir o presente estudo incluem a análise de p53, pois está altamente presente nos cânceres; NRF2, pois é uma via que a melatonina está bastante envolvida, levando a produção de uma enzima antioxidante, glutatona, por meio da técnica de Western Blotting. Além disso, também seria de grande valia realizar testes relacionados à apoptose, para sustentar cientificamente a hipótese levantada neste trabalho e a histologia do tumor para confirmar o desenvolvimento do mesmo.

## REFERÊNCIAS

Abdullah N, Orta T. Relationship between Malignant Melanoma and Chromosome Damage in Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13:5229-5232.

Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ. Extraneural melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(16):2997–3025.

American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2015.* Atlanta: American Cancer Society; 2015.

American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2017.* Atlanta: American Cancer Society; 2017.

Anisimov VN, Alimova IN, Baturin DA, Popovich IG, Zabezhinski MA, Rosenfeld SV, Manton KG, Semenchenko AV, Yashin AI. Dose-dependent effect of melatonin on life span and spontaneous tumor incidence in female SHR mice. *Exp Gerontol.* 2003;38(4):449-461.

Balch CM1, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *J Clin Oncol.* 2009;27(36):6199-6206.

Bald T, Quast T, Landsberg J, Rogava M, Glodde N, Lopez-Ramos D, Kohlmeyer J, Riesenberger S, Boorn-Konijnenberg D, Hömig-Hölzel C, Reuten R, Schadow B, Weighardt H, Wenzel D, Helfrich I, Schadendorf D, Bloch W, Bianchi ME, Lugassy C, Barnhill RL, Koch M, Fleischmann BK, Förster I, Kastenmüller W, Kolanus W, Hölzel M, Gaffal E, Tüting T. Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiogenesis and metastasis in melanoma. *Nature.* 2014;507:109-113.

Bannin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science.* 1998;281:1674-1679.

Bejarano I, Monllor F, Marchena AM, Ortiz A, Lozano G, Jimenez MI, Gaspar P, García JF, Pariente JA, Rodríguez AB, Espino J. Exogenous melatonin supplementation prevents oxidative stress-evoked DNA damage in human spermatozoa. *J. Pineal Res.* 2014;57:333–339.

Bizzarri M, Proietti S, Cucina A, Reiter RJ. Molecular mechanisms of the pro-apoptotic actions of melatonin in cancer: a review. *Expert Opin Ther Targets.* 2013;17:1483–1496.

Blask DE, Dauchy RT, Sauer LA. Putting cancer to sleep at night: the neuroendocrine/circadian melatonin signal. *Endocrine.* 2005;27(2):179–188.

Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT. Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian based cancer therapy. *Curr Top Med Chem.* 2002;2:113–132.

Block KI, Koch AC, Mead MN, Tothy PK, Newman RA, Gyllenhaal C. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic efficacy: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *Cancer Treat Rev.* 2007;33:407–418.

Bobek V, Kolostova K, Pinterova D, Kacprzak G, Adamiak J, Kolodziej J, Boubelik M, Kubecova M, Hoffman RM. A Clinically Relevant, Syngeneic Model of Spontaneous, Highly Metastatic B16 Mouse Melanoma. *Anticancer Res.* 2010;30: 4799-4804.

Bollag G, Hirth P, Tsai J, Zhang J, Ibrahim PN, Cho H, Spevak W, Zhang C, Zhang Y, Habets G, Burton EA, Wong B, Tsang G, West BL, Powell B, Shellooe R, Marimuthu A, Nguyen H, Zhang KYJ, Artis DR, Schlessinger J, Su F, Higgins B, Iyer R, D'Andrea K, Koehler A, Stumm M, Lin PS, Lee RJ, Grippo J, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, Chapman PB, Flaherty KT, Xu X, Nathanson KL, Nolop K. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature.* 2010;467:596-599.

Bonmati-Carrion MA, Alvarez-Sánchez N, Hardeland R, Madrid JA, Rol MA. A Comparison of B16 melanoma cells and 3T3 fibroblasts concerning cell viability and ROS production in the presence of

melatonin, tested over a wide range of concentrations. *Int J Mol Sci.* 2013;14:3901-3920.

Bonnefont-Rousselot D, Collin F. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology.* 2010;278(1):55–67.

Boregowda RK, Olabisi OO, Abushahba W, Jeong BS, Haenssen KK, Chen W, Chekmareva M, Lasfar A, Foran DJ, Goydos JS, Cohen-Solal KA. RUNX2 is overexpressed in melanoma cells and mediates their migration and invasion. *Cancer Lett.* 2014;348:61-70.

Bradbury PA, Middleton MR. DNA repair pathways in drug resistance in melanoma. *Anti-Cancer Drugs.* 2004;15(5):421-426.

Braeuer RR, Watson IR, Wu CJ, Mobley AK, Kamiya T, Shoshan E, Bar-Eli M. Why is melanoma so metastatic? *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014;27(1):19-36.

Brychtova S, Bezdekova M, Hirnak J, Sedlakova E, Tichy M, Brychta T. Stromal microenvironment alterations in malignant melanoma. In: Murph M. *Research on melanoma: A glimpse into current directions and future trends.* Rijeka, Croatia: InTech. 2011:335-360.

Cadet J, Douki T. Oxidatively Generated Damage to DNA by UVA Radiation in Cells and Human Skin. *J Invest Dermatol.* 2011;131(5):1005-1007.

Cao H, Chu J, Kwan H, Su T, Yu H, Cheng C, Fu X, Guo H, Li T, Tse AK, Chou G, Huan-Biao Mo H, Yu Z. Inhibition of the STAT3 signaling pathway contributes to apigenin-mediated anti-metastatic effect in melanoma. *Sci Rep.* 2016;6: 21731.

Caramel J, Papadogeorgakis E, Hill L, Browne GJ, Richard G, Wierinckx A, Saldanha G, Osborne J, Hutchinson P, Tse G, Lachuer J, Puisieux A, Pringle JH, Ansieau S, Tulchinsky E. A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell.* 2013;24(4):466-480.

Chan AS, Lai FP, Lo RK, Voyno-Yasenetskaya TA, Stanbridge EJ, Wong YH. Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase

via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal.* 2003;14:249-257.

Chang YM, Chang YM, Barrett JH, Bishop DT, Armstrong BK, Bataille V, Bergman W, Berwick M, Bracci PM, Elwood JM, Ernstoff MS, Gallagher RP, Green AC, Gruis NA, Holly EA, Ingvar C, Kanetsky PA, Karagas MR, Lee TK, Le Marchand L, Mackie RM, Olsson H, Østerlind A, Rebbeck TR, Sasieni P, Siskind V, Swerdlow AJ, Titus-Ernstoff L, Zens MS, Newton-Bishop JA.. Sun exposure and melanoma risk at different latitudes: a pooled analysis of 5700 cases and 7216 controls. *Int J Epidemiol.* 2009;38(3):814–830.

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011;364: 2507–2516.

Chen W, Lu Y, Wu J, Gao M, Wang A, Xu B. Beta-elemene inhibits melanoma growth and metastasis via suppressing vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2011;67:799–808.

Chirivi RG, Garofalo A, Crimmin MJ, Bawden LJ, Stoppacciaro A, Brown PD, Giavazzi R. Inhibition of the metastatic spread and growth of B16-BL6 murine melanoma by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Int J Cancer.* 1994;58: 460-464.

Collins AR, Dobson VL, Dusinskáb M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res.* 1997;375(2):183-193. Collins AR. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. 2004;26:249-261.

Corrales A, Vidal R, García S, Vidal V, Martínez P, García E, Flórez J, Sanchez-Barceló EJ, Martínez-Cué C, Rueda N. Chronic melatonin treatment rescues electrophysiological and neuromorphological deficits in a mouse model of Down syndrome. *J Pineal Res.* 2014;56(1):51-61.

Cos S, Gonzalez A, Guezmes A, Mediavilla MD, Martinez-Campa C, AlonsoGonzalez C, Sanchez-Barcelo EJ: Melatonin inhibits the growth of DMBAinduced mammary tumors by decreasing the local biosynthesis of estrogens through the modulation of aromatase activity. *Int J Cancer*. 2006; 118:274–278.

Cos S, Mediavilla MD, Fernandez R, Gonzalez-Lamuno D, Sanchez-Barcelo EJ: Does melatonin induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells in vitro? *J Pineal Res*. 2002;32:90–96.

Cos S, Sánchez-Barceló EJ. Melatonin and mammary pathological growth. *Front Neuroendocrinol*. 2000;21(2):133–170.

Cutando A, Lopez-Valverde A, Arias-Santiago S, Vicente J, Diego RG. Role of melatonin in cancer treatment. *Anticancer Res*. 2012;32(7):2747–2753.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Hingorani SR, Jacobetz MA, Robertson GP, Herlyn M, Tuveson DA. Suppression of BRAF (V599E) in human melanoma abrogates transformation. *Cancer Res*. 2003;63(17):5198–5202.

DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatziasiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*. 2008;7:11–20.

Eiberger W, Volkmer B, Amouroux R, Dhérin C, Radicella JP, Epe B. Oxidative stress impairs the repair of oxidative DNA base modifications in human skin fibroblasts and melanoma cells. *DNA Repair*. 2008;7(6):912–921.

El Ghissassi F, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Bouvard V, Bengrahim-Talla L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Cogliano V. A review of human carcinogens — part D: radiation. *Lancet Oncol*. 2009;10(8):51–52.

El-Missiry MA, Fayed TA, El-Sawy MR, El-Sayed AA. Ameliorative effect of melatonin against gamma-irradiation-induced oxidative stress and tissue injury *Ecotoxicol Environ Saf.* 2007;66(2):278-286.

Fernández-Mar MI, Mateos R, García-Parrilla MC, Puertas B, Cantos-Villar E. Bioactive compounds in wine: resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: a review. *Food Chem.* 2012;130(4):797–813.

Ferreira SG, Peliciari-Garcia RA, Takahashi-Hyodo SA, Rodrigues AC, Amaral FG, Berra CM, Bordin S, Curi R, Cipolla-Neto J. Effects of melatonin on DNA damage induced by cyclophosphamide in rats. *Bra Jou Med Bio Res.* 2013;46(3):278-286.

Friedman RJ, Farber MJ, Warycha MA, Papathasis N, Miller MK, Heilman ER. The dysplastic nevus. *Clin Dermatol.* 2009;27(1):103-115. Fruehauf JP, Trapp V. Reactive oxygen species: an Achilles' heel of melanoma? *Expert Rev Anticancer Ther.* 2008;8:1751–1757.

Galano A, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin as a naturally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res.* 2011;51(1):1–16.

Galano A, Tan DX, Reiter RJ. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J Pineal Res.* 2013;54(3):245–257.

Gariyban L, Fisher DE. How sunlight causes melanoma. *Curr Oncol Rep.* 2010;12:319-326.

Gazi S, Altun A, Erdogan O. Contrast-induced nephropathy: preventive and protective effects of melatonin. *J Pineal Res.* 2006;41(1):53-57.

Gembarska A1, Luciani F, Fedele C, Russell EA, Dewaele M, Villar S, Zwolinska A, Haupt S, de Lange J, Yip D, Goydos J, Haigh JJ, Haupt Y, Larue L, Jochemsen A, Shi H, Moriceau G, Lo RS, Ghanem G, Shackleton M, Bernal F, Marine JC. MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nat Med.* 2012;18(8):1239-1247.

Godar DE. Worldwide increasing incidences of cutaneous malignant melanoma. *J Skin Cancer.* 2011.

Gordon, R. Skin cancer: An overview of epidemiology and risk factors. *Semin Oncol Nurs*. 2013;29(3):160–169.

Grant K, Loizidon M, Taylor I. Endothelin-1: a multifunctional molecule in cancer. *Br J Cancer*. 2003;88:163–166.

Greinert R. Skin cancer: new markers for better prevention. *Pathobiology*. 2009;76(2):64–81.

Hager KM, Gu W. Understanding the non-canonical pathways involved in p53-mediated tumor suppression. *Carcinogenesis* 2014;35:740–746.

Hair JM, Terzoudi GI, Hatzi VI, Lehockey KA, Srivastava D, Wang W, Pantelias GE, Georgakilas AG. BRCA1 role in the mitigation of radiotoxicity and chromosomal instability through repair of clustered DNA lesions. *Chem Biol Interact*. 2010;188:350–358.

Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J*. 2007;401:1–11.

Han M, Xu J, Bi Y, Jiang M, Xu X, Liu Q and Jia J. Primary tumor regulates the pulmonary microenvironment in melanoma carcinoma model and facilitates lung metastasis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013;139(1):57-65.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 44:646–674.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57–70.

Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:193-204.

Ho AW, Tsao H. Targeted therapies in melanoma: Translational research at its finest. *J Invest Dermatol*. 2015;135:1929-1933.

Ho MK, Yung LY, Chan JS, Chan JH, Wong CS, Wong YH. Galpha(14) links a variety of G(i)- and G(s)-coupled receptors to the stimulation of phospholipase C. *Br J Pharmacol*. 2001;132:1431-1440.

Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, Van Den Eertwegh AJM, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363:711-723.

INCA - Instituto Nacional do Câncer (BR): Consenso acional de nutrição oncológica. Capítulo 4- Paciente Pediátrico em Cuidados Paliativos. 2009. p.100.

INCA - Instituto Nacional do Câncer (BR). Declaração mundial contra o câncer. 2016a.. Disponível em: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoos\\_programas/site/home/internacional/declaracao\\_mundial\\_contra\\_cancer/assembleia\\_geral\\_onu](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoos_programas/site/home/internacional/declaracao_mundial_contra_cancer/assembleia_geral_onu). Acesso em: 10 de março de 2017.

INCA - Instituto Nacional do Câncer (BR). ESTIMATIVA 2016: Incidência de Câncer no Brasil. 2016b. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>. Acesso em 1 de fevereiro de 2017.

Jeong YJ, Choi Y, Shin JM, Cho HJ, Kang JH, Park KK, Choe JY, Bae YS, Han SM, Kim CH, Chang HW, Chang YC. Melittin suppresses EGF-induced cell motility and invasion by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in breast cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 2014;68:218-225.

Jia D, Yan M, Wang X, Hao X, Liang L, Liu L, Kong H, He x, Li J, Yao M. Development of a highly metastatic model that reveals a crucial role of fibronectin in lung cancer cell migration and invasion. *BMC Cancer.* 2010;10:364.

Jochemsen AG. Reactivation of p53 as therapeutic intervention for malignant melanoma. *Curr Opin Oncol* 2014;26:114–119.

Jung B, Ahmad N. Melatonin in cancer management: progress and promise. *Cancer Res.* 2006;66:9789–9793.

Kilic E, Kilic U, Reiter RJ, Bassetti CL, Hermann DM. Prophylactic use of melatonin protects against focal cerebral ischemia in mice: role of endothelin converting enzyme-1. *J Pineal Res.* 2004;37:247-251.

Kim KN, Ahnb G, Heoc SJ, Kangd SM, Kangd MC, Yanga HM, Kima D, Woon S, Kime SK, Jeonf BT, Parkg PJ, Jungh WK, Jeonb YJ. Inhibition of tumor growth in vitro and in vivo by fucoxanthin against melanoma B16F10 cells. 2013;35(1):39-46.

Kim TK, Lin Z, Tidwell WJ, Li W, Slominski AT. Melatonin and its metabolites accumulate in the human epidermis in vivo and inhibit proliferation and tyrosinase activity in epidermal melanocytes in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;404:1–8.

Kirkwood JM, Bastholt L, Robert C, Sosman J, Larkin J, Hersey P, Middleton M, Cantarini M, Zazulina V, Kemsley K, Dummer R. Phase II, open-label, randomized trial of the MEK1/2 inhibitor selumetinib as monotherapy vs temozolomide in patients with advanced melanoma. *Clin Cancer Res.* 2012;18:555–567.

Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res.* 2000;455(1-2):155-166.

Lacoste B, Angeloni D, Dominguez-Lopez S, Calderoni S, Mauro A, Frascini F, Descarries L, Gobbi G. Anatomical and cellular localization of melatonin MT1 and MT2 receptors in the adult rat brain. *J Pineal Res.* 2015;58:397–417.

Langley RR, Fidler IJ. Tumor cell–organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr Rev.* 2007;28(3):297-321.

Lee KW, Lee HJ. Biphasic effects of dietary antioxidants on oxidative stress-mediated carcinogenesis. *Mech Ageing Dev.* 2006;127(5):424–431.

Lehmann AR, McGibbon D, Stefanini M. Xeroderma pigmentosum. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:70.

Leiter U, Eigentler T, Garbe C. Epidemiology of skin cancer. In: Reichrath J. Sunlight, vitamin D and skin cancer. 2<sup>a</sup> ed (Springer). Nova York: Springer; 2014. p.120-140.

Leon-Blanco MM, Guerrero JM, Reiter RJ, Calvo JR, Pozo D. Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro. *J Pineal Res.* 2003;35(3):204–211.

Leon-Blanco MM, Guerrero JM, Reiter RJ, Calvo JR, Pozo D. Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro. *J Pineal Res.* 2003;35:204–211.

Li DY, Smith DG, Hardeland R, Yang MY, Xu HL, Zhang L, Yin HD, Zhu Q. Melatonin receptor genes in vertebrates. *Int J Mol Sci.* 2013;14(6):11208-11223.

Li FZ, Dhillon AS, Anderson RL, McArthur G, Ferrao PT. Phenotype switching in melanoma: implications for progression and therapy. *Front Oncol.* 2015;5:33.

Li H, Fan X, Houghton J. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem.* 2007;101(4):805–815.

Lialiaris T, Lyratzopoulos E, Papachristou F, Simopoulou M, Mourelatos C, Nikolettos N. Supplementation of melatonin protects human lymphocytes in vitro from the genotoxic activity of melphalan. *Mutagenesis.* 2008;23(5):347-354.

Lissoni P, Rovelli F, Malugani F, Bucovec R, Conti A, Maestroni GJM. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuro Endocrinol Lett.* 2001;22:45–47.

Lissoni P. Is there a role for melatonin in supportive care? *Support Care Cancer.* 2002;10(2):110–116.

Lissoni P. Modulation of anticancer cytokines IL–2 and IL–12 by melatonin and the other pineal indoles 5–methoxytryptamine and 5–methoxytryptophol in the treatment of human neoplasms. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2000;917:560–567.

Liu R, Fu A, Hoffman AE, Zheng T, Zhu Y. Melatonin enhances DNA repair capacity possibly by affecting genes involved in DNA damage responsive pathways. *BMC Cell Biology*. 2013;14:1.

Lo JA, Fisher DE. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science*. 2014;346:945–949.

Loo G. Redox-sensitive mechanisms of phytochemical mediated inhibition of cancer cell proliferation (review). *J Nutr Biochem*. 2003;14:64–73.

Ma Z, Yang Y, Fan C, Han J, Wang D, Di S, Hu W, Liu D, Li X, Reiter RJ, Yan X. Melatonin as a potential anticarcinogen for non-small-Cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016;7:46768–46784.

Madan V, Lear JT, Szeimies RM. Non-melanoma skin cancer. *Lancet*. 2010;375(9715):673–685.

Markovic SN, Erickson LA, Rao LD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, Vachon CM, Schild SE, McWilliams RR, Hand JL, Laman SD, Kottschade LA, Maples WJ, Pittelkow MR, Pulido JS, Cameron JD, Creagan ET. Malignant melanoma in the 21st century, part I: Epidemiology, risk factors, screening, prevention and diagnosis. *Mayo Clin Proc*. 2007;82(3):364-380.

Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, González-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res*. 2013;54(1):1-14.

Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res*. 1990;239(1):29-80.

Mediavilla MD, Sanchez-Barcelo EJ, Tan DX, Manchester L, Reiter RJ. Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr Med Chem*. 2010;17:4462–4481.

Meier F, Busch S, Lasithiotakis K, Kulms C, Garbe C, Maczey E, Herlyn M, Schittek B. Combined targeting of MAPK and AKT signaling

pathways is a promising strategy for melanoma treatment. *Br J Dermatol.* 2007;156:1204-1213.

Merril SJ, Ashrafi S, Subramanian M, Godar DE. Exponentially increasing incidences of cutaneous malignant melanoma in Europe correlate with low personal annual UV doses and suggests two major risk factors. *Dermatoendocrinol.* 2015;7(1):e1004018.

Michèle TM, Adeline V, Jolyon HH. Human epidermal stem cells: Role in adverse skin reactions and carcinogenesis from radiation. *Mutat Res - Rev Mutat.* 2016;770:349-368.

Mocellin S, Hoon D, Ambrosi A, Nitti D, Rossi CR. The prognostic value of circulating tumor cells in patients with melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Clin Cancer Res.* 2006;12:4605-4613.

Munger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM (1992) Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. *Cancer Surv* 12: 197-217.

Najafzadeh M, Baumgartner A, Gopalan R, Davies JB, Wright A, Reynolds PD, Anderson D. In vitro sensitivities to UVA of lymphocytes from patients with colon and melanoma cancers and precancerous states in the micronucleus and the Comet assays. *Mutagenesis.* 2012;27(3):351-357.

Nelson AA, Tsao H. Melanoma and genetics. *Clin Dermatol.* 2009;27(1):46-52.

Nikolaou V, Stratigos AJ. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. *Br J Dermatol.* 2014;170(1):11-19.

Nishigori C, Hattori Y, Toyokuni S. Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal.* 2004;6(3):561-570.

Ozawa H, Sonoda Y, Kato S, Suzuki E, Matsuoka R, Kanaya T, Kiuchi F, Hada N, Kasahara T. Sulfatides inhibit adhesion, migration, and invasion of murine melanoma B16F10 cell line in vitro. *Biol Pharm Bull.* 2012;35:2054-2058.

- Poschke I, Mougiakakos D, Kiessling R. Camouflage and sabotage: tumor escape from the immune system. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*. 2011;60:1161–1171.
- Poste G. Surface molecules and tumour-cell metastatic properties. *Biochem Soc Trans*. 1980;8(6):695-697.
- Pourquier P, Robert J. General overview on DNA repair. *Bull Cancer*. 2011;98(3):229–237.
- Qi W, Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Siu AW, Garcia JJ. Increased level of oxidatively damaged DNA induced by chromium (III) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: protection by melatonin and related molecules. *J Pineal Res*. 2001;29(1):54-61.
- Radogna F, Paternoster L, Albertini MC, Accorsi A, Cerella C, D'Alessio M, De Nicola M, Nuccitelli S, Magrini A, Bergamaschi A, Ghibelli L. Melatonin as an apoptosis antagonist. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1090:226-233.
- Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Kareva IG, Naf D, Newsheer S, Kryston TB, Bonner WM, Georgakilas AG, Sedelnikova OA. Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:17992–17997.
- Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res*. 2010;181:127–151.
- Reiter RJ, Tan DX, Galano A. Melatonin: exceeding expectations. *Physiology (Bethesda)*. 2014;29:325–333.
- Reiter RJ, Tan DX, Maldonado MD. Melatonin as an antioxidant: physiology versus pharmacology. *J Pineal Res*. 2005;39:215-216.
- Reiter RJ, Tan DX, Osuno C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: A review. *J Biomed Sci*. 2000;7(6):444-458.
- Reiter RJ, Tan DX, Sainz RM, Mayo JC, Lopez-Burillo S. Melatonin reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *J Pharm Pharmacol*. 2002;54(10):1299–1321.

Reiter RJ. Mechanisms of cancer inhibition by melatonin. *J Pineal Res.* 2004;37:213–214.

Ries LA, Wingo PA, Miller DS, Howe HL, Weir HK, Rosenberg HM, Vernon SW, Cronin K, Edwards BK. The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer. *Cancer.* 2000;88:2398-2424.

Rigo FK, Trevisan G, Rosa F, Dalmolin GD, Otuki MF, Cueto AP, de Castro Junior CJ, Romano-Silva MA, Cordeiro Mdo N, Richardson M, Ferreira J, Gomez MV. Spider peptide Ph $\alpha$ 1 $\beta$  induces analgesic effect in a model of cancer pain. *Cancer Sci.* 2013;104:1226-1230.

Sainz RM, Mayo JC, Rodriguez C, Tan DX, LopezBurillo S, Reiter RJ. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60:1407–1426.

Sander CS, Chang H, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int J Dermatol.* 2004;43(5):326–335.

Sasamura T, Nakamura S, Iida Y, Suji H, Murata J, Saiki I, Nojima H, Kuraishi Y. Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation. *Eur J Pharmacol.* 2003;441(3):185-191.

Sasse AD, Sasse EC, Clark LG, Ulloa L, Clark OA. Chemoimmunotherapy versus chemotherapy for metastatic malignant melanoma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007(1):Cd005413.

Sauer LA, Dauchy RT, Blask DE, Armstrong BJ, Scalici S. 13-Hydroxydecadienoic acid is a mitogenic signal for linoleic acid-dependent growth in rat hepatomas 7288 CTC in vivo. *Cancer Res.* 1999;59:4688–4692.

Seely D, Wu P, Fritz H, Kennedy DA, Tsui T, Seely AJE, Mills E. Melatonin as Adjuvant Cancer Care With and Without Chemotherapy: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Trials. *Integr Cancer Ther.* 2012;11(4):293.

Segura MF, Belitskaya-Levy I, Rose AE, Zakrzewski J, Gaziel A, Hanniford D, Darvishian F, Berman RS, Shapiro RL, Pavlick AC, Osman I, Hernando E. Melanoma microRNA signature predicts post-recurrence survival. *Clin Cancer Res.* 2010;16:1577–1586.

Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:731–737.

Shimabukuro F, Cyro Neto F, Sanches Jr JÁ, Gattás GJF. DNA damage and repair in leukocytes of melanoma patients exposed in vitro to cisplatin. *Melanoma Res.* 2011;21;(2):99-105.

Shirazi A, Mihandoost E, Ghobadi G, Mohseni M, Ghazi-Khansar M. Evaluation of radio-protective effect of melatonin on whole body irradiation induced liver tissue damage. *Cell.* 2013;14(4):294–297.

Shokrzadeh M, Naghshvar F, Ahmadi A, Chabra A, Jeivad D. The potential ameliorative effects of melatonin against cyclophosphamide-induced DNA damage in murine bone marrow cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18:605-611.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics. *Cancer J Clin.* 2013;63(1):11–30.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175(1):184-191.

Situm M, Buljan M, Bulić SO, Simić D. The mechanisms of UV radiation in the development of malignant melanoma. *Coll Antropol.* 2007;31(1):13-16.

Skene DJ, Arendt J. Human circadian rhythms: physiological and therapeutic relevance of light and melatonin. *Ann Clin Biochem.* 2006;43(5):344–353.

Sliwinski T, Rozej W, Morawiec-Bajda A, Morawiec Z, Reiter R, Blasiak J. Protective Action Of Melatonin Against Oxidative Dna Damage —Chemical Inactivation Versus Base-Excision Repair. *Mutat Res.* 2008;634:220–227.

Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;351:152–166.

Smalley KS, Contractor R, Haass NK, Kulp AN, Atilla-Gokcumen GE, Williams DS, Bregman H, Flaherty KT, Soengas MS, Meggers E, Herlyn M. An organometallic protein kinase inhibitor pharmacologically activates p53 and induces apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Res.* 2007;67:209–217.

Soussi T, Beroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 2001;1:233–240.

Sun C, Wang L, Huang S, Heynen GJJE, Prahallad A, Robert C, Haanen J, Blank, C, Wesseling J, Willems SM, Zecchin D, Hobor S, Bajpe PK, Lieftink C, Mateus C, Vagner S, Grenrum W, Hofland I, Schlicker A, Wessels LFA, Beijersbergen RL, Bardelli A, Di Nicolantonio F, Eggermont AMM, Bernards R. Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. 2014;508:118-122.

Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Jou of End.* 1993;1:57–60.

Trevisan G, Hoffmeister C, Rossato MF, Oliveira SM, Silva MA, Silva CR, Fusi C, Tonello R, Minocci D, Guerra GP, Materazzi S, Nassini R, Geppetti P, Ferreira J. TRPA1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger pain during MSU-induced inflammation. *Arthritis Rheum.* 2013;72:200-209.

Tricoire H, Moller M, Chemineau P, Malpoux B. Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. *Reprod (Cambridge, England) Suppl.* 2002;61:311–321.

Tucker MA. Is sunlight important to melanoma causation? 2008;17(3):467–468.

Undeger U, Giray B, Zorlu AF, Oge K, Baçaran N. Protective effects of melatonin on the ionizing radiation induced DNA damage in the rat brain. *Exp Toxicol Pathol.* 2004;55(5):379-384.

Ustundag A, Duydu Y. The influence of melatonin and N-acetylcysteine in delta-aminolevulinic acid and lead induced genotoxicity in lymphocytes in vitro. *Biol Trace Elem Res*. 2007;117(1):53-64.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Bio Interact*. 2006;160(1):1-40.

Vijayalaxmi A, Thomas Jr CR, Reiter RJ, Herman TS. Melatonin: From basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol*. 2002;20(10):2575–2601.

Vodicka P, Polivkova Z, Sytarova S, Demova H, Kucerova M, Vodickova L, Polakova V, Naccarati A, Smerhovsky Z, Ambrus M, Cerna M, Hemminki K. Chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of newly diagnosed cancer patients and healthy controls. *Carcinogenesis*, 2010;31(7):1238-1241.

Xie TX, Huang FJ, Aldape KD, Kang SH, Liu M, Gershenwald JE, Xie K, Sawaya R, Huang S. Activation of stat3 in human melanoma promotes brain metastasis. *Cancer Res*. 2006;66(6):3188-3196.

Wan J, Winn LM. In utero-initiated cancer: the role of reactive oxygen species. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2006;78(4):326–332.

Wei JY, Li WM, Zhou LC, Lu QN, He W. Melatonin induces apoptosis of colorectal cancer cells through HDAC4 nuclear import mediated by CaMKII inactivation. *J Pineal Res*. 2015;58:429–438.

Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzynka MJ, Firestone S, Melan MA. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci*. 2003; 72:2183–2198.

Wood RD, Mitchell M, Lindahl T. Human DNA repair genes. *Mutat Res Fund Mol M*. 2005;577(1-2):275–283.

Zaidi MR, Davis S, Noonan FP, Graff-Cherry C, Hawley TS, Walker RL, Feigenbaum L, Fuchs E, Lyakh L, Young HA, Hornyak TJ, Arnheiter H, Trinchieri G, Meltzer PS, De Fabo EC, Merlino G. Interferon- $\gamma$  links ultraviolet radiation to melanomagenesis in mice. *Nature*. 2011;469:548–553.

Zhang L, Tao L, Shi T, Zhang F, Sheng X, Cao Y, Zheng S, Wang A, Qian W, Jiang L, Lu Y. Paeonol inhibits B16F10 melanoma metastasis in vitro and in vivo via disrupting proinflammatory cytokines-mediated NF- $\kappa$ B and STAT3 pathways. *IUBMB Life*. 2015;(10)778–788.

## APÊNDICE A – CARTA DE ACEITE CEUA



Universidade do Extremo Sul Catarinense  
Comissão de Ética no Uso de Animais



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação dos efeitos da melatonina em um modelo experimental de câncer de pele do tipo melanoma.**", registrada com o protocolo nº **022/2017-1** - Adendo, (anteriormente aprovada pelo protocolo 040/2016-2), sob a responsabilidade de **Vanessa Moraes de Andrade**, junto à equipe: Flávia Karine Rigo, Luiza Martins Longaretti - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **21/03/2017**.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/11/2016 a 31/10/2017
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico C57Bl/6
Nº de animais	128
Idade/Peso	30, 45 e 60 dias / 30-35g
Gênero	Masculino
Origem	Biotério da Unesc

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Project title: "**Assessment of the effects of melatonin in experimental model of type of melanoma skin cancer.**"

Protocol number: **022/2017-1**

Principal Investigator: **Vanessa Moraes de Andrade**

Researchers: **Flávia Karine Rigo, Luiza Martins Longaretti.**

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on [www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua) or by e-mail: [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma, 21 de março de 2017.

  
**Jairo José Zocche**  
Coordenador da CEUA

