

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

Luana Paula Pelinson

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO CAFEICO EM LINHAGEM CELULAR DE
MELANOMA CUTÂNEO**

Santa Maria, RS
2019

Luana Paula Pelinson

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO CAFEICO EM LINHAGEM CELULAR DE
MELANOMA CUTÂNEO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Área de concentração em Enzimologia Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Bioquímica Toxicológica**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Margarete Dulce Bagatini
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Rosa Chitolina Schetinger

Santa Maria, RS
2019

Luana Paula Pelinson

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO CAFEICO EM LINHAGEM CELULAR DE
MELANOMA CUTÂNEO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Área de concentração em Enzimologia Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Bioquímica Toxicológica**

Aprovado em 11 de outubro de 2019:

Prof.^a Dr.^a Margarete Dulce Bagatini,
(Presidente – Orientadora)

Prof.^a Dr.^a Maria Rosa Chitolina Schetinger,
(Co-orientadora)

Prof.^a Dr.^a Roselia Maria Spanevello (UFPel)

Prof.^a Dr.^a Francieli Moro Stefanello (UFPel)

Prof.^a Dr.^a Francine Carla Cadoná (UFN)

Prof. Dr. Sydney Hartz Alves (UFSM)

Santa Maria, RS
2019

Pelinson, Luana Paula

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO CAFEICO EM LINHAGEM
CELULAR DE MELANOMA CUTÂNEO / Luana Paula Pelinson.-
2019.

85 p.; 30 cm

Orientadora: Margarete Dulce Bagatini

Coorientadora: Maria Rosa Chitolina

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2019

1. câncer e compostos naturais I. Bagatini, Margarete
Dulce II. Chitolina , Maria Rosa III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha querida família por serem meu suporte, por todo o amor, apoio e valores a mim ensinados, especialmente à minha mãe Elida, pela força, pelo incentivo constante, pelo amor e pelas orações.

Agradeço a minha orientadora professora Margarete, pela dedicação, compreensão, atenção e pela orientação deste trabalho.

Sou eternamente grata a vocês, Professoras Rosa e Vera, pela oportunidade que me deram de fazer parte do seu grupo de pesquisa e pela confiança em mim depositada, pela receptibilidade e acolhimento.

À minha co-orientadora Maria Rosa, por todos os ensinamentos, pelo incentivo, atenção e suporte.

Agradeço ao meu namorado Ricardo, por ser meu maior incentivador e por não me deixar desistir frente a todas as dificuldades que encontrei, obrigada por estar sempre segurando a minha mão. Não tenho palavras para te agradecer. Obrigada por todo amor, compreensão cuidado e amparo.

Agradeço imensamente a Tais e Charles, meus colegas e amigos, pela grande ajuda na realização dos experimentos, pela disposição e pela amizade. Juntos nessa jornada científica aprendemos e nos amparamos muito. Agradeço a Beatriz pela ajuda nos testes e pela disposição.

Às minhas amigas Ani, Aline, Nathi e Karine pelos momentos de descontração e pelo apoio e ajuda nas horas difíceis e às minhas grandes amigas Fabi, Sah e Vel que mesmo distantes sempre me apoiaram e incentivaram incansavelmente.

Agradeço aos meus amigos e colegas de laboratório Naiara, Juci, Vanessa, Pauline, Thauan, Victor, Leticia, Thalison pela ajuda e por compartilhar comigo dúvidas, momentos e experiências.

Aos membros da banca examinadora desta tese, professores Roselia, Francieli, Francine e Sydney pela disponibilidade em avaliar este trabalho e pelas contribuições que foram fundamentais para o aprimoramento do mesmo.

À UFSM e ao curso de Doutorado em Bioquímica Toxicológica, pela oportunidade. À CAPES pela bolsa concedida.

E a todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO CAFEICO EM LINHAGEM CELULAR DE MELANOMA CUTÂNEO

Autora: Luana Paula Pelinson

Orientadora: Margarete Dulce Bagatini

Co-orientadora: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Data e local de defesa: Santa Maria, 11 de outubro de 2019.

O melanoma cutâneo (MC) é um câncer extremamente agressivo, com baixa sobrevida e alta mortalidade. A grande maioria dos pacientes afetados por esta doença apresenta metástases e resistência a quimioterápicos, tornando o tratamento ineficaz. Nesse sentido, é extremamente importante o desenvolvimento de novos agentes para o tratamento do MC. Uma das fontes de grande interesse nessa pesquisa são os compostos de origem natural. Entre esses compostos, o ácido cafeico demonstrou um amplo espectro de atividades farmacológicas, além de efeitos antitumorais em alguns tipos de câncer. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ácido cafeico em linhagem celular de melanoma cutâneo. As células foram cultivadas em condições ideais e tratadas com 25 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM e 200 μM de ácido cafeico por 24 horas. Verificamos o efeito do composto sob a viabilidade, ciclo celular, capacidade de formar colônias, morte celular, capacidade migratória, em parâmetros do sistema purinérgico, estresse oxidativo e moléculas antioxidantes. Os resultados mostraram que o ácido cafeico, nas concentrações mais altas, modulou o sistema purinérgico, aumentando a hidrólise do ATP e AMP, reduziu a viabilidade celular, induziu parada do ciclo celular, inibiu a formação de colônias, induziu morte celular por apoptose, aumentou a expressão gênica das caspases 1, 3 e 8, reduziu a migração celular, não alterou os níveis de TBARS, dos antioxidantes radical superóxido e óxido nítrico e dos antioxidantes NPSH, PSH e vitamina C nas células de melanoma cutâneo. Estes resultados sugerem um efeito antitumoral do composto nas células SK-Mel-28. Mostramos que a modulação do sistema purinérgico e do ciclo celular podem ser alvos para controlar o desenvolvimento do tumor e a formação de metástases no MC. Este estudo fornece informações originais sobre os efeitos pelos quais o ácido cafeico pode desempenhar um papel fundamental na prevenção da progressão do tumor no melanoma humano.

Palavras-chave: melanoma, metástase, compostos naturais, ciclo celular, apoptose.

ABSTRACT

Thesis of Doctor's Degree
Post-Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological
Biochemistry Federal University of Santa Maria, RS, Brazil
EVALUATION OF CAFFEIC ACID EFFECT ON MELANOMA CELL

Author: Luana Paula Pelinson

Adviser: Margarete Dulce Bagatini

Co-adviser: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Date and place of the defense: Santa Maria, 11 de outubro de 2019.

Cutaneous melanoma (MC) is an extremely aggressive cancer with low survival and high mortality. The vast majority of patients affected by this disease have metastasis and resistance to chemotherapy, making treatment ineffective. In this sense, the development of new agents for the treatment of MC is extremely important. One of the sources of great interest in this research is compounds of natural origin. Among these compounds, caffeic acid has shown a broad spectrum of pharmacological activities, as well as antitumor effects on some cancers. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of caffeic acid on cutaneous melanoma cell line. Cells were cultured under optimal conditions and treated with 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M and 200 μ M caffeic acid for 24 hours. We verified the effect of the compound on viability, cell cycle, ability to form colonies, cell death, migratory capacity, on parameters of purinergic system, oxidative stress and antioxidant molecules. The results showed that caffeic acid, at higher concentrations, modulated the purinergic system, increased ATP and AMP hydrolysis, reduced cell viability, induced cell cycle arrest, inhibited colony formation, induced apoptosis cell death, increased the gene expression of caspases 1, 3 and 8, reduced cell migration, did not alter the levels of TBARS, radical superoxide and nitric oxide and did not alter the levels of antioxidant molecules NPSH, PSH and vitamin C in cutaneous melanoma cells. These results suggest an antitumor effect of the compound on SK-Mel-28 cells. We have shown that modulation of the purinergic system and cell cycle can be targets for controlling tumor development and metastasis formation in the MC. This study provides original information on the effects by which caffeic acid may play a key role in preventing tumor progression in human melanoma.

Keywords: melanoma, metastasis, natural compounds, cell cycle, apoptosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

FIGURA 1 – Desenho esquemático evidenciando as camadas da pele e as células constituintes.....	14
FIGURA 2 – Regra ABCDE–critérios de diagnóstico clínico do melanoma	16
FIGURA 3 – Desenho esquemático do nível de invasão de Clark referente à localização do tumor em relação às diversas camadas histológicas da pele	18
FIGURA 4 – Desenho esquemático do ciclo celular. O ciclo celular de uma célula somática divide-se em interfase (G1, S e G2) e mitose (M). A fase G0 representa a fase quiescente da célula.....	21
FIGURA 5 – Cascata de ectoenzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos de adenina e adenosina.....	24
FIGURA 6 – Membros da família das NTPDases.....	25
FIGURA 7 – Dano oxidativo às macromoléculas biológicas.....	28
FIGURA 8 – Estrutura química do ácido cafeico.....	31

ARTIGO

FIGURA 1 – Viability and cell death in SK-Mel-28 and PBMC.....	38
FIGURA 2 – Early apoptotic cells and cell cycle effects of caffeic acid (CA) and dacarbazine (DAC).....	39
FIGURA 3 – Effect of caffeic acid and dacarbazine on caspase-1, caspase-3 and caspase-8 gene expression of SK-Mel-28 cells.....	40

MANUSCRITO

FIGURA 1 – Effect of caffeic acid (CA) treatment after 24 h on cell viability of SK-Mel-28 cells.....	57
FIGURA 2 – Potential inhibition of cell migration by caffeic acid through wound healing assay. Cell migration in the SK-Mel-28 line treated with 25, 50, 100, 150 and 200 μ M of caffeic acid immediately after injury (0 h) and 24 hours after injury (24 h).....	57
FIGURA 3 – Effects of caffeic acid on NTPDase-1/CD39 and ecto-5'-nucleotidase/CD73 activity in SK-Mel-28 cells, using ATP (A) ADP (B) and AMP (C) as substrates in samples untreated (control) or treated with CA (25, 50, 100,	

150 and 200 μM) after 24 hours	58
FIGURA 4 – Adenosine deaminase activity in SK-Mel-28 cells untreated (control) or treated with CA (25, 50, 100, 150 and 200 μM) after 24 hours	58
FIGURA 5 – Levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in SK-Mel-28 cells untreated (control) or treated with CA (25, 50, 100, 150 and 200 μM).....	59
FIGURA 6 – Effect of caffeic acid (CA) treatment after 24 h on superoxide radical (A) and nitric oxide (B) in SK-Mel-28 cells.....	59
FIGURA 7 – Effects of caffeic acid on levels of non-protein thiols (A), protein thiols (B) and ascorbic acid (C) in SK-Mel-28 cells untreated (control) or treated with CA (25, 50, 100, 150 and 200 μM) after 24 hours	60

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

TABELA 1 – Classificação dos fototipos de pele proposta por Fitzpatrick... 15

ARTIGO

TABELA 1 – Primer sequences used to perform the molecular assay by qRT-PCR
.....37

TABELA 2 – Number of colonies formes after 7 days (% of control).....40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	– Adenosina deaminase
AC	- Ácido cafeico
ADP	– Adenosina difosfato
AMP	– Adenosina monofosfato
ATP	– Adenosina trifosfato
CAT	– Catalase
DAC	- Dacarbazina
CKIS	- Inibidores de Quinase-Ciclina
CDK	- Quinases dependentes de ciclinas
E-NPP	– Ecto -nucleotídeo pirofosfatase / fosfodiesterases
E-NTPDase	- Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase
ERN	- Espécies reativas de nitrogênio
ERO	– Espécies reativas de oxigênio
MES	- Melanoma Extensivo Superficial
MLA	- Melanoma Lentiginoso Acral
MLM	- Melanoma Lentigo Maligno
MN	- Melanoma Nodular
NO	- Óxido nítrico
NPSH	– Tióis não protéicos
PSH	- Tióis proteicos
SOD	– Superóxido Dismutase
TBARS	– Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TNF	- Fator de Necrose Tumoral
VIT C	- Vitamina C

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1 Epidemiologia e fisiopatologia do melanoma.....	13
3.2 Diagnóstico e classificação clínica.....	16
3.3 Ciclo celular e apoptose.....	19
3.4 Sistema purinérgico	22
3.5 Estresse oxidativo	26
3.5 Aspectos terapêuticos	28
3.6 Compostos naturais e o ácido cafeico.....	29
4 ARTIGO E MANUSCRITO.....	33
4.1 Artigo: Antiproliferative and apoptotic effects os caffeic acid on SK-Mel-28 human melanoma câncer cells	34
4.2 Manuscrito: Caffeic acid alters ectonucleotidase activity and reduces migration in human cutaneous melanoma cells	43
5. DISCUSSAO.....	61
6. CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS	68

1. INTRODUÇÃO

O Melanoma Cutâneo (MC) é o tipo mais agressivo de câncer de pele e sua incidência tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas (GARBE, LEITER, 2009). O MC é uma neoplasia de difícil tratamento e forte resistência, devido a sua natureza extremamente invasiva com alta capacidade de formar metástases, resultando em baixa sobrevida e alta mortalidade (SCHADENDORF et al., 2015; PADDOCK et al., 2016).

A terapia atualmente utilizada para o tratamento dos pacientes acometidos com essa doença apresenta inúmeros e indesejados efeitos colaterais, além de não se mostrar eficiente em evitar a evolução letal da doença. Em estágios iniciais, a taxa de sobrevida após 5 anos é de 95%. No entanto, caso o tumor tenha se espalhado para órgãos vizinhos, essa taxa cai para 65% (SIEGEL et al., 2013) e, havendo metástase para linfonodos, essa taxa cai drasticamente, chegando a menos de 10% (BALCH, 2009). Além disso, quando ocorre a disseminação do tumor para o cérebro, a sobrevida é de, em média, 4 meses (FONKEM et al., 2012).

Dessa maneira, vários grupos de pesquisa buscam novas alternativas para auxiliar no tratamento do MC, procurando reduzir os efeitos colaterais e a resistência das células aos fármacos já utilizados na terapêutica, bem como a busca por novos compostos com atividades antitumorais que se mostrem eficazes no combate às células de câncer.

Uma das fontes de grande interesse são os compostos de origem natural com potenciais efeitos antitumorais. Estudos têm demonstrado que muitas plantas possuem princípios ativos que são eficientes na redução da viabilidade e proliferação de células tumorais. Entre estes, destacamos o ácido cafeico (AC), que vem evidenciando efeitos citotóxicos, além de ações antiproliferativas, antimetastáticas e indutoras de morte em células de câncer (CHUNG et al., 2004; CHANG et al., 2010; JAGANATHAN & MANDAL, 2012).

Diante do exposto, torna-se relevante investigar possíveis efeitos antitumorais do ácido cafeico em células de MC, assim como mecanismos envolvidos na ação deste composto, com o intuito de auxiliar no tratamento de pessoas acometidas com essa neoplasia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do ácido cafeico em linhagem celular de melanoma cutâneo.

2.2 Objetivos Específicos

Investigar em células de melanoma cutâneo tratadas e não tratadas com ácido cafeico:

- A viabilidade celular.
- As alterações nas fases do ciclo celular.
- Indução de morte celular.
- A expressão gênica da caspase-1, caspase-3 e caspase-8.
- A capacidade de formação de colônias.
- Parâmetros de migração celular.
- Atividade das enzimas E-NTPDase, E-5'-nucleotidase e E-ADA.
- Os danos oxidativos nos lipídios através da peroxidação lipídica (TBARS).
- Os níveis de radical superóxido e de óxido nítrico (NO).
- Os níveis de tióis proteicos (PSH) e tióis não proteicos (NPSH).
- Os níveis de ácido ascórbico (VIT C).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Epidemiologia e fisiopatologia do melanoma

O câncer de pele é o tipo de câncer mais frequente na população brasileira sendo comumente classificado em não melanoma (carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular) e melanoma. O melanoma é o menos frequente dentre os tumores cutâneos, representando menos de 10% das neoplasias dermatológicas, porém é o mais agressivo devido à alta propensão para metástases, ocasionando cerca de 80% das mortes relacionadas ao câncer de pele (SLINGLUFF, 2011; BERTOLOTTO, 2013; PASTUSHENKO et al., 2014). Metástase é a implantação de um foco tumoral à distância do tumor original e é responsável por até 90% de toda a morbidade e mortalidade relacionadas ao melanoma (BALCH, 2009).

O número de novos casos de melanoma cutâneo tem aumentado de forma muito rápida nos últimos anos. No Brasil, similarmente aos outros países, observou-se um aumento na incidência deste tumor. A estimativa para 2018/2019, segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer, será de 6.260 novos casos de câncer de pele melanoma no Brasil, número que pode ser ainda maior visto que a minoria dos casos são notificados (INCA, 2018).

As maiores taxas de melanoma no Brasil concentram-se na região sul (INCA, 2018; MORENO, BATISTA & BONETTI, 2012). Pertencente a esta região, o estado do Rio Grande do Sul está localizado entre os paralelos 26° e 31°, mesma localização de boa parte do território australiano, país que apresenta as maiores taxas de incidência de MC do mundo (EGGERMONT; SPATZ; ROBERT, 2014; MELANOMA INSTITUTE AUSTRALIA, 2019).

Com relação as taxas de recidiva, aproximadamente 3% dos pacientes irão desenvolver um segundo tumor em um período de até três anos após o diagnóstico de um melanoma. Essa taxa pode chegar a 33% de incidência de um segundo melanoma num período de até cinco anos quando há histórico familiar (MANICA et al., 2018).

A pele é o maior órgão do corpo humano e recobre toda a superfície externa, agindo como uma importante barreira contra agentes tóxicos, atritos, lesões e radiações, apresentando função protetora essencial. Estruturalmente, a pele consiste em duas camadas, a epiderme e a derme. A epiderme, camada mais fina e superficial, é avascular e composta de tecido epitelial. A derme, camada mais espessa e profunda, é vascularizada e composta por tecido conjuntivo. Logo abaixo da derme encontra-se a hipoderme, que não faz parte da

pele, mas a une a outros órgãos (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, 2017) (Figure 1). A epiderme contém dois tipos principais de células. As células mais abundantes são os queratinócitos, representando cerca de 90% das células epidérmicas. Aproximadamente 8% das células da epiderme são os melanócitos, responsáveis pela produção do pigmento melanina (CAMPOS, 2010; TORTORA; NIELSEN, 2013).

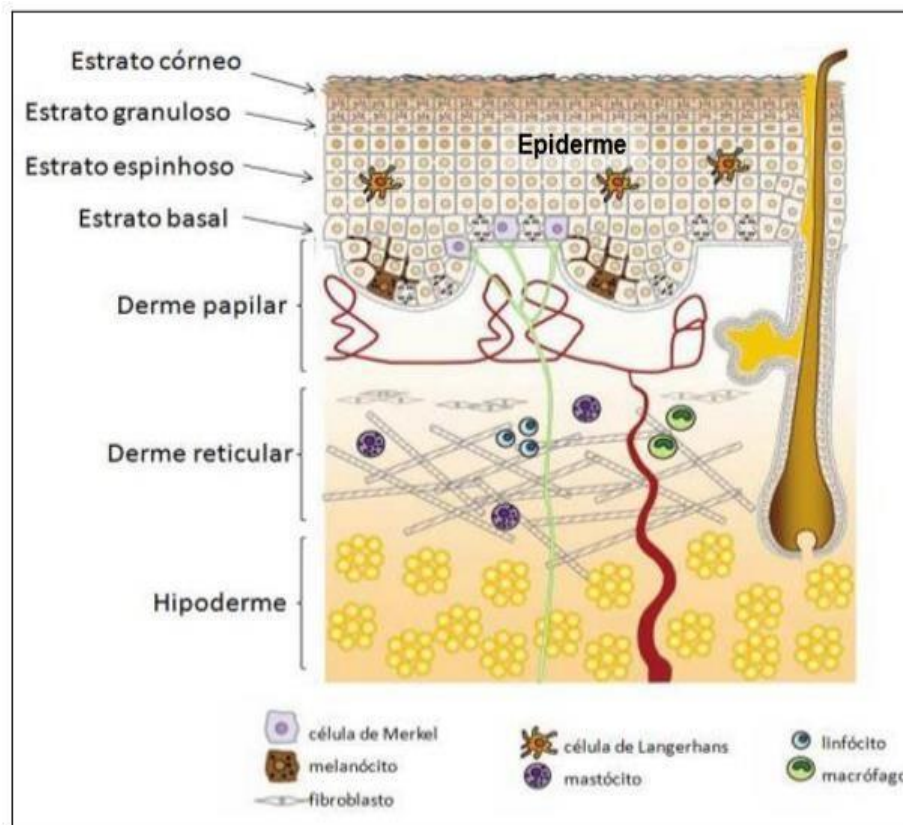


Figure 1: Desenho esquemático evidenciando as camadas da pele e as células constituintes.

Fonte: Adaptado de CAMPOS, 2010.

A melanina, sintetizada em organelas especiais dos melanócitos chamadas de melanossomos, atua na coloração da pele e absorção de radiação ultravioleta. Após a síntese de melanina, os melanossomos são transferidos até a ponta dos dendritos do melanócito e posteriormente aos queratinócitos, os quais fagocitam porções de melanossomos carregados desse pigmento. A melanina, nos queratinócitos, forma uma proteção ao redor do núcleo contra os raios ultravioletas (BANDARCHI et al., 2010; JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, 2017).

O MC é definido como uma neoplasia que forma-se a partir da transformação maligna dos melanócitos, na qual ocorre proliferação descontrolada, atipia morfológica com acentuado pleomorfismo dessas células, as quais podem apresentar núcleos grandes,

hipercromáticos, irregulares e múltiplos nucléolos (HICKS; FLAITSZ, 2000). O melanoma é uma das neoplasias mais agressivas, apresentando elevada capacidade de proliferação, diferenciação celular, estímulo da angiogênese e capacidade acentuada de metástase, ou seja, possui alta propensão de invasão e desenvolvimento em órgãos distantes ao seu órgão de origem (WICK, 2016).

Em 1976, Fitzpatrick classificou a pele humana em seis tipos de acordo com o fototipo e etnia, relacionando com a sensibilidade cutânea à radiação ultravioleta (UV), variando do tipo I ao tipo VI (GUIRRO; GUIRRO, 2004). Indivíduos com pele, cabelos e olhos claros apresentam fototipos baixos, I e II, segundo essa classificação, e se queimam facilmente ao invés de se bronzear, tendo maior probabilidade de desenvolver melanoma conforme apresentado na Tabela 1 (MENCHÓN, 2014).

Tabela 1 – Classificação dos fototipos de pele proposta por Fitzpatrick

	Fototipo I	Fototipo II	Fototipo III	Fototipo IV	Fototipo V	Fototipo VI
Fototipo (pele)	Branca	Branca	Morena Clara	Morena Moderada	Morena escura	Negra
Sensibilidade ao sol	Muito sensível	Sensível	Normal	Normal	Pouco sensível	Insensível
Características	Queima com facilidade e nunca bronzeia	Queima com facilidade e bronzeia pouco	Queima e bronzeia moderadamente	Queima pouco e bronzeia com facilidade	Queima raramente e bronzeia bastante	Nunca queima. Pele totalmente pigmentada

Fonte: Adaptado de FITZPATRICK, MOSHER (2000).

Os fatores de risco relacionados ao desenvolvimento do melanoma incluem histórico familiar de MC, presença elevada de nevos melanocíticos na pele, indivíduos com classificação de fototipos I e II na classificação de Fitzpatrick e exposição intensa à radiação UV (BEHRENS et al., 2018).

Já está bem estabelecido que o principal vilão para o desenvolvimento do MC é exposição intensa à radiação UV. A radiação emitida pela luz solar pode ser dividida em radiação UVA, UVB e UVC, essa última barrada pela camada de ozônio. UVA e UVB chegam à superfície da Terra e a exposição a esses tipos de radiações podem causar lesões no DNA celular contribuindo para o desenvolvimento do melanoma. Apesar da UVA ser mais abundante (90% da radiação emitida), a UVB é mais propensa em causar queimaduras e danos na pele (VOLKOVOVA et al., 2012). A exposição às radiações UV se dá também

através de câmaras de bronzamento artificial (CALLAHAN; FLAHERTY; POSTOW, 2016; SHAIN et al., 2015), as quais foram banidas no Brasil em 2008 (ANVISA, 2012) devido ao fato da exposição ser considerada carcinogênica. Exposição elevada, que corresponde a mais de 10 sessões de bronzamento, eleva em duas vezes o risco de desenvolver melanoma de início precoce (abaixo de 40 anos) (CUST et al., 2011; NIELSEN et al., 2012).

3.2 Diagnóstico e classificação clínica

Para o diagnóstico do MC, o achado mais significativo é uma lesão pigmentada que apresenta mudanças visuais durante um período de meses a anos (D'ISCHIA et al., 2015; SAÚDE, 2013). A regra ABCDE está entre os principais critérios de diagnóstico clínico do melanoma com o objetivo de identificar e tratar lesões iniciais e potencialmente curáveis (VALKO-ROKYTOVSKÁ et al., 2018), que significa:

- A – assimetria;
- B – bordas irregulares;
- C – cor heterogênea;
- D – diâmetro maior que 6 mm;
- E – evolução.



Figura 2: Regra ABCDE–critérios de diagnóstico clínico do melanoma.
Fonte: Adaptado de VALKO-ROKYTOVSKÁ, 2018.

A regra geral é que qualquer lesão deve ser prontamente avaliada se apresentar variação de cor ou dimensão (CALLAHAN; FLAHERTY; POSTOW, 2016). O melanoma típico apresenta características como irregularidade de bordas, diâmetro superior a 6 mm e alteração de cor da lesão. Já o sangramento, a dor e o prurido podem ser indicativos de lesões mais avançadas (CALLAHAN; FLAHERTY; POSTOW, 2016).

A dermatoscopia auxilia no diagnóstico clínico do melanoma e consiste em um método não invasivo de amplificação da imagem da lesão utilizando dermatoscópio que possibilita a observação de estruturas e auxilia em achados diagnósticos que não conseguem ser visualizados a olho nu (SAÚDE, 2013; VESTERGAARD et al., 2008).

Na maioria dos casos, o melanoma desenvolve-se como uma proliferação de melanócitos neoplásicos confinados na epiderme ou na derme superficial, fase chamada de crescimento radial, onde o tumor é quase sempre curável com uma excisão cirúrgica adequada (MICHALANY, 2014). Na fase de crescimento vertical, estágio mais avançado, a lesão pode infiltrar na derme reticular chegando à hipoderme, adquirindo a capacidade de metastatizar, gerando um pior prognóstico (LEONARDI et al., 2018).

Em 1970, Alexander Breslow determinou padrões de espessura do tumor, que até hoje são utilizados como fator prognóstico de sobrevida para o melanoma. O índice de Breslow trata-se da medida em milímetros (mm) da espessura do tumor, desde a parte superior até sua porção mais profunda e a relação dessa medida com a possibilidade de gerar metástases. Tumores mais finos do que 0,76 mm foram designados de baixo risco, pois raramente vão gerar metástase. Pacientes de risco intermediário possuem tumor com espessura de 0,76 até 1,5 mm e de alto risco a espessura é de 1,5 até 4,0 mm. Para pacientes com tumores mais espessos que 4,0 mm, o risco de gerar metástase é altíssimo (MERVIC, 2012). Esse índice apresenta maior reprodutibilidade e melhor correlação com o prognóstico quando comparado com os níveis de Clark (BALCH et al., 2009).

Já o nível de Clark descreve a invasão neoplásica em relação às camadas anatômicas da pele (CLARK et al., 1969):

- Nível I: tumor confinado a epiderme (melanoma *in situ*);
- Nível II: o tumor ultrapassa a epiderme e ocupa parte da derme papilar;
- Nível III: o tumor preenche a derme papilar sem invadir a derme reticular;
- Nível IV: o tumor envolve a derme reticular;
- Nível V: o tumor invade a hipoderme.

É difícil saber exatamente onde termina a derme papilar e inicia a reticular, assim, a classificação pelo nível de Clark não é tão objetiva e é menos reprodutível do que a classificação de Breslow (BARNHILL, 2004).

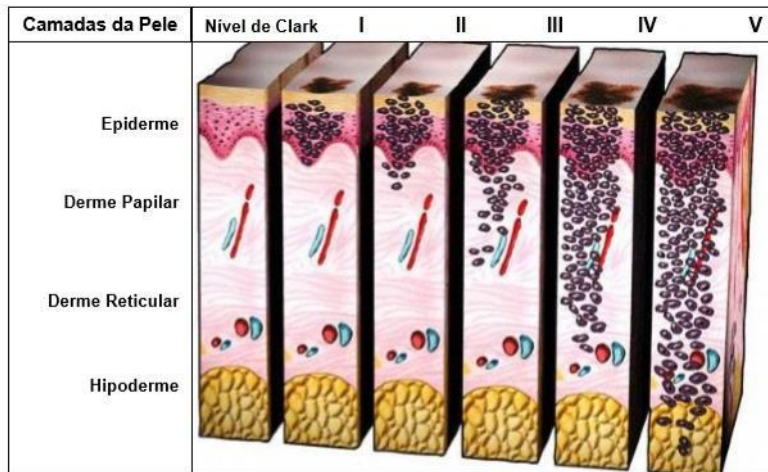


Figura 3: Desenho esquemático do nível de invasão de Clark referente à localização do tumor em relação às diversas camadas histológicas da pele. Fonte: Adaptado de HALE, 2013.

O melanoma pode ser subdividido de acordo com suas características histopatológicas e clínicas em quatro tipos, Melanoma Extensivo Superficial (MES), Melanoma Nodular (MN), Melanoma Lentiginoso Acral (MLA) e Melanoma Lentigo Maligno (MLM) (DE VRIES, 2006, SLINGLUFF, 2011).

O Melanoma Extensivo Superficial, também chamado, expansivo superficial ou disseminativo superficial é o subtipo mais frequente, sendo responsável por aproximadamente 60-70% dos casos (ALMEIDA; ALMEIDA, 2009). Acomete principalmente pessoas entre 30-50 anos de idade, geralmente desenvolve-se de um nevo melanocítico preexistente e caracteriza-se por um crescimento radial. A sua etiologia tem uma importante relação com exposição solar aguda na infância e exposição intermitente na vida adulta.

O Melanoma Nodular é o segundo subtipo mais comum, responsável por 15-30% dos casos. Acomete com mais frequência os homens com faixa etária entre 50 e 60 anos. Sua lesão é caracterizada por coloração uniforme marrom/preta/azulada ou amelanótica, delimitada, crescimento radial com invasão dérmica, metástases precoces e frequentemente aparecem ulceração e sangramento (GARBE; LEITER, 2009; SAÚDE, 2013).

O Melanoma Lentiginoso Acral é um subtipo de melanoma cutâneo que representa cerca de 2-8% dos melanomas, se desenvolve frequentemente nas palmas das mãos, plantas

dos pés e regiões subungueais. A lesão é pouco pigmentada com bordas irregulares (GARBE et al, 2012; SAÚDE, 2013; CALLAHAN; FLAHERTY; POSTOW, 2016;).

O tipo de melanoma que acomete a pele de idosos em regiões expostas ao sol, principalmente face e pescoço é o Lentigo Maligno, que corresponde a 4-15% dos melanomas. Apresenta-se como uma mácula pigmentada lisa, de bordas irregulares, tamanho e coloração variada com múltiplos tons de castanho claro a negro. O mesmo possui crescimento lento e prognóstico geralmente favorável (DUNCAN, 2009; SMALBERGER; SIEGEL; KHACHEMOUNE, 2008).

Além dessas classificações mais comuns, algumas formas mais raras de melanoma podem ser encontradas, como o melanoma ocular, de mucosas, infantil, persistente, nevóide e associado ao nevo azul (EGGERMONT; SPATZ; ROBERT, 2014; O’SULLIVAN; O’CONNOR, 2018).

3.3 Ciclo celular e apoptose

Em nosso organismo há sempre um equilíbrio entre proliferação e morte celular a fim de garantir a homeostase. O ciclo celular corresponde a uma série de eventos coordenados e precisamente controlados pelo qual as células se proliferam. É comumente dividido em intérfase (fase G1, S e G2), compreendida como a fase de preparação, e mitose (fase M), fase da divisão celular. Existe, ainda, a fase G0, na qual as células encontram-se em repouso, ou seja, não estão replicando. Durante a fase S, fase de síntese, ocorre a duplicação do DNA e durante a fase M acontece a segregação dos componentes celulares e a divisão propriamente dita. As fases G1 e G2 são as fases de intervalo, nas quais a célula se prepara para a execução das fases S e M, respectivamente (SEKULIC et al., 2008).

O controle chave do ciclo celular é manter as células com o mesmo número de cromossomos e a mesma funcionalidade. Para que isso aconteça é necessário garantir uma duplicação correta do DNA durante a fase S e uma divisão igualitária dos componentes e cromossomos entre as células filhas no momento da divisão. A fim de evitar qualquer multiplicação de células de forma errônea, existem os pontos de checagem (checkpoints), que impedem a célula de passar para a próxima fase se não tiver passado com sucesso pela fase anterior. A parada da célula nos checkpoints permitem-na reparar erros para só então passar para a próxima fase do ciclo, impedindo a proliferação de células danificadas (KHODJAKOV & RIEDER, 2009).

Na fase G1, a célula prepara-se para a fase seguinte sintetizando proteínas necessárias para a duplicação do DNA, por exemplo. É nessa fase que acontece também um importante ponto de checagem que verifica se a célula continua ou não o processo de divisão em direção à fase S. Caso a célula estiver danificada, existem proteínas que promovem o bloqueio do ciclo e ela permanece na fase G1, onde ocorre reparação de danos ou indução de morte celular, correspondendo a um importante mecanismo para evitar a multiplicação de células anômalas (BENNET, 2008; MAXIMOV & MAXIMOV, 2008).

Proteínas como as ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDK) realizam essa regulação durante o ciclo celular, mantendo as células em divisão. A atividade dos inibidores de CDK (CKIS - Inibidores de Quinase-Ciclina) contrabalanceiam as funções de CDK. Dentre esses estão os inibidores universais p21, p27, e p57, atuantes em vários períodos do ciclo celular, por meio de sua união a CDKS complexadas com as ciclinas (PINTO & FELZENSZWALB, 2003; TAJARA, 2004; SCHWARTZ & SHAH, 2005).

A proteína p53, um dos principais componentes envolvidos no ponto de checagem e no reparo de erros no DNA, é conhecida como guardião do genoma, uma vez que possui habilidade de integrar sinais que controlam sobrevivência e morte celular. Esta proteína sinaliza o bloqueio do ciclo celular no ponto de checagem na fase G1/S através da ativação da proteína p21, e o recrutamento da maquinaria de reparo, se o dano for reversível. Quando ocorrem danos à molécula de DNA, que são irreparáveis, essa proteína leva à indução de apoptose, evitando assim que a informação genética incorreta seja transmitida para as células-filhas (STIEWE, 2007; PECORINO, 2008).

Uma das características mais importantes da célula cancerígena é justamente a perda do controle celular e a capacidade de proliferação descontrolada. Isso pode acontecer pelo fato de a célula não responder aos pontos de controle e reparação na fase G1/S, permanecendo no ciclo celular e se multiplicando de forma errada (WARD, 2002). Alterações nos componentes do ciclo celular e nas vias de sinalização dos mecanismos de checkpoint ocorrem na maioria dos tumores humanos. A proliferação celular pode se tornar descontrolada devido ao fato de um gene que estimula o ciclo estar hiperativo e ou por um gene que iniba o ciclo estar inativo (VIDEIRA et al., 2002).

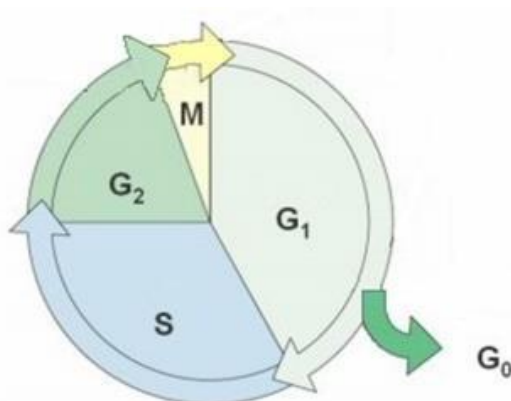


Figura 4: Desenho esquemático do ciclo celular. O ciclo celular de uma célula somática divide-se em interfase (G1, S e G2) e mitose (M). A fase G0 representa a fase quiescente da célula (Adaptado de Heuvel, 2005).

Por outro lado, a apoptose é um tipo específico de morte celular programada, fenômeno biológico e estratégico para o controle e manutenção da homeostasia celular, desempenhando também papel fundamental em uma série de doenças, entre elas o câncer. Uma característica marcante das células tumorais é a perda da capacidade ou resistência a morte celular (MAURILLO et al., 2001).

Ao sofrer apoptose, a célula apresenta alterações morfológicas específicas como retração e perda da aderência com a matriz celular e com outras células, condensação da cromatina, colapso do núcleo, formação de prolongamentos citoplasmáticos, formando corpos apoptóticos que são rapidamente fagocitados pelos fagócitos sem liberação do conteúdo do citoplasma no meio extracelular (CONRADT, 2009).

São complexas as vias de sinalização que desencadeiam a apoptose e subdividem-se em apoptose intrínseca e apoptose extrínseca. A apoptose extrínseca é mediada via ligante-receptor, através dos receptores de membrana plasmática da superfamília de receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNF), como o FAS, também chamados de “receptores de morte”. Uma vez unido aos seus ligantes, geralmente específicos, o receptor recruta proteínas que vão ativar caspases iniciadoras, como a caspase-8, formando um complexo onde as caspases efetoras, como a caspase-3, são ativadas. As caspases efetoras, por sua vez, são responsáveis pela ativação de proteases que completam o processo de desintegração e morte celular (KROEMER, 2007; VERMEULEN, 2005).

A via intrínseca envolve as mitocôndrias e por isso também é chamada de via mitocondrial de morte celular. Embora a sinalização que desencadeie a apoptose intrínseca, bem como seus estímulos iniciadores sejam bastante heterogêneos, o que caracteriza essa

via é a liberação de proteínas pró-apoptóticas da intermembrana da mitocôndria. Proteínas pró-apoptóticas, como Bax e Bid podem formar poros na membrana mitocondrial, o que possibilita a saída de proteínas, entre estas o citocromo c. No citoplasma da célula, o citocromo C se liga a apaf-1 e a procaspase-9, formando um complexo chamado apoptossomo. A caspase-9 ativa as caspases efetoras 3, 6 e 7, amplificando a cascata de ativação, ocasionando morte celular (GALLUZZI et al., 2012; KROEMER, 2007).

3.4 Sistema purinérgico

A sinalização purinérgica tem sido associada a uma variabilidade de desordens relacionadas ao desenvolvimento tumoral e é uma importante via de comunicação celular mediada por nucleotídeos e nucleosídeos (BURNSTOCK et al., 2012). Há crescentes evidências de que a sinalização purinérgica está envolvida em diversos processos biológicos, como a proliferação, diferenciação e morte celular (VISOVATTI, 2012; ROBSON, 2011). A sinalização purinérgica envolve três principais constituintes: os nucleotídeos de adenina e seu nucleosídeo correspondente; os receptores através dos quais eles exercem suas funções e as ectoenzimas responsáveis pela hidrólise e controle dos níveis extracelulares destas moléculas (ATKINSON et al., 2006).

Os nucleotídeos extracelulares de adenina, ATP, ADP, AMP e o seu nucleosídeo correspondente, a adenosina, representam um importante grupo de moléculas sinalizadoras, que modulam diversos processos fisiológicos e patológicos em diversos tecidos através de seus receptores localizados na superfície celular (BURNSTOCK et al., 2012). Dentre estes efeitos, é importante destacar o controle da dor e inflamação, contração do músculo liso, neurotransmissão, secreção endócrina e exócrina, resposta imune, agregação plaquetária e modulação da função cardíaca (BURNSTOCK, 2016a). Devido a habilidade que os nucleotídeos extracelulares têm em atuar como fatores indutores de crescimento e proliferação celular, muitos estudos têm apontado que a sinalização purinérgica pode estar envolvida com a progressão tumoral (BURNSTOCK, 2016; DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017).

A molécula chave dentre as purinas extracelulares é o ATP, nucleotídeo que participa de vários processos fisiológicos, como resposta imune, neurotransmissão, tônus vascular, proliferação, desenvolvimento, diferenciação e morte celular (BURNSTOCK, 2016; DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017). Intrigante é o fato de que o ATP, dependendo das

concentrações extracelulares, é capaz de induzir proliferação ou morte celular, dois efeitos antagônicos (DI VIRGILIO, 2000; ADINOLFI et al., 2005; DI VIRGILIO, 2012). Estudos *in vivo* demonstraram que o ATP se acumula na periferia dos tumores, podendo modular sinalizações que controlam a resposta inflamatória e que estimulam a proliferação tumoral (BRAGANHOL, 2010). Em células de melanoma, a inibição farmacológica do receptor P2X7, receptor de ligação do ATP, diminuiu o crescimento tumoral (HATTORI et al., 2012). Em células de glioma, a estimulação desse receptor aumentou a migração celular e a liberação de fatores envolvidos com o crescimento tumoral (WEI et al., 2008).

Em contrapartida ao exposto acima, diversos estudos têm demonstrado que o ATP estaria envolvido com atividades anticancerígenas. Em células de melanoma e em células de adenocarcinoma de cólon, a ativação do P2X7 através de altas concentrações de ATP induziu morte celular (BIAN et al., 2013). Em outro estudo com linhagem de glioma, a inibição desse receptor aumentou o crescimento celular tanto *in vitro* como *in vivo* (FANG et al., 2013). Esses efeitos completamente antagônicos e aparentemente tão contraditórios parecem depender muito da concentração do ATP no meio extracelular, bem como as vias que são ativadas (ADINOLFI et al., 2005).

Um dos produtos da hidrólise extracelular do ATP é a adenosina, que também tem ações fisiológicas. Uma das principais funções da adenosina é mediar uma resposta imunossupressora e anti-inflamatória, atuando como agente protetor dos tecidos saudáveis contra os ataques promovidos pelas células de defesa (HASKÓ et al., 2009; GESSI; VARANI; MERIGUI, 2007). Todavia existem controvérsias sobre os efeitos benéficos da adenosina, sendo bastante estudada por apresentar propriedades pró- carcinogênicas, dentre estas, promover o crescimento tumoral e estimular a angiogênese, fatos que podem agravar ainda mais o estado de saúde dos pacientes que já apresentam MC (GESSI; VARANI; MERIGUI, 2007; ANTONIOLI et al., 2014). Além disso, em células de melanoma humano, a mobilidade celular, essencial para progressão e metástase das células cancerígenas, é mediado pela adenosina (BURNSTOCK et al., 2012).

Os níveis extracelulares dessas moléculas são controlados por meio da atividade de uma cascata de enzimas que agem sequencialmente denominadas ectoenzimas, tais como a Ecto-Nucleotídeo Pirofosfato/Fosfodiesterase (E-NPP, EC 3.6.1.5), Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase (E-NTPDases, CD39, EC 3.6.1.5), E-5'Nucleotidase (ecto-5'-nucleotidase; CD73, E.C.3.1.3.5, 5'NT) e Adenosina Desaminase (ADA, E.C.3.5.4.4) (ZIMMERMANN et al., 2007). A cadeia enzimática tem início com a ação da enzima NTPDase, a qual é responsável pela catálise da hidrólise das moléculas de ATP e ADP

resultando em AMP. Em seguida, a enzima 5'-nucleotidase catalisa a hidrólise do AMP gerando adenosina, a qual é finalmente desaminada, através da ação da enzima ADA, formando inosina (ZIMMERMANN et al., 2007; YEGUTKIN, 2008).

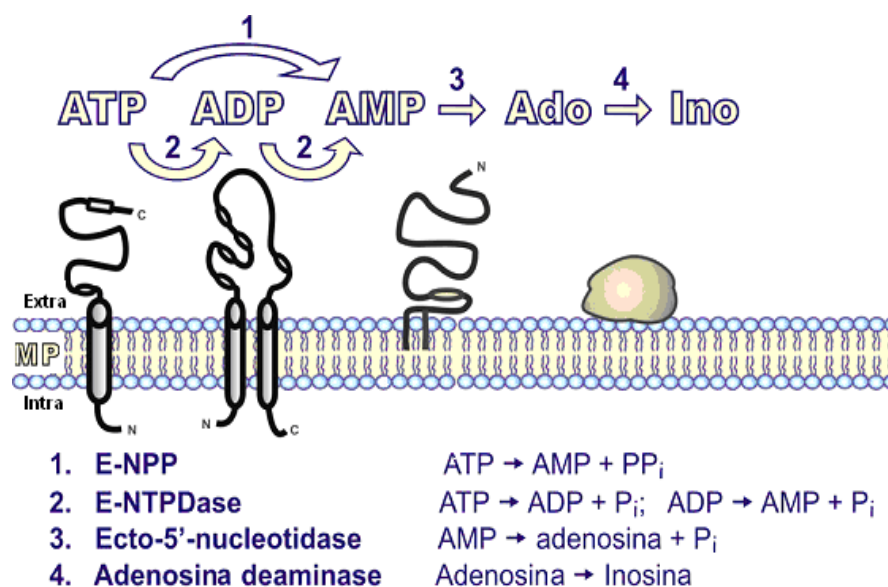


Figura 5: Cascata de ectoenzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos de adenina e adenosina. FONTE: Yegutkin (2008), com adaptações.

As NTPDases são um grupo de enzimas caracterizadas pela sua capacidade de catalisar a hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados (ZIMMERMANN et al., 2007). Até o momento, já foram identificados oito diferentes membros da família das E-NTPDases, NTPDase 1 a 8, as quais diferem entre si quanto à especificidade ao substrato, distribuição tecidual e localização celular (SHI et al., 2001; ZIMMERMANN, 2001; BIOGENNESE et al., 2004). Quatro destas NTPDases (NTPDases 1, 2, 3 e 8) estão localizadas de forma acoplada à membrana plasmática celular, exibindo seu sítio catalítico extracelularmente e são as principais responsáveis pela metabolização dos nucleotídeos no meio extracelular. Enquanto que as NTPDases 4, 5, 6 e 7 apresentam-se localizadas na face interna da célula (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

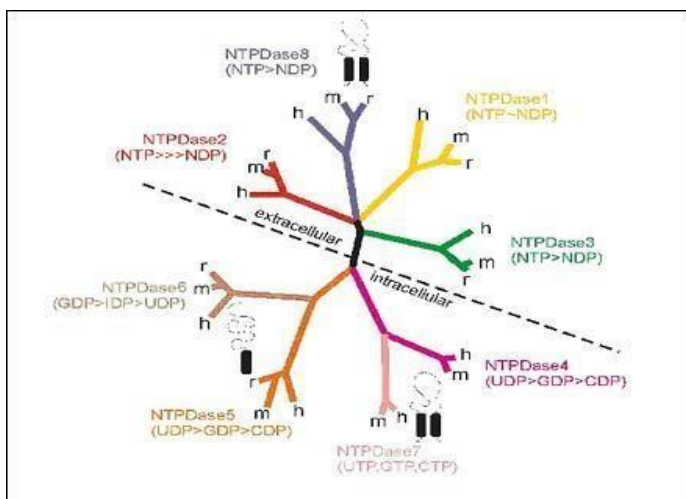


Figura 6: Membros da família das NTPDases. Fonte: ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN (2006), com adaptações.

Outra ectoenzima importante é a ecto-5'-nucleotidase, a qual está ancorada à membrana plasmática e exibe seu sítio catalítico para o meio extracelular. O nucleotídeo mais eficientemente hidrolisado por ela é o AMP, sendo, dessa forma, a principal enzima responsável pela formação de adenosina (ANTONIOLI et al., 2013; MONTEIRO et al., 2018).

Da mesma forma que as ectonucleotidases, a enzima ADA também faz parte do conjunto de enzimas responsáveis pela hidrólise sequencial dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina (YEGUTKIN, 2008). A ADA é uma importante enzima da cascata de inativação de purinas, a qual catalisa a desaminação irreversível da adenosina e da desoxiadenosina em inosina e desoxinosina, respectivamente. Sendo assim objeto de considerável interesse devido à sua função na regulação das concentrações extracelulares de adenosina (BLACKBURN; KELLEMS, 2005; YEGUTKIN, 2008).

Apesar de grande parte desta enzima estar presente no meio intracelular, ela também está localizada na superfície celular. É encontrada alterada em diversas situações patológicas, inclusive na presença de certos tumores (SPYCHALA, 2000). Essa importante enzima se divide em duas isoformas: ADA1 e ADA2. A primeira é encontrada predominantemente nos tecidos, enquanto a ADA2 é o principal componente do soro. Ambas apresentam diferenças estruturais e cinéticas (ANTONIOLI et al., 2012).

Em conjunto, as ectoenzimas descritas acima são capazes de regular a concentração extracelular dos nucleotídeos e nucleosídeo de adenina que são importantes sinalizadores dos eventos de proliferação celular (DI VIRGILIO, 2000; ADINOLFI et al., 2005; DI

VIRGILIO, 2012) os quais apresentam ampla relação com o desenvolvimento do melanoma.

Como já mencionado, uma vez liberados, os nucleotídeos e nucleosídeo de adenina interagem com receptores purinérgicos específicos, mediando eventos de resposta imune, de inflamação, de agregação plaquetária, entre outros (BURNSTOCK, 2007; BERGAMIN et al., 2012; DI VIRGILIO, 2012). Estes podem ser divididos em dois grandes grupos, os receptores P1, que são receptores de adenosina e os receptores P2, que reconhecem o ATP (BURNSTOCK, 2014).

Os receptores P1 foram subdivididos em quatro subtipos de acordo com suas características: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (KRÜGEL, 2016; WOODS et al., 2016). Os receptores P2 também foram subdivididos em duas subfamílias: aqueles acoplados à proteína G (P2Y) e aqueles ligados a canais iônicos (P2X), sendo que, em mamíferos, já foram identificados oito tipos de receptores P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14) e sete tipos de receptores P2X (P2X1– P2X7) (BURNSTOCK, 2006). A sinalização purinérgica é finalizada, então, pela ação de ectoenzimas já descritas acima, que hidrolisam os nucleotídeos até os seus respectivos nucleosídeos, no meio extracelular (BONNEFOY et al., 2015).

3.5 Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são geradas constantemente no organismo em processos inflamatórios ou por alguma disfunção celular. Os radicais do oxigênio, como o ânion superóxido (O₂^{•-}), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o radical hidroxila (OH[•]) são as principais ERO. Já as ERN incluem o peroxinitrito (ONOO), o [•]NO e o radical dióxido de nitrogênio ([•]NO₂) (ZACKS et al., 2005).

As ERO são derivadas do oxigênio molecular, altamente instáveis e reagem rapidamente com outros radicais livres e macromoléculas em reações em cadeia para gerarem o aumento de oxidantes nocivos (KIRKINEZOS E MORAES, 2001). O [•]NO é uma espécie ERN e é produzido pela atividade enzimática da óxido nítrico sintase (NOS). [•]NO pode facilmente atravessar membranas e, logo, são capazes de afetar alvos celulares distantes (ZACKS et al., 2005).

O [•]NO e as ERO são formadas em condições fisiológicas em proporções controladas por mecanismos de defesa celular e desempenham papéis críticos em processos normais de

desenvolvimento celular. Este mecanismo de defesa é composto por sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos responsáveis pela supressão de radicais livres e conseqüentemente pela proteção do organismo e prevenção de diversas patologias (VALKO et al., 2007). O sistema de defesa antioxidante enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione peroxidase, enquanto as defesas antioxidantes não enzimáticas incluem a vitaminas C, vitamina E e os compostos orgânicos contendo grupos sulfidril (SH), denominados tióis (BONNEFOY et al., 2002; ALMEIDA, 2008; MASELLA et al., 2005; VALKO et al., 2007

Porém, em condições patológicas, como no processo inflamatório, pode ocorrer um desequilíbrio e essa produção de ERO pode aumentar substancialmente e o sistema antioxidante torna-se ineficaz em combatê-las (GIACCO & BROWNLEE, 2010). Denomina-se estresse oxidativo essa situação em que há um desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e pró-oxidantes, com o predomínio destes últimos. As espécies oxidantes em excesso apresentam potencial para causar danos irreversíveis em macromoléculas como proteínas, lipídios e ácido desoxirribonucléico e que se não forem reparadas, alterarão a funcionalidade de células e tecidos (BARBOSA et al., 2010). Esses danos em estruturas celulares e mutações no DNA ocorrendo mais facilmente, propiciam a formação de células malignas e o desenvolvimento de tumores, entre estes o melanoma (CANNAVÒ et al., 2019).

O envolvimento do estresse oxidativo no desenvolvimento do câncer é relatado em inúmeros estudos (ZANINI et al, 2013; ZANINI et al, 2014; FARIAS et al., 2011; MALDONADO et al., 2006;) que evidenciam a direta relação do estresse oxidativo na iniciação, promoção e progressão tumoral (KLAUNIG E KAMENDULIS, 2004).

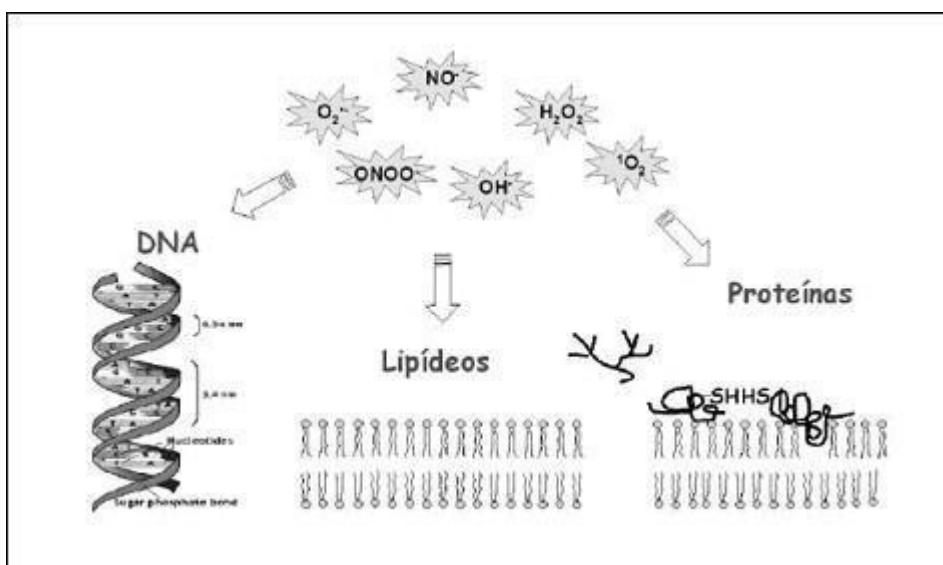


Figura 7: Dano oxidativo às macromoléculas biológicas.

Fonte: TORRES (2003), com adaptações.

3.6 Aspectos terapêuticos

A terapia atualmente utilizada para o tratamento de pacientes com MC apresenta inúmeros efeitos colaterais indesejáveis, além de não ser eficaz em evitar a evolução letal da doença (GARBE et al., 2001; CALLAHAN; FLAHERTY; POSTOW, 2016). A cirurgia é o tratamento de escolha e a única modalidade potencialmente curativa para o melanoma quando não há metástase (FARIES & ARIYAN, 2011).

Os pacientes com um número limitado de metástases à distância podem ser candidatos a ressecção cirúrgica. Contudo a cirurgia raramente é efetiva pois a maioria dos pacientes desenvolve doença metastática generalizada (LUI et al., 2007). Os indivíduos com metástases a distância têm um prognóstico reservado, com probabilidade de sobrevida em cinco anos, de acordo com o sítio de doença, de 5 a 20% (BALCH, 2009). O tratamento sistêmico tem cunho eminentemente paliativo, com a quimioterapia baseada em dacarbazina (KORN et al., 2008).

A dacarbazina é um agente que causa danos no DNA, paralisa o ciclo celular e apoptose (LUI et al., 2007). A taxa de resposta ao medicamento varia de 15 a 25%. No entanto, a resposta completa acontece em menos de 5% dos casos (BEDIKIAN et al., 2006), como evidenciado por um estudo de acompanhamento de pacientes com CM tratados com dacarbazina (DAC), no qual menos de 2% dos indivíduos sobreviveram 6 anos após o início do tratamento (LEV et al., 2004). A resistência a dacarbazina tem sido associada com a

regulação positiva de sinais pró-sobrevivência e moléculas anti-apoptóticas em células cancerígenas. Apesar de seus efeitos moderados, a DAC continua a ser o tratamento mais utilizado para o melanoma metastático (BEDIKIAN et al., 2006; LEV et al., 2004).

Além das abordagens de tratamento atualmente utilizadas, a imunoterapia, o uso de anticorpos contra alguns alvos imunológicos específicos, como contra o antígeno de linfócitos T citotóxicos 4 (CTLA-4) (Ipilimumab) e para o bloqueio da proteína de morte celular programada 1 (PD- 1) (nivolumab e pembrolizumab) vem revolucionando o tratamento do melanoma maligno avançado. Os dois mais recentemente aprovados imunoterapêuticos pembrolizumab e nivolumab mostraram maiores taxas de resposta e menor toxicidade quando comparados ao ipilimumabe, sugerindo que o uso de inibidores imunológicos pode ser um poderoso aliado no tratamento de pacientes com melanoma avançado (SANLORENZO et al., 2014; FRANKLIN et al., 2017).

Porém, os avanços no tratamento do melanoma nos últimos anos não foram capazes de prolongar, de maneira significativa, a sobrevida daqueles acometidos por doença metastática (GARBE et al., 2011). Por esta razão, o diagnóstico precoce e o manejo adequado da lesão inicial são as melhores e únicas formas de se abordar o portador de melanoma, proporcionando qualidade de vida e aumento na sobrevida (BALCH et al., 2009).

Nesse sentido, a terapia no melanoma avançado ainda permanece um desafio clínico constante. Uma melhor compreensão da fisiologia do melanoma poderá modificar os mecanismos de resistência das células tumorais e permitir que indivíduos, atualmente considerados incuráveis, passem a ter uma real possibilidade de cura.

3.7 Produtos naturais e o ácido cafeico

Em virtude da forte resistência dos melanomas aos tratamentos convencionais, diversas pesquisas direcionadas a novas estratégias de tratamentos mais eficazes vêm sendo investigadas. Desde os tempos remotos, as plantas medicinais e seus princípios ativos têm sido utilizados para o tratamento de diversas doenças (LI et al., 2004). Neste contexto, a utilização de compostos naturais provenientes da alimentação parece contribuir positivamente, e os compostos fenólicos são, por certo, as substâncias com maior representatividade, atuando através de diferentes mecanismos de ação.

Os compostos fenólicos ocorrem universalmente no reino vegetal como metabólitos secundários e são parte de um amplo e complexo grupo de substâncias orgânicas. As plantas são capazes de sintetizar e acumular uma ampla variedade desses compostos, conferindo proteção contra o ataque de radicais livres, advindos de subprodutos do processo da fotossíntese e contra danos teciduais (SOARES, 2002; ACOSTA-ESTRADA et al., 2014; HELENO et al., 2015). Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de um ou mais anéis aromáticos ligados a pelo menos um radical hidroxila e/ou outros substitutos, e podem ser divididos de acordo com o número de anéis fenólicos e com as estruturas as quais estão ligados (D'ARCHIVIO et al., 2007; OLIVEIRA & BASTOS, 2011).

Diversos estudos evidenciaram que esses compostos apresentam ação protetora, exibindo uma diversidade de efeitos benéficos tais como: antioxidante, hipoglicêmico, hipolipidêmico, anti-inflamatório, anticoagulante, ansiolítico, neuroprotetor, entre outros (PEREIRA et al., 2006; BOUAYED et al., 2007; BASSOLI et al., 2007, CHAO et al., 2009, JAMALI, et al, 2019, KARABOGA, 2019). Tais compostos são amplamente encontrados em diversas frutas, verduras, cereais e legumes, assim como em algumas bebidas tais como o vinho, o chá e o café (FARAH & DONANGELO, 2006).

Dentre os compostos fenólicos, destacamos os ácidos fenólicos, compostos que estão presentes em quase todos os alimentos derivados de plantas, representando uma parcela significativa da dieta humana. São estruturalmente fenóis simples e sua divisão se dá em duas classes: os ácidos hidroxicinâmicos e os ácidos hidroxibenzóicos. Dentre os ácidos hidroxibenzóicos podemos citar o ácido gálico, o ácido elágico e o ácido 4-hidroxibenzóico. Já dentre os ácidos hidroxicinâmicos, os quais são encontrados em maiores concentrações que os ácidos hidroxibenzóicos em plantas no geral, podemos destacar os ácidos p-cumarínico, ferrúlico, caféico e sináptico (MANACH, 2004; LAFAY & GIL-IZQUIERDO, 2008). Os ácidos hidroxicinâmicos constituem a maior classe dos compostos fenólicos e o composto mais representativo desta classe é o ácido cafeico (TAPIERO et al., 2002).

O ácido cafeico, também conhecido como ácido 3,4-diidroxicinâmico, é um composto natural encontrado em diversas frutas e vegetais, tais como ameixa, maçã, alcachofra, berinjela, uva, pera e tomates, assim como em chás, ervas, no café e no vinho (SHI et al., 2003). Esse composto vem se destacando em estudos acerca de seu papel biológico e atividades farmacológicas, incluindo ação antioxidante (NAKAJIMA et al., 2009), neuroprotetora (PINHEIRO FERNANDES et al., 2014), antimicrobiana (SOVA, 2012), cardioprotetora (CHLOPCIKOVA et al., 2004), antidepressiva (TAKEDA et al.,

2002), preventiva do câncer de pele (KANG et al., 2009), além de apresentar efeito antitumoral (OLTHOF et al., 2001; BOUZAIENE et al., 2015) e antimetastático (CHUNG et al., 2004) em diversos tipos de câncer. Contudo, os mecanismos envolvidos nestas propriedades benéficas do ácido cafeico ainda não foram totalmente compreendidos.

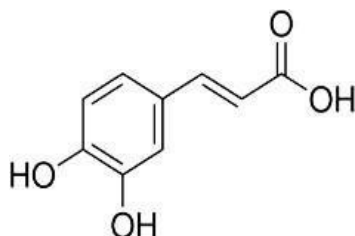


Figure 8: Estrutura química do ácido cafeico.

Estudos prévios envolvendo o AC já foram desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa. Os estudos evidenciaram alterações na atividade das ectoenzimas em linfócitos e plaquetas de ratos após o tratamento com este composto. O AC resultou em redução na hidrólise de ATP e AMP e aumento na hidrólise de ADP em plaquetas, além de um aumento nas atividades da E-NTPDase e da E-ADA em linfócitos de ratos. Esses resultados revelaram que o AC possui a capacidade de alterar a atividade das ectoenzimas, modulando, dessa forma, o sistema purinérgico (ANWAR, 2013).

Pesquisas têm demonstrado um efeito inibitório do ácido cafeico na invasão e migração celular, com potencial ação na redução das metástases em células de câncer (WENG & YEN, 2012). Estudos também têm evidenciado um potencial desse composto na redução da proliferação, viabilidade e crescimento celular em diversos tipos de cânceres, além da capacidade de indução de morte por apoptose (CHANG et al., 2010; JAGANATHAN & MANDAL, 2012; WENG & YEN, 2012).

Jaganathan & Mandal (2009) demonstraram que o AC apresentou um efeito inibitório em células de adenocarcinoma de cólon, reduzindo em 61% a viabilidade celular comparado com o controle. Da mesma forma, outros estudos demonstraram que o AC reduziu, a proliferação de células de adenocarcinoma cervical, em uma concentração dose-dependente. O AC foi capaz de induzir a apoptose após 24 h e 48 h de exposição através da inibição da atividade da Bcl-2, promovendo a liberação do citocromo-C e, subsequente ativação da caspase-3 (CHANG et al., 2010). Pesquisas também evidenciaram uma capacidade de reduzir a invasão de células na linhagem AH109A (células de câncer

hepático) (WENG & YEN, 2012). No melanoma, estudos utilizando uma molécula derivada do ácido cafeico inibiram o crescimento do tamanho do tumor até 57% (KUDUGUNTI et al., 2011). Contudo, os mecanismos envolvidos nestas propriedades benéficas do AC ainda não foram totalmente elucidados.

Diante destas evidências, torna-se relevante a realização de pesquisas direcionadas ao estudo do AC sobre células de melanoma cutâneo, no intuito de avaliar a implicação desse composto na prevenção do desenvolvimento e no tratamento dessa patologia.

4 ARTIGO E MANUSCRITO

Os resultados que fazem parte dessa tese estão apresentados sob a forma de um artigo e um manuscrito, os quais se encontram aqui organizados. Os itens materiais e métodos, resultados e discussão e referências encontram-se nos próprios manuscritos. As apresentações estão baseadas no artigo publicado na revista *Molecular Biology Reports* e no manuscrito submetido para publicação na revista *Journal of Cellular Biochemistry*.

4.1 Artigo: Antiproliferative and apoptotic effects of caffeic acid on SK-Mel-28 human melanoma cancer cells

4.2 Manuscrito: Caffeic acid alters ectonucleotidase activity and reduces migration in human cutaneous melanoma cells

4.1 ARTIGO

Antiproliferative and apoptotic effects of caffeic acid on SK-Mel-28 human melanoma cancer cells



Antiproliferative and apoptotic effects of caffeic acid on SK-Mel-28 human melanoma cancer cells

Luana Paula Pelinson¹ · Charles Elias Assmann¹ · Taís Vidal Palma² · Ivana Beatrice Mânica da Cruz³ · Micheli Mainardi Pillat⁴ · Aline Mânica¹ · Naiara Stefanello¹ · Grazielle Castagna Cezimbra Weis³ · Audrei de Oliveira Alves³ · Cinthia Melazzo de Andrade² · Henning Ulrich⁴ · Vera Maria Melchior Morsch¹ · Maria Rosa Chitolina Schetinger¹ · Margarete Dulce Bagatini^{1,5}

Received: 29 October 2018 / Accepted: 28 January 2019
© Springer Nature B.V. 2019

Abstract

Cutaneous melanoma (CM) is an extremely aggressive cancer presenting low survival and high mortality. The vast majority of patients affected by this disease does not respond or show resistance to the chemotherapeutic drugs, which makes the treatment ineffective. In this sense, the necessity for the development of new agents to assist in CM therapy is extremely important. One of the sources of great interest in this search are compounds of natural origin. Among these compounds, caffeic acid has demonstrated a broad spectrum of pharmacological activities as well as antitumor effects in some types of cancer. Therefore, the objective of this work was to investigate the possible antitumor effect of caffeic acid on the SK-Mel-28 cell line, human CM cells. Cells were cultured in flasks with culture medium containing fetal bovine serum, antibiotic, and antifungal, and maintained in ideal conditions. Cells were treated with 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M and 200 μ M of caffeic acid and dacarbazine at 1 mg/mL. We verified the effect on cell viability and cell death, apoptosis, cell cycle, colony formation and gene expression of caspases. Results showed a decrease in cell viability, cell death induction by apoptosis, inhibition of colony formation, modulation of cell cycle and alterations in gene expression of caspases after caffeic acid treatment. These results suggest an antitumor effect of the compound on SK-Mel-28 cells. This study provides original information on mechanisms by which caffeic acid may play a key role in preventing tumor progression in human melanoma cells.

Keywords Melanoma · Natural compounds · Cytotoxicity · Apoptosis · Cell cycle · Gene expression

Introduction

Cutaneous melanoma (CM) is the deadliest of all the skin cancers and its incidence has increased considerably in the last decades [1]. CM presents difficult treatment and strong

resistance, due to its extremely invasive nature with high capacity to form metastases, resulting in low survival and high mortality [2].

The therapy currently used for the treatment of patients with this disease presents innumerable and unwanted side effects, besides not being efficient in avoiding the lethal evolution of the disease [3]. Dacarbazine is one of the most commonly used antitumor drugs for metastatic melanoma. The drug response rate ranges from 15 to 25%. However, only in less than 5% of the cases, there is a complete response [4], as suggested by a follow-up study of CM patients treated with dacarbazine which revealed that less than 2% of the individuals survived 6 years after initiation of treatment [5].

Besides the currently used treatment approaches, immunotherapy, the use of antibodies towards some specific immune targets such as against the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) (Ipilimumab) and for the blockade of the programmed cell death protein 1 (PD-1) (nivolumab and

✉ Margarete Dulce Bagatini
margaretebagatini@yahoo.com.br

¹ PPGBtox, CCNE, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

² Laboratory of Oxidative Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

³ Laboratory of Biogenomics, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

⁴ Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

⁵ Academic Coordination, Federal University of Fronteira Sul, Campus Chapecó, Chapecó, SC, Brazil

pembrolizumab), has been revolutionizing the treatment of advanced malignant melanoma. The two more recent approved immunotherapeutic drugs pembrolizumab and nivolumab have shown greater response rates (c. 40%) and lower toxicity when compared to ipilimumab, suggesting that the use of immune inhibitors could be a powerful ally for the treatment of patients with advanced melanoma [6, 7].

Due to the strong resistance of melanoma to conventional chemotherapy, several investigations directed to new treatment strategies and adjuvants have been studied. In this context, the use of natural compounds from food sources seems to contribute positively. Among these, we highlight caffeic acid, also known as 3,4-dihydroxycinnamic acid, a phenolic compound found naturally in coffee, in various fruits and vegetables, and main representative of the hydroxycinnamic acids in the diet [8, 9]. Studies demonstrating an inhibitory effect of caffeic acid on cell invasion and migration, with potential action in reducing metastases in cancer cells, are becoming increasingly common in the scientific literature [10]. In addition, research shows the potential of this compound in reducing proliferation, viability and cell growth in several types of cancers, besides an ability to induce cell death by apoptosis [10, 11]. However, the mechanisms involved in these beneficial properties of caffeic acid have not yet been fully elucidated.

Therefore, considering the antitumor effects produced by caffeic acid in cells of different types of cancer, the low response and the high resistance to traditional treatments of CM, it becomes relevant to investigate the effect of caffeic acid on the parameters of cell viability, proliferation and cell death in CM cells, in order to contribute to the search for new therapeutic strategies that can bring benefits to the patients affected by this disease.

Materials and methods

Chemicals and reagents

Chemicals and reagents used for this study were of high analytical grade purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and Merck (Darmstadt, Germany). Plastics and reagents used for cell culture procedures were obtained from Gibco™ Thermo Fisher Scientific (Grand Island, NY, USA) and Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Flow cytometry reagents were acquired from BD Biosciences (San Diego, CA, USA) and analysis was performed with a FACSCanto™ II Flow Cytometer BD Biosciences (San Diego, CA, USA) equipment. Reagents used to perform molecular biology assays were purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA), Thermo Fisher Scientific (Grand Island, NY, USA), Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA,

USA), and Qiagen (Hilden, Germany). All spectrophotometric assays were read using a 96-microplate reader SpectraMax® i3 Multimode Plate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Cell culture

Human CM cell line (SK-Mel-28) was obtained from the Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), Brazil. Cells were cultured in flasks with Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (high glucose and L-glutamine) containing antibiotic and antifungal (penicillin/streptomycin) and supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were maintained in a humidified incubator at 37 °C and 5% of CO₂ and they were evaluated for the presence of contamination daily and the culture medium was changed every two days.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were collected by venipuncture from three healthy subjects (20–30 years) and separated using Histopaque®-1077 gradient media as described previously [12]. Cells were cultured in ideal conditions using Roswell park memorial institute (RPMI) 1640 medium supplemented with fetal bovine serum, antibiotics, and antifungals as defined above. This project was approved by the Human Ethics Committee of the Federal University of the Fronteira Sul (UFFS, *Campus* Chapecó, RS, Brazil) under protocol number 822.782 and all blood donors provided written consent to participate in the study.

Caffeic acid and dacarbazine treatment

SK-Mel-28 cells were treated for 24 h with concentrations of 25, 50, 100, 150 and 200 µM of caffeic acid and dacarbazine at 1 mg/mL. Caffeic acid was dissolved in 0.4% ethanol followed by DMEM or RPMI 1640 culture medium to obtain the different concentrations. Caffeic acid concentrations were based on a pilot study developed in our research laboratory.

Cell viability assay

Cell viability was assessed by the MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay. The MTT reagent was added to a 96-well plate containing the treated sample, which was incubated for 1 h at 37 °C. After incubation, the supernatant was removed and cells were resuspended in 200 µL of DMSO (dimethylsulfoxide). The absorbance was read in a spectrophotometer at 570 nm [13].

Cell death

The cell death assay was performed with the Trypan blue dye (0.4% Trypan blue). This method is based on the fact that viable cells are impervious to the dye, being translucent when they are observed under the microscope, whereas non-viable cells with damaged membrane absorb this dye exhibiting purplish coloration [14]. Cells were observed and counted with the aid of a microscope.

Apoptosis assay

Flow cytometry analyzes using the FITC-Annexin-V and propidium iodide (PI) staining kit were performed to verify the rate of apoptosis that the compounds caused on the cells. After being seeded and treated, the samples were checked on a flow cytometer and the results were analyzed using the FlowJo_V10 software. The results were given as the percentage of apoptotic cells of the total counted cells [15].

Cell cycle analysis

To determine whether the compounds could induce cell cycle arrest, SK-Mel-28 cells were treated with caffeic acid and dacarbazine for 24 h as described above. Cells were then harvested by trypsin and washed twice with PBS, and the pellet was resuspended and fixed in an ice-cold solution of 70% ethanol in PBS (v/v) at -20°C for 1 h. Fixed cells were stained with 1 μL of PI (1 mg/mL) and 3 μL of RNase A (100 mg/mL) in PBS at 37°C for 1 h. Samples were acquired in a flow cytometer equipment. The percentages of cells in G0/G1, S and G2/M phases of the cell cycle were determined using FlowJo software vX 10.6 (Tree Stars Inc.) [16].

Gene expression of caspase-1, caspase-3, and caspase-8

Gene expression of the *CASP 1*, *3*, and *8* genes was analyzed by the molecular assay (qRT-PCR analysis) as formerly described [12]. Initially, RNA was extracted using TRIZOL reagent and measured using a spectrophotometer equipment. For reverse transcription, samples were first treated with 0.2 μL of DNase at 37°C for 5 min, followed

by heating at 65°C for 10 min. Then, the iScript cDNA synthesis kit was used for cDNA preparation with 4 μL of iScript Mix and 1 μL of the enzyme with heating at 25°C for 5 min, 42°C for 30 min, and 85°C for 5 min, followed by incubation at 5°C for 60 min. The molecular assay was performed using 1 μL of cDNA samples and 1x of Quanti-Fast SYBR Green PCR Kit to a final volume of 20 μL . The β -actin gene (*ACTB*) was used as the housekeeping gene in order to normalize the expression of all genes studied here. The list of primer sequences used for the molecular assay is presented in Table 1.

Colony formation assay

The assay to analyze colony formation capacity was performed by Clonogenic assay. This test evaluates the ability of cells to form colonies for a period of 7–10 days. Cells were cultured in 6-well plates at a concentration of 500 cells per well, incubated for one week and the growth of the colonies was monitored. The colonies were stained, digitalized and counted with the ImageJ software [17].

Statistical analysis

All measurements were analyzed statistically by analysis of variance followed by the appropriate post hoc test using GraphPad Prism 6 Software. All data were expressed as mean \pm standard deviation. Differences in the probability of rejection of the null hypothesis were considered statistically significant ($p < 0.05$).

Results and discussion

In this work, we evaluated the possible antitumor activity of caffeic acid on melanoma cancer cells and compare it with the effect of the chemotherapeutic drug dacarbazine. As expected, treatment with dacarbazine after 24 h presented a cytotoxic effect on SK-Mel-28 cells. Similarly, caffeic acid treatment at concentrations of 100 μM , 150 μM and 200 μM for the same period of time was able to reduce cell viability of SK-Mel-28 cells.

CM cells were cultured in 96-well plates (1×10^6 cells/well) to perform cell viability analysis and incubated with

Table 1 Primer sequences used to perform the molecular assay by qRT-PCR

Genes	Primers	
	Forward sequence (5'–3')	Reverse sequence (5'–3')
<i>β-actin</i>	TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA	TGCACAAGTTAGGTTTTGTCA
<i>CASP1</i>	TGCGCAAGTTAGGTTTTGTCA	TACGCTGTACCCAGATTTGTAG
<i>CASP3</i>	TTTGAGCCTGAGCAGAGACATG	TACCAGTGCATGATGGAGAAATGG
<i>CASP8</i>	AGGAGCTGCTCTCCGAATT	CCCTGCCTGGTGCTGAAGT

the caffeic acid at concentrations of 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M and 200 μ M and analyzed after 24 h. Figure 1a shows that there was a significant decrease in cell viability of the SK-Mel-28 cell line after incubation with the caffeic acid at concentrations of 100 μ M, 150 μ M and 200 μ M, with a 15%, 45%, and 46% inhibition, respectively, compared to the negative control (only culture medium). When cells were incubated with dacarbazine, we observed a decrease of 60% in cell viability compared to control cells. There was no difference in the percentage of viability when cells were treated with the vehicle compared to those that did not receive treatment.

It has been established that caffeic acid reduces cell viability and inhibits the growth of various types of cancer cells [11, 16, 18–20]. Researchers have shown that caffeic acid presents the ability to reduce cell viability in glioblastoma, breast, kidney, colon [11] and lung carcinoma cell lines [19], which corroborates with our results. On the other hand, when PBMC were treated with caffeic acid we observed a significant increase in cell viability compared to untreated cells for all the concentrations tested (Fig. 1b). Thus, caffeic

acid demonstrated some selective cytotoxicity by reducing viability of tumor cells, but not of healthy cells. This selective cytotoxicity is an ideal feature for an antitumor agent [21, 22].

Furthermore, our results on the viability of white blood cells are in agreement with recent studies showing that caffeic acid exerts immunomodulatory and antioxidant effects on these cells. A prior study already suggested that caffeic acid could be acting through its immunomodulatory capacity on monocytes inhibiting cytokine production whereas upregulating the antifungal activity of these cells, with no effects on cell viability [23]. The more recent study performed by Kilani-Jaziri et al. [24] investigated the effect of several phenolic acids, including caffeic acid, on natural killer (NK) cells and cytotoxic T lymphocytes showing that this natural molecule presents immunomodulatory activity enhancing humoral immune response and that this effect was related to the cellular antioxidant effect in macrophages. In this sense, the authors suggest that phenolic acids, as caffeic acid, could possibly be used to modulate immune cell functions in physiological and pathological conditions. Taken

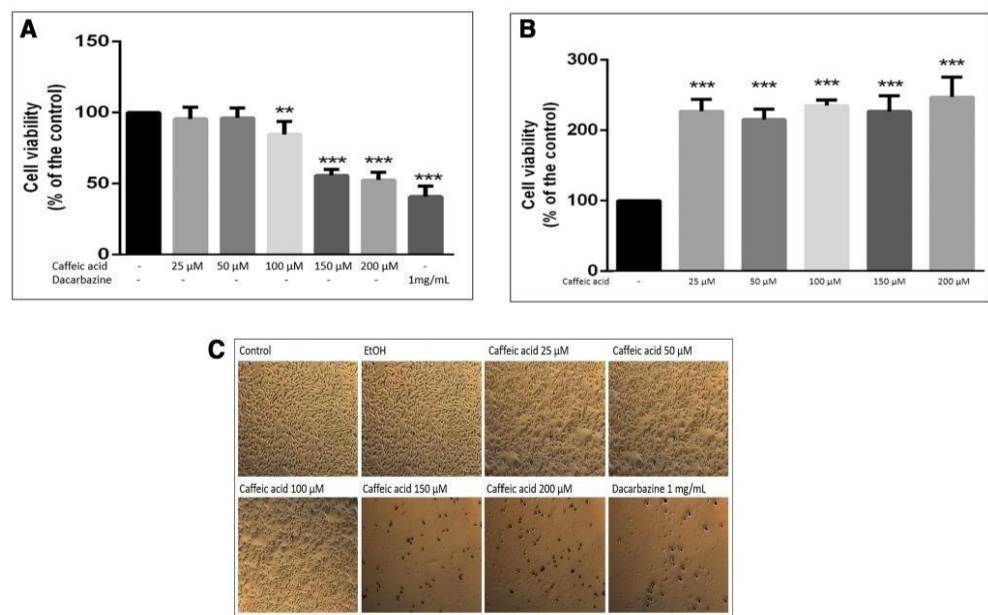


Fig. 1 Viability and cell death in SK-Mel-28 cells and PBMC. **a** Effect of caffeic acid (CA) and dacarbazine (DAC) treatment after 24 h on cell viability of SK-Mel-28 cells. Values are expressed as a percentage of the control. Each bar represents the mean \pm standard deviation of tests performed in triplicates representative of three independent assays. **b** Effect of CA and DAC treatment after 24 h on cell viability of PBMC. Values are expressed as a percentage of the

control. Each bar represents the mean \pm standard deviation of tests performed in triplicates representative of three independent assays. **c** Cell death analyzed by the Trypan blue method. Cell death on SK-Mel-28 cells without treatment, treated with ethanol vehicle, treated with 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M of CA and 1 mg/mL of DAC

together, these results indicate that caffeic acid seems to have no effect or even increasing cell viability while exerting some modulatory effects on white blood cells, which could be positive in the sense of improving immune responses.

In addition to cellular viability, we also analyzed cell death by the Trypan blue staining method. Figure 1c clearly shows that 150 μM and 200 μM of caffeic acid and dacarbazine presented a higher mortality rate when compared to untreated cells. The vehicle did not cause significant cell death when compared to the control. To evaluate whether these results were extended or intensified over a long period of time, we observed cell growth for 7 days by the Clonogenic assay. Surprisingly, all concentrations of caffeic acid and dacarbazine potently inhibited colony formation (Fig. 2a; Table 1).

To investigate the possible mechanism by which caffeic acid and dacarbazine could cause cell death, we analyzed apoptosis by flow cytometry. Results showed that treatment with caffeic acid (150 μM and 200 μM) increased the percentage of early apoptotic cells (AV+, PI-) compared to control. Dacarbazine also induced apoptosis in SK-Mel-28 cells (Fig. 2b), suggesting that both agents present cytotoxic effects by triggering apoptosis in these cell line. These results corroborate with several studies, which also demonstrated the ability of caffeic acid to induce cell death by apoptosis in cells of various types of cancer, such as bowel

cancer [25], laryngeal cancer [16] and breast cancer [18]. In other studies, dacarbazine also showed to induce apoptosis in melanoma cancer cells [26, 27].

Additionally, cell cycle modulation was analyzed to test whether caffeic acid and dacarbazine could induce alterations in SK-Mel-28 cell cycle progression. Treatment with caffeic acid (150 μM and 200 μM) increased the population of cells at G0/G1 phase in 18% and 38% respectively compared to control, reduced the population of cells at S phase in 22% and 46% respectively compared to control, and also reduced G2/M phase cells in 55% and 79% respectively compared to control. Dacarbazine treatment reduced the percentage of cells at S phase in 44% compared to control. No differences were found at G0/G1 and G2/M phases for dacarbazine treatment (Fig. 2c).

In order to elucidate the possible underlying mechanism by which caffeic acid and dacarbazine cause cell death in melanoma cells, we analyzed gene expression of caspase-1, caspase-3 and caspase-8 genes in cells treated with caffeic acid 200 μM and dacarbazine 1 mg/mL. The caspase-1 gene expression increased in both caffeic acid and dacarbazine treated cells compared to untreated cells. Caffeic acid treatment increased caspase-3 and caspase-8 expression compared to untreated cells and dacarbazine treatment reduced caspase-8 expression compared to untreated cells (Fig. 3). In general, gene expression of caspases 1, 3 and 8 increased

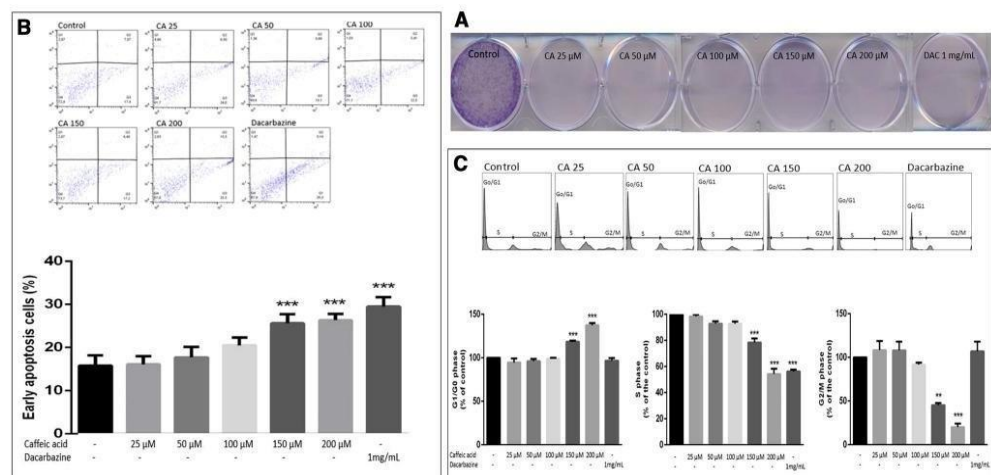


Fig. 2 Early apoptotic cells and cell cycle effects of caffeic acid (CA) and dacarbazine (DAC). **a** The effect of CA and DAC treatment on Clonogenic assay in SK-Mel-28 cells after 24 h. **b** The effect of CA and DAC treatment on the apoptosis induction in SK-Mel-28 cells after 24 h. Flow cytometry is illustrated according to the concentrations of compounds. Values are expressed as a percentage of the control. Each bar represents the mean \pm standard deviation of tests performed in triplicates representative of three independent assays

formed in triplicates representative of three independent assays. **c** The effect of CA and DAC treatment on the cell cycle in SK-Mel-28 cells after 24 h. Flow cytometry is illustrated according to the concentrations of compounds. Values are expressed as a percentage of the control. Each bar represents the mean \pm standard deviation of tests performed in triplicates representative of three independent assays

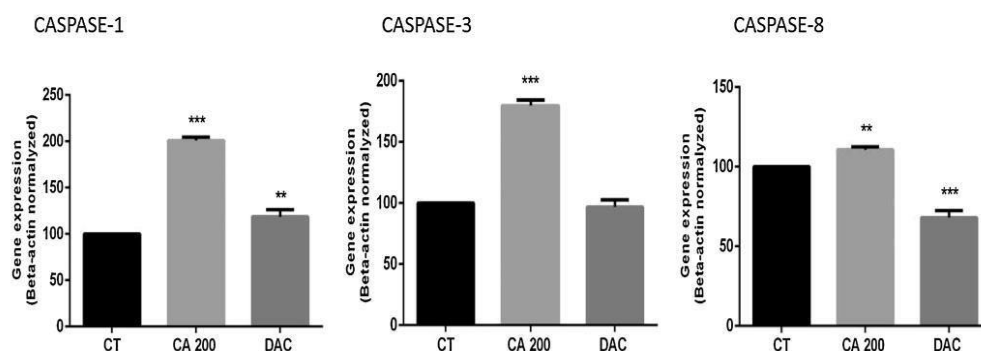


Fig. 3 Effect of caffeic acid and dacarbazine on caspase-1, caspase-3 and caspase-8 gene expression of SK-Mel-28 cells

after treatment with caffeic acid compared to cells that did not receive treatment indicating that caffeic acid-induced cell death may be caspase-dependent. This assumption is supported by data from the literature which suggests that caffeic acid has the potential to increase caspases levels in tumor cells, leading to apoptosis-mediated cell death [16, 20].

It is known that apoptosis and cell cycle dysregulation are closely related events and that an interruption in cell progression can culminate in cell death [28]. Changes in cell cycle checkpoints and uncontrolled cell proliferation are characteristics common to many cancers [29–32]. In our study, caffeic acid induced cell cycle arrest in the G0/G1 phase. Murad et al. [25] already reported for human colon adenocarcinoma cells that caffeic acid induced cell cycle arrest at G1 phase, which is an indicator of apoptosis because cells are unable to reach the mitosis stage and multiply. Complementary, there is a large body of evidence showing that blocking cell cycle at some stage is a common feature for many natural compounds, such as phenolic compounds. Caffeic acid was shown to induce cell cycle arrest in many other cancer types as non-small-cell lung [33], head and neck squamous carcinoma [34], and breast cancer [35]. Other phenolic compounds shown to have similar effects are chlorogenic acid [36] and also resveratrol and quercetin [37]. In our study, caffeic acid promoted an increase in G0/G1 and a decrease in the S and G2/M cell cycle phases showing that possibly by this mechanism, alongside with other effects, caffeic acid exerts its antitumor activity on melanoma cells as demonstrated for other tumors.

In addition, melanoma cells with and without dacarbazine and caffeic acid treatments were evaluated for 7 days by the colony formation test. The clonogenic assay tests the ability of cells to divide and form colonies when exposed to an agent [38]. There was a drastic decrease in the formation of colonies of cells treated with dacarbazine and caffeic

acid (Table 2). All concentrations of caffeic acid, as well as dacarbazine, significantly inhibited colony formation. It is worth to mention that the loss of reproductive capacity and proliferation are very common features in the mechanisms of cell death for cancer cells. A cell which is not able to divide into other cells and proliferate could be considered dead and this is referred to as loss of reproductive integrity [38].

Moreover, it is relevant to comment about some *in vivo* research on the antitumor effect of caffeic acid against CM performed with human subjects or animal models. To the best of our knowledge, there are no studies so far, such as clinical trials, testing the antitumor effect of caffeic acid on melanoma in humans. Thus, it is hard to predict if the effective antitumor concentrations found in our study would likely have any effect against human melanoma cells *in vivo*. A complete biological system is far more complex than an *in vitro* model mainly because there are many other cell types and biological conditions that could interfere in the efficacy of a substance of interest.

Table 2 Number of colonies formed after 7 days (% of control)

Groups	Number of colonies (% of control)
Control	100 ± 1
Caffeic acid 25 µM	0.41 ± 0.44***
Caffeic acid 50 µM	0.15 ± 0.015***
Caffeic acid 100 µM	0.12 ± 0.016***
Caffeic acid 150 µM	0.12 ± 0.016***
Caffeic acid 200 µM	0.14 ± 0.028***
Dacarbazine 1 mg/mL	1.30 ± 0.87***

Values are expressed as a percentage of the control. The tests were performed in triplicates representative of three independent assays

***Indicates statistical significance at $p \leq 0.001$

Complementary, there are only a few studies addressing the effect of caffeic acid on melanoma in animal models using a caffeic acid derived molecule, caffeic acid phenethyl ester (CAPE), an ester derived of caffeic acid, which is an active component of propolis, widely used in folk medicine. Results of an *in vivo* investigation showed the efficacy of CAPE against a skin B16-F0 melanoma tumor model in C57BL/6 mice. Doses of CAPE (10, 20 and 30 mg/Kg/day) inhibited tumor size growth up to 57% [39]. A more recent study using the same approach suggested that the antitumor effect observed against melanoma could be due to the inhibition of the PI3K/AKT/XIAP pathway [40]. Authors observed that tumors from CAPE-treated mice presented decreased phosphorylation of the mammalian target of rapamycin, the protein level of X-linked inhibitor of apoptosis protein and phosphoinositide 3-kinase, AKT, and increased the cleavage of caspase-3 leading to apoptosis in melanoma tumor cells *in vivo*.

In summary, we showed for the first time that caffeic acid has a strong antitumor effect on the SK-Mel-28 melanoma cell line *in vitro*, mainly by exerting an antiproliferative and apoptotic effect on these cells and, therefore, may be a promising natural agent for CM treatment. Although we found encouraging results, this study presents some limitations as the fact that we did not investigate the synergism between caffeic acid and the chemotherapeutic drug dacarbazine, which could improve even more the antitumor response seen by these agents alone. In addition, we did not investigate if caffeic acid would present any genotoxic effect on healthy cells, such as white blood cells. Also, although we only performed an *in vitro* investigation to assess the antitumor activity of caffeic acid on melanoma cells, our results point out to future studies using animal models to verify if the *in vitro* results still apply to an *in vivo* situation. Finally, based on our results, this study could help to provide new insights for CM treatment in the sense of investigating future novel therapeutic approaches based on natural compounds, as caffeic acid, for the management of patients with melanoma.

Funding The authors would like to thank the financial support of CAPES [CAPES/PROEX—Process Numbers: 23038.005848/2018-31 and 88882.182142/2018-01] and CNPq [MDB Project. No. 449485/2014-5], Brazil. Funding sources are non-profit governmental agencies and had no role in study design, in the collection, analysis, and interpretation of the data, in the writing of the manuscript, and in the decision for publication.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they no conflicts of interest.

Ethical approval All procedures performed in this study involving human participants were in accordance with the ethical standards of

the institutional and/or national research committee and with the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants in the study.

References

- O'Sullivan J, O'Connor D (2018) The modern approach to targeting melanoma. In: Human skin cancers—pathways, mechanisms, targets and treatments. InTechOpen, London
- Akbani R, Akdemir KC, Aksoy BA et al (2015) Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell* 161:1681–1696
- Garbe C, Eigentler TK, Keilholz U, Hauschild A, Kirkwood JM (2011) Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *Oncologist* 16:5–24
- Gogas HJ, Kirkwood JM, Sondak VK (2007) Chemotherapy for metastatic melanoma: time for a change? *Cancer* 109:455–464
- Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S, Gore M, Aamdal S, Cebon J, Coates A, Dreno B, Henz M, Schadendorf D, Kapp A, Weiss J, Fraass U, Statkevich P, Muller M, Thatcher N (2000) Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol* 18:158–166
- Sanlorenzo M, Vujic I, Posch C, Dajee A, Yen A, Kim S, Ashworth M, Rosenblum MD, Algazi A, Osella-Abate S, Quaglino P, Daud A, Ortiz-Urda S (2014) Melanoma immunotherapy. *Cancer Biol Ther* 15:665–674
- Franklin C, Livingstone E, Roesch A, Schilling B, Schadendorf D (2017) Immunotherapy in melanoma: recent advances and future directions. *Eur J Surg Oncol* 43:604–611
- Tapiero H, Tew K, Nguyen Ba G, Mathé G (2002) Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacother* 56:200–207
- Shi J, Yu J, Pohorly JE, Kakuda Y (2003) Polyphenolics in grape seeds—biochemistry and functionality. *J Med Food* 6:291–299
- Weng CJ, Yen GC (2012) Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treat Rev* 38:76–87
- Jaganathan SK (2012) Growth inhibition by caffeic acid, one of the phenolic constituents of honey, in HCT 15 colon cancer cells. *Sci World J* 2012:372345
- Assmann CE, Cadoná FC, Bonadiman BDSR, Dornelles EB, Trevisan G, Cruz IBMD (2018) Tea tree oil presents *in vitro* antitumor activity on breast cancer cells without cytotoxic effects on fibroblasts and on peripheral blood mononuclear cells. *Biomed Pharmacother* 103:1253–1261
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63
- Konopka K, Pretzer E, Felgner PL, Düzgüneş N (1996) Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1312:186–196
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J Immunol Methods* 184:39–51
- da Silva LM, Frión-Herrera Y, Bartolomeu AR, Gorgulho CM, Sforzin JM (2017) Mechanisms involved in the cytotoxic action

- of Brazilian propolis and caffeic acid against HEp-2 cells and modulation of P-glycoprotein activity. *J Pharm Pharmacol* 69:1625–1633
17. Cubillos-Rojas M, Amair-Pinedo F, Peiró-Jordán R, Bartrons R, Ventura F, Rosa JL (2014) The E3 ubiquitin protein ligase HERC2 modulates the activity of tumor protein p53 by regulating its oligomerization. *J Biol Chem* 289:14782–14795
 18. Kampa M, Alexaki V, Notas G, Nifi AP, Nistikaki A, Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Kouimtoglou E, Blekas G, Boskou D, Gravanis A, Castanas E (2004) Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res* 6:R63–R74
 19. Takahashi H, Nguyen BCQ, Uto Y, Shahinozaman M, Tawata S, Maruta H (2017) 1,2,3-Triazolyl esterization of PAK1-blocking propolis ingredients, artemillin C (ARC) and caffeic acid (CA), for boosting their anti-cancer/anti-PAK1 activities along with cell-permeability. *Drug Discov Ther* 11:104–109
 20. Chang WC, Hsieh CH, Hsiao MW, Lin WC, Hung YC, Ye JC (2010) Caffeic acid induces apoptosis in human cervical cancer cells through the mitochondrial pathway. *Taiwan J Obstet Gynecol* 49:419–424
 21. Huang W, Seo J, Willingham SB, Czyzewski AM, Gonzalgo ML, Weissman IL, Barron AE (2014) Learning from host-defense peptides: cationic, amphiphatic peptoids with potent anticancer activity. *PLoS ONE* 9:e90397
 22. Mulder KC, Lima LA, Miranda VJ, Dias SC, Franco OL (2013) Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. *Front Microbiol* 4:321
 23. Búfalo MC, Sforzin JM (2015) The modulatory effects of caffeic acid on human monocytes and its involvement in propolis action. *J Pharm Pharmacol* 67:740–745
 24. Kilani-Jaziri S, Mokdad-Bzeouich I, Krifa M, Nasr N, Ghedira K, Chekir-Ghedira L (2017) Immunomodulatory and cellular antioxidant activities of caffeic, ferulic, and p-coumaric phenolic acids: a structure-activity relationship study. *Drug Chem Toxicol* 40:416–424
 25. Murad LD, Soares Nda C, Brand C, Monteiro MC, Teodoro AJ (2015) Effects of caffeic and 5-caffeoylquinic acids on cell viability and cellular uptake in human colon adenocarcinoma cells. *Nutr Cancer* 67:532–542
 26. Chen YN (2017) Dacarbazine inhibits proliferation of melanoma FEMX-1 cells by up-regulating expression of miRNA-200. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 21:1191–1197
 27. Baharara J, Amini E, Nikdel N, Salek-Abdollahi F (2016) The cytotoxicity of dacarbazine potentiated by sea cucumber saponin in resistant B16F10 melanoma cells through apoptosis induction. *Avicenna J Med Biotechnol* 8:112–119
 28. He J, Xu Q, Jing Y, Agani F, Qian X, Carpenter R, Li Q, Wang XR, Peiper SS, Lu Z, Liu LZ, Jiang BH (2012) Reactive oxygen species regulate ERBB2 and ERBB3 expression via miR-199a/125b and DNA methylation. *EMBO Rep* 13:1116–1122
 29. Grabsch H, Takeno S, Parsons WJ, Pomjanski N, Boecking A, Gabbert HE, Mueller W (2003) Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1, BUBR1, and BUB3 in gastric cancer-association with tumour cell proliferation. *J Pathol* 200:16–22
 30. Pinto M, Vieira J, Ribeiro FR, Soares MJ, Henrique R, Oliveira J, Jerónimo C, Teixeira MR (2008) Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1 and BUBR1 is associated with genomic complexity in clear cell kidney carcinomas. *Cell Oncol* 30:389–395
 31. Burum-Auensen E, DeAngelis PM, Schjølberg AR, Røislien J, Mjåland O, Clausen OP (2008) Reduced level of the spindle checkpoint protein BUB1B is associated with aneuploidy in colorectal cancers. *Cell Prolif* 41:645–659
 32. Kato T, Daigo Y, Aragaki M, Ishikawa K, Sato M, Kondo S, Kaji M (2011) Overexpression of MAD2 predicts clinical outcome in primary lung cancer patients. *Lung Cancer* 74:124–131
 33. Min J, Shen H, Xi W, Wang Q, Yin L, Zhang Y, Yu Y, Yang Q, Wang ZN (2018) Synergistic anticancer activity of combined use of caffeic acid with paclitaxel enhances apoptosis of non-small-cell lung cancer H1299 cells in vivo and in vitro. *Cell Physiol Biochem* 48:1433–1442
 34. Dziedzic A, Kubina R, Kabala-Dzik A, Tanasiewicz M (2017) Induction of cell cycle arrest and apoptotic response of head and neck squamous carcinoma cells (Detroit 562) by caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester derivative. *Evid Based Complement Altern Med* 2017:6793456
 35. Kabala-Dzik A, Rzepecka-Stojko A, Kubina R, Jastrzębska-Stojko Z, Stojko R, Wojtyczka RD, Stojko J (2017) Comparison of two components of propolis: caffeic acid (CA) and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) induce apoptosis and cell cycle arrest of breast cancer cells MDA-MB-231. *Molecules* 22:E1554
 36. Sadeghi Ekbatan S, Li XQ, Ghorbani M, Azadi B, Kubow S (2018) Chlorogenic acid and its microbial metabolites exert anti-proliferative effects, S-phase cell-cycle arrest and apoptosis in human colon cancer caco-2 cells. *Int J Mol Sci* 19:E723
 37. Gokbulut AA, Apohan E, Baran Y (2013) Resveratrol and quercetin-induced apoptosis of human 232B4 chronic lymphocytic leukemia cells by activation of caspase-3 and cell cycle arrest. *Hematology* 18:144–150
 38. Munshi A, Hobbs M, Meyn RE (2005) Clonogenic cell survival assay. *Methods Mol Med* 110:21–28
 39. Kudugunti SK, Vad NM, Ekogbo E, Moridani MY (2011) Efficacy of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in skin B16-F0 melanoma tumor bearing C57BL/6 mice. *Investig N Drugs* 29:52–62
 40. Pramanik KC, Kudugunti SK, Fofaria NM, Moridani MY, Srivastava SK (2013) Caffeic acid phenethyl ester suppresses melanoma tumor growth by inhibiting PI3K/AKT/XIAP pathway. *Carcinogenesis* 34:2061–2070

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

4.2 MANUSCRITO

Caffeic acid alters ectonucleotidase activity and reduces migration in human cutaneous melanoma cells

Luana Paula Pelinson¹, Beatriz da Silva Rosa Bonadiman², Filomena Marafon², Tais Vidal Palma¹, Charles Elias Assmann¹, Cinthia Melazzo de Andrade², Maria Rosa Chitolina Schetinger¹, Vera Maria Melchior Morsch¹, Margarete Dulce Bagatini^{1,3}

¹Postgraduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

² Postgraduate program in Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

³Academic coordinator, Chapecó campus, Federal University of the Southern Border, Chapecó, SC, Brazil.

Caffeic acid alters ectonucleotidase activity and reduces migration in human cutaneous melanoma cells

Luana Paula Pelinson¹, Beatriz da Silva Rosa Bonadiman², Filomena Marafon², Tais Vidal Palma¹, Charles Elias Assmann¹, Cinthia Melazzo de Andrade², Maria Rosa Chitolina Schetinger¹, Vera Maria Melchior Morsch¹, Margarete Dulce Bagatini^{1,3}

¹Postgraduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

² Postgraduate program in Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

³Academic coordinator, Chapecó campus, Federal University of the Southern Border, Chapecó, SC, Brazil.

Abstract

Cutaneous melanoma (CM) is characterized by rapid progression and high lethality when not treated in the earliest stages. The malignancy of this type of cancer is substantially attributed to metastasis, the capacity of cancer cells to invade surrounding tissues and to migrate to distant parts of the body. This phenomenon is responsible for most deaths related to CM. The vast majority of patients affected by this disease show resistance to chemotherapeutic drugs, rendering treatment ineffective. In this sense, it is extremely important to develop new agents for CM treatment. One of the sources of great interest in this search are compounds of natural origin. Among these, are caffeic acid, which has demonstrated a broad spectrum of pharmacological activities as well as antitumor effects in various types of cancer. Therefore, the objective of this study was to examine the effects of caffeic acid on the activity of purinergic enzymes and oxidative stress as well as its effect on migration and viability in SK-Mel-28 cells. Cells were cultured in ideal conditions and treated with 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M and 200 μ M of caffeic acid for 24 hours. We measured the effects on viability, migration, NTPDase1/CD39, ecto-5'-nucleotidase/CD73 and adenosine deaminase activities, oxidative stress parameters and levels of antioxidant molecules. We found that caffeic acid modulated the purinergic system, increasing nucleotide hydrolysis at higher concentrations, resulting in reduced viability and cell migration in the cutaneous melanoma strain. We showed that modulation of the purinergic system could be a new target to control the formation and progression of metastasis in CM. This study provides original information regarding effects by which caffeic acid may play a key role in preventing tumor progression in human melanoma.

Keywords: cancer, metastasis, natural compounds, migration, nucleotides.

1. Introduction

Cutaneous melanoma (CM) is a neoplasm that arises from the malignant transformation of skin melanocytes, cells responsible for melanin production (Milac & Negroiu, 2018). Melanoma is the least common among skin tumors, representing 5% of dermatological malignancies; however, it is the most aggressive because of its high propensity for metastasis, causing about 80% of skin cancer-related deaths (Slingsluff, 2011;

Bertolotto, 2013). The number of new cases of CM has been increasing rapidly in recent years (Callahan; Flaherty; Postow, 2016).

CM is characterized by rapid progression, high aggressiveness, and lethality when not treated in the earliest stages. The malignancy of this type of cancer is substantially attributable to the capacity of cancer cells to invade surrounding tissues and to migrate to distant parts of the body (Balch et al., 2009). This process, known as metastasis, accounts for the majority of deaths related to CM (Fang; Tian, 2017).

Studies have shown that purinergic signaling has an important relationship with CM and metastasis, playing a role in cell processes such as proliferation, differentiation, migration, and cell death (Visovatti, 2012; Robson, 2011). The nucleotides ATP, ADP, AMP, and the nucleoside adenosine are molecules that comprise the purinergic system, along with the enzymes responsible for the degradation of such molecules and their respective receptors (Burnstock et al., 2012).

Extracellularly, ATP is converted in ADP and then to AMP by enzymes known as ectonucleotidases (E-NTPDase or CD39). The enzyme 5'-nucleotidase (CD73) is responsible for the hydrolysis of AMP to adenosine; further, this molecule is hydrolyzed to inosine by the action of the enzyme adenosine deaminase (ADA). Together, these enzymes constitute a signaling regulation system that controls the levels, degradation, and formation of nucleotides (Gessi; Varani; Merigui, 2007; Antonioli et al., 2014).

Considering the strong resistance of CM to conventional chemotherapy, several studies have focused on the development of adjuvant therapeutic strategies. In this sense, caffeic acid, a naturally occurring phenolic compound found in several foods and beverages such as coffee, has gain attention. This compound has a variety of biological effects showing remarkably neuroprotective (Pinheiro Fernandes et al., 2014), antimicrobial (Sova, 2012), cardioprotective (Chlopcikova et al., 2004), and antidepressive activities (Takeda et al., 2002). Some evidence also suggested that caffeic acid also presents antitumor effects (Weng & Yen, 2012, Jaganathan et al., 2012); however, only a few studies have described the effects of this compound on cutaneous melanoma. Prior studies by our research team have shown alteration in the activity of ectoenzymes of lymphocytes and platelets after treatment with caffeic acid in rats, suggesting the ability of this molecule to modulate the purinergic system (Anwar et al., 2013).

In addition, literature on the inhibitory effects of caffeic acid on cell migration and invasion, with the potential reduction in the metastasis rate of cancer cells, are becoming more frequent in the scientific literature (Weng & Yen, 2012; Kabała-Dzik, et al, 2018). Nevertheless, the mechanisms by which the beneficial effects of caffeic acid are mediated are not fully understood.

Therefore, the objective of this study was to elucidate the effects of caffeic acid on the activity of purinergic enzymes in cutaneous melanoma cells. We hypothesized that caffeic acid would influence the purinergic system, affecting tumor cell migration and viability.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals, reagents, and equipment

All chemicals and reagents were of high analytical grade, purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US) or Merck (Darmstadt, Germany).

All spectrophotometric assays were performed on a SpectraMax® i3 Multimode plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

2.2 Cell culture protocols and experimental design

Human cutaneous melanoma cells (SK-Mel-28 cell line) were purchased from the Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ, RJ, Brazil) and were grown in culture flasks containing Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (high glucose and L-glutamine), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), antibiotics (penicillin/streptomycin) and antifungals (amphotericin B). Cells were maintained under controlled conditions of CO₂ (5%), humidity (95%), and temperature (37 °C). Culture medium was changed at least once every two days and cell were checked every day for cell morphology and for the presence of contaminants.

2.3 Treatment with caffeic acid

SK-Mel-28 melanoma cells were treated for 24 h with various concentrations of caffeic acid (25, 50, 100, 150 and 200 µM) for later experimental protocols. Caffeic acid was first diluted in 0.4 % ethanol and then DMEM culture medium was added to obtain different solutions.

2.4 Cell viability assays

Cell viability was evaluated using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay. MTT reagent was added to 96-well plates and was incubated for 1 h at 37° C. After the incubation period, the supernatants were removed and the cells were resuspended in 200 µL dimethyl sulfoxide (DMSO). The absorbance was read spectrophotometrically at 570 nm (Mosmann, 1983).

2.5 Cell migration

The analysis on the effect of caffeic acid on cell migration was performed following the wound healing method. Cells were grown in 12-well plates at 105 cells/well confluence. Subsequently, a lesion in the cell layer was induced using a pipette tip to form a small slit. Then, cells were treated with caffeic acid at 25, 50, 100, 150 and 200 µM, monitored and photographed under an inverted microscope at the beginning of the experiment (time 0) and after 24 h to measure the size of the slits (Burk, 1973).

2.6 Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was determined by the quantification of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), using malondialdehyde to generate the standard curve, following the modified method of Jentzsch et al. (1996). TBARS levels were expressed as nmol of malondialdehyde/mg of protein.

2.7 Superoxide radical

Superoxide radical (O₂⁻) was measured using a colorimetric protocol according to Rauhen et al. (2000). Absorbance was determined at 540 nm.

2.8 Levels of protein thiols

Levels of protein thiols (PSH) were determined according to Boyne and Elmann with adaptations. The levels were expressed as percentage in relation to the control.

2.9 Levels of non-protein thiols

Levels of non-protein thiols (NPSH) were determined according to Elmann (1959) with adaptations. The levels were expressed as percentage in relation to the control.

2.10 Levels of ascorbic acid

The levels of ascorbic acid were determined according to Jacques-Silva et al. (2001) and were expressed as milligrams ascorbic acid per mg of protein.

2.11 Levels of nitric oxide

Nitric oxide (NO) acts as an important signaling molecule in physiological conditions; however, under stress conditions, it can act as a pro-oxidant molecule. Total levels of NO were determined by the indirect detection method of organic nitrate following the method described by Choi et al. (2012). The absorbance was measured at 540 nm.

2.12 E-NTPDase and E-5'-nucleotidase assays

A total volume of cell preparation (0.4–0.6 mg/mL protein) was added to the reaction mixture of E-NTPDase or E-5'-nucleotidase and preincubated for 10 min at 37 °C, to a final volume of 200 µL. E-NTPDase activity was determined according to Lunke et al. (2003) The reaction was started by the addition of ATP or ADP as substrate at a final concentration of 1.0 mM. E-5'-nucleotidase was determined according to Heyman et al. (1984). Phosphate released by ATP, ADP, and AMP hydrolysis was measured using KH₂PO₄ as the standard. Controls were prepared to correct for nonenzymatic hydrolysis and all samples were analyzed in triplicate. Enzyme specific activities were expressed as nmol Pi released/min/mg of protein.

2.13 Adenosine deaminase (ADA) determination

ADA activity from platelets and lymphocytes was determined according to Giusti and Galanti (1984) based on the direct measurement of ammonia produced when adenosine deaminase acts in excess of adenosine. Briefly, 50 µL of cells reacted with 21 mmol/L of adenosine, pH 6.5 and incubated at 37 °C for 60 min. Subsequently, the reaction was stopped by adding a solution of 106.2 mM phenol and 167.8 mM sodium nitroprusside and a hypochlorite solution. The amount of ammonia produced was measured at 620 nm and the results were expressed as units per liter (U/L).

2.14 Statistical analysis

All measurements were analyzed using analysis of variance followed by the appropriate post hoc test using GraphPad Prism 6 Software. All data were expressed as mean \pm standard deviation. Differences in the probability of rejection of the null hypothesis were considered statistically significant ($p < 0.05$).

3. Results

We cultured SK-Mel-28 melanoma skin cells with culture medium and maintained them in appropriate conditions. Five concentrations of caffeic acid (25, 50, 100, 150 and 200 μM) were used to treat cells for 24 hours for further testing and evaluation.

We found that there was a reduction in cell viability when cells were treated with 100, 150 and 200 μM of CA for 24 hours when compared to untreated melanoma cells (control) using MTT assays (Figure 1). There was no difference in the percentage of viable cells when cells were treated with the vehicle compared to those not treated (results not shown).

To determine whether caffeic acid interfered with melanoma cell migration, we performed a wound healing assay. As can be observed in Figure 2, the wound healing assay revealed less cell migration after incubation with CA at 150 and 200 μM after 24 hours compared to control cells.

To evaluate alterations in purinergic enzymes in melanoma, we measured hydrolysis of nucleotides ATP, ADP and AMP in SK-Mel-28 cells. We found modulation of purinergic system enzymes by CA at various concentrations. Figure 3 shows the hydrolysis of ATP (A), ADP (B), and AMP (C).

The hydrolysis of ATP, ADP and AMP was significantly lower at 50 μM of CA than in control cells. By contrast, we observed greater ATP and AMP hydrolysis when the cells were treated with 100 and 200 μM of CA and greater ATP, ADP and AMP hydrolysis at 150 μM of CA than in control cells.

We evaluated ADA activity and no differences were observed between cells treated with CA and control cells at all concentrations tested (figure 4).

When evaluating oxidative stress parameters, we did not observe significant differences in TBARS (Figure 5), superoxide radical (Figure 6 A) or nitric oxide (Figure 6 B) in melanoma cells with or without CA.

To assess whether CA would alter antioxidant levels, we analyzed levels of non-protein thiols (figure 7 A), protein thiols (figure 7 B) and vitamin C (figure 7 C). No significant differences were observed.

4. Discussion

CM is the most aggressive type of skin cancer and its incidence has increased considerably in recent decades (Garbe, Leiter, 2009). Malignant cells have a high capacity to diffuse, invading and spreading to adjacent tissues other than their original tissue, a process called metastasis (Oppenheimer, 2006). Metastatic tumors are extremely

aggressive, and are directly related to poor prognosis, difficulty of treatment, low survival and high mortality (Siegel et al., 2013; Schadendorf et al., 2015).

Studies have shown that purinergic signaling, an important nucleotide and nucleoside-mediated cellular communication pathway, has an important relationship with CM and metastasis, playing a role in various cellular processes, including proliferation, differentiation, migration and cell death (Burnstock, 2015; Burnstock, 2016; Bergamin, 2016) ATP in particular has recently been associated with cell invasion and metastasis (Fang; Tian, 2017).

Studies have shown an ability of CA to modulate the purinergic system by altering enzyme activity and nucleotide hydrolysis in normal cells (Anwar et al., 2013). Other studies suggest an inhibitory effect of CA on cell invasion and migration with potential action in reducing cancer cell metastasis (Weng & Yen, 2012, Kabała-Dzik, et al., 2018).

Based on these findings, we investigated whether this compound would have the same effect on CM cells and whether this effect could be related to modulation of the purinergic system. We found that CA did indeed modulate the purinergic system in various ways depending on the concentration used. When using 50 μM CA, we observed lower hydrolysis of the ATP, ADP and AMP nucleotides; however, this was not accompanied by changes in viability and cell migration parameters.

By contrast, concentrations of 150 and 200 μM of CA, in addition to modulating nucleotide hydrolysis, also caused a reduction in the number of viable cells and a reduction in cell migration. At these concentrations, the compound increased nucleotide hydrolysis, leading to further degradation of ATP and a reduction in its extracellular levels. Recent research shows that, in the tumor microenvironment, there is accumulation of extracellular ATP that triggers immunosuppressive and inflammatory effects on the cells of patients with cutaneous melanoma (Manica et al., 2019). The development of metastases is favored by an immunosuppressive environment that can greatly worsen condition of CM (Callahan; Flaherty; Postow, 2016). In vitro tests have shown that ATP enhance migration cell and stimulated invasion in various strains of human cancers, including melanoma, revealing that this nucleotide is a potential proinvasive factor in the tumor microenvironment and that its reduction may be a therapeutic target (Fang; Tian, 2017). Corroborating these studies, we found that the highest nucleotide hydrolysis stimulated by CA may reduce extracellular ATP levels, consequently reducing its stimulatory effects on cell migration (Figure 2).

We also observed that this higher nucleotide hydrolysis was also reflected in a reduction in cell viability. Recent in vivo studies have shown that accumulated ATP on the periphery of tumors can modulate a series of signals that control the inflammatory response and stimulate tumor proliferation (Braganhol, 2010). This reduction in cell viability caused by CA may be related to the increase of ATP hydrolysis, reducing its extracellular levels and consequently, reducing the stimulatory effects on melanoma cell proliferation.

In our previous study, we demonstrated the ability of CA at these same concentrations to disrupt cell cycle progression and induce apoptosis in SK-Mel-28 cells. Importantly, in our previous study, caffeic acid at these same concentrations showed selective cytotoxicity, reducing the viability of tumor cells but not that of healthy cells (Pelinson et al., 2019); this is essential for an antitumor agent (Huang et al., 2014; Mulder et al., 2013). Other studies also demonstrated protective effects of CA on non-tumor cells,

providing us with greater safety by proposing its action on the CM lineage (Prasad et al., 2009; Liang et al., 2015; Chaiprasongsuk et al., 2016).

Increased hydrolysis of AMP when cells were treated with the highest concentrations of CA may lead to an accumulation of extracellular adenosine. Adenosine mediates immunosuppressive and anti-inflammatory responses, acting as a protective agent of healthy tissues against attacks promoted by defense cells, promoting inhibition of the release of proinflammatory cytokines (Spychala, 2000). Nevertheless, there are controversies, with reports in the literature to the effect that this molecule has procarcinogenic properties, among them, promotion of tumor growth and stimulation of angiogenesis; both these effects would further aggravate the health status of patients with CM (Gessi; Varani; Merigui, 2007; Antonioli et al., 2014).

Taken together, our data suggest that CA treatment is effective in modulating the purinergic system, increasing ATP hydrolysis at higher concentrations, possibly reducing its extracellular levels, resulting in reduced viability and cell migration in cutaneous melanoma cells. We also demonstrated that these concentrations increase AMP hydrolysis and do not interfere with ADA activity, possibly causing an accumulation of extracellular adenosine. Although it was not observed in this study, this accumulation of adenosine can worsen the condition of CM, because this molecule is known to have pro-carcinogenic effects.

Therefore, caution should be exercised when proposing the use of CA in CM and further studies should be conducted to better clarify these effects. Although we have only performed an *in vitro* investigation to evaluate the activity of caffeic acid on the purinergic system in melanoma cells, our results point to its use as a new therapeutic target. Nevertheless, future studies are needed to further clarify the mechanisms of CA and to verify if *in vitro* results can be translated to *in vivo* conditions.

5. Conclusion

Modulation of the purinergic system could be a new target to control the formation and progression of metastasis in CM. Our study contributes new concepts for the treatment of CM as well as investigations of future therapeutic approaches based on natural compounds such as caffeic acid for the treatment of patients with CM.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no competing interests regarding the publication of this paper.

Funding

The authors would like to acknowledge the funding received by the following Brazilian Agencies: CAPES, CNPq.

References

- Antonioli, L., Haskó, G., Fornai, M. et al. (2014). Adenosine pathway and cancer: where do we go from here? *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 18, 973-977.
- Anwar, J., Spanevello, R.M., Pimentel, V.C., et al. (2013). Caffeic acid treatment alters the extracellular adenine nucleotide hydrolysis in platelets and lymphocytes of adult rats. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 459-466.
- Balch, C.M., Gershenwald, J.E, Soong, S. et al. (2009). Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of Clinical Oncology*, 27, 6199-6206.
- Bergamin, L.S. (2016). Envolvimento do Sistema Purinérgico, da Enzima Ciclooxigenase 2 e Sistema Imune no Desenvolvimento e Progressão de Glioblastoma Multiforme e Novas Alternativas Terapêuticas para esse Tipo Tumoral. Tese de doutorado. Porto Alegre, RS, Brasil.
- Bertolotto, C. (2013). Melanoma: From Melanocyte to Genetic Alterations and Clinical Options. *Scientifica*, 2013, 1-22, 2013.
- Boyne, A.F., Ellman, G.L. (1972). A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Analytical Biochemistry*, 46, 639-53.
- Braganhól, E. B. (2010). Sistema purinérgico e a progressão dos gliomas: avaliação de parâmetros proliferativos e inflamatórios. Tese de doutorado. Porto Alegre, RS, Brasil.
- Burk, R.R. (1973). A factor from a transformed cell line that affects all migration. *National Academy of Sciences*, 70, 368-372.
- Burnstock, G., Knight, G.E., Greig, A.V.H. (2012). Purinergic signaling in healthy and diseased skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 132, 526-546.
- Burnstock, G. (2015). Blood cells: an historical account of the roles of purinergic signalling, *Purinergic Signal*, 11, 411-434.
- Burnstock, G. (2016). Short-and long-term (trophic) purinergic signalling, *Philosophical Transaction of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371, 20150422.
- Callahan, M.K., Flaherty, C.R., Postow, M.A. (2016). Melanoma. *Cham: Springer International Publishing*, 167.
- Chaiprasongsuk, A., Onkoksoong, T., Pluemsamran, T. et al. (2016). Photoprotection by dietary phenolics against melanogenesis induced by UVA through Nrf2-dependent antioxidant responses. *Redox Biology*, 8, 79-90.
- Chlopčíková, Š., Psotova, J., Miketova, P. et al. (2004). Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes Part II. Caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids. *Phytotherapy Research*, 18, 408-413.

- Choi, W.S., Shin, P.G., Lee, J.H. et al. (2012). The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells, *Cellular Immunology*, 280 164e170.
- Ellmann, G. L. (1959). Tissue sulphhydryl groups. *Archives of Biochemistry. Biophysics*, 82, 70-77.
- Fang, W.G., Tian, X.X. (2017). Identification of a new pro-invasion factor in tumor microenvironment: progress in function and mechanism of extracellular ATP, Beijing da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Peking University. *Health sciences*, 49, 188–195.
- Garbe, C., Leiter, U. (2009). Melanoma epidemiology and trends. *Clinics in Dermatology*, 27, 3-9.
- Gessi, K., Varani, S., Merighi, S. (2007). Adenosine and lymphocyte regulation, *Purinergic Signalling*, 3, 109-116.
- Giusti, G., Galanti, B. (1984). Colorimetric method. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of Enzymatic Analysis. Weinheim: Verlag Chemie*, 315–323.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R.; Karin, M. (2011). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, 140, 883–899.
- Heyman, D., Reddington, M., Kreutzberg, G.W. (1984). Subcellular localization of 5'nucleotidase in rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 43, 971–978.
- Huang W., Seo, J., Willingham, S.B. et al. (2014) Learning from host-defense peptides: cationic, amphipathic peptoids with potent anticancer activity. *PLoS ONE*, 9, 2, e90397.
- Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L. C. et al. (2001). Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacology and Toxicology*, 88, 119–125.
- Jaganathan, S.K. (2012). Growth inhibition by caffeic acid, one of the phenolic constituents of honey, in HCT 15 colon cancer cells. *The Scientific World Journal*, 1-8.
- Jentsch, A. M., Bachmann, H., Furst, P. et al. (1996). Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 251–6.
- Kabała-Dzik, A., Rzepecka-Stojko, A., Kubina, R. et al. (2018). Caffeic Acid Versus Caffeic Acid Phenethyl Ester in the Treatment of Breast Cancer MCF-7 Cells: Migration Rate Inhibition. *Integrative Cancer Therapies*, 17, 1247–1259.
- Landskron, G, De La Fuente, M., Thuwajit, P. et al. (2014). Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *Journal of Immunology Research*, v. 2014.
- Liang, G., Shi, B., Luo, W. et al. (2015). The protective effect of caffeic acid on global cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Behavioral and Brain Functions*, 11, 1-10.

Lunkes, G.I, Lunkes, D., Stefanello, F. et al. (2003). Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thrombosis Research*, 109, 189–194.

Manica, A., Da Silva, A.M., Cardoso, A.M. et al. (2018). High levels of extracellular ATP lead to chronic inflammatory response in melanoma patients. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119, 3980–3988.

Manica, A., Bonadiman, B. R. S., Cardoso, A. M., et al. (2019). The signaling effects of ATP on melanoma-like skin cancer. *Cellular signalling*, 59, 122-130.

Milac, A.L. & Negroiu, G. (2017). The multiple roles of tyrosinase-related protein-2/L-dopa chrome tautomerase in melanoma: biomarker, therapeutic target, and molecular driver in tumor progression, *Hum.Ski.Cancers–Pathways, Mech.Targets Treat.*

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55– 63.

Mulder, K.C., Lima, L.A., Miranda, V.J. et al. (2013) Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. *Front Microbiology*, 4, 321.

Oppenheimer, S.B. (2006). Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances. *Acta Histochemica*, 108, 327-334.

Pelinson, L.P.; Assmann, C.E.; Palma, T.V., et al. (2019). Antiproliferative and apoptotic effects of caffeic acid on SK-Mel-28 human melanoma cancer cells. *Molecular Biology Reports*, 2019.

Pinheiro Fernandes, F.D., Fontenele, A.P.M, De Sousa, J.C.N. et al. (2014). Caffeic acid protects mice from memory deficits induced by focal cerebral ischemia. *Behavioural Pharmacology*, 25, 637-647.

Prasad, N.R., Jeyanthimala, K., Ramachandran, S. (2009). Caffeic acid modulates ultraviolet radiation-B induced oxidative damage in human blood lymphocytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 95, 196-203.

Rauen, U., Petrat, F., Li, T. et al. (2000). Hypothermia injury/cold-induced apoptosis: evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O₂-/H₂O₂ formation. *FASEB Journal*, 14, 1953e1964.

Robson, S.C. (2011). Role of CD73 and extracellular adenosine in disease: Presented by Maria P. Abbracchio. *Purinergic Signalling*, 7, 367-72.

Schadendorf, D., Fischer, D. E., Garbe, C. et al. (2015). Melanoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 23, 15003.

Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. (2013). Cancer Statistics. *CA: Cancer Journal of Clinicians*, 63, 11-30.

Slingluff, J.R.C.L., Flaherty, K., Rosenberg, A.S. et al. Cutaneous Melanoma. In: DeVita Jr VT, Lawrence, T. S.; Rosenberg, S. A. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. 9th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2011.

Sova, M. (2012). Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 12, 749-767.

Spychala, J. (2000). Tumor promoting functions of adenosine. *Pharmacology & Therapeutics*, 87, 161-173.

Takeda, H., Tsuji, M., Inazu, M. et al. (2002). Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *European Journal of Pharmacology*, 449, 261-267.

Visovatti, S.H., Hyman, M.C., Bouis, D. et al. (2012). Increased CD39 nucleotidase activity on microparticles from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *PLoS One*, 7, 7, e40829.

Weng, C., Yen, G. (2012). Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treatment Reviews*, 38, 76–87.

LEGENDS

FIGURE 1: Effect of caffeic acid (CA) treatment after 24 h on cell viability of SK-Mel-28 cells. Values are expressed as a percentage of the control. Each bar represents the mean \pm standard deviation of tests performed in triplicate, representative of three independent assays. *Denotes significant difference versus the control group (n=3 independent experiments). One-way ANOVA, followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test (P<0.05).

FIGURE 2: Potential inhibition of cell migration by caffeic acid through wound healing assay. Cell migration in the SK-Mel-28 line treated with 25, 50, 100, 150 and 200 μ M of caffeic acid immediately after injury (0 h) and 24 hours after injury (24 h). The graph shows migration after 24 hours. Values are expressed as a percentage and represent mean \pm standard deviation of three independent triplicate assays. *Denotes significant difference versus the control group (n=3 independent experiments). One-way ANOVA, followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test (P<0.05).

FIGURE 3: Effects of caffeic acid on NTPDase-1/CD39 and ecto-5'-nucleotidase/CD73 activity in SK-Mel-28 cells, using ATP (A) ADP (B) and AMP (C) as substrates in samples untreated (control) or treated with CA (25, 50, 100, 150 and 200 μ M) after 24 hours. Bars represent mean values \pm SEM. *Denotes significant difference versus the control group (n=3 independent experiments). One-way ANOVA, followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test (P<0.05).

FIGURE 4: Adenosine deaminase activity in SK-Mel-28 cells untreated (control) or treated with CA (25, 50, 100, 150 and 200 μ M) after 24 hours. Bars represent mean values \pm SEM. *Denotes significant difference versus the control group (n=3 independent experiments). One-way ANOVA, followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test (P<0.05).

FIGURE 5: Levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in SK-Mel-28 cells untreated (control) or treated with CA (25, 50, 100, 150 and 200 μ M). Bars represent mean values \pm SEM. *Denotes significant difference versus the control group (n=3 independent experiments). One-way ANOVA, followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test (P<0.05).

FIGURE 6: Effect of caffeic acid (CA) treatment after 24 h on superoxide radical (A) and nitric oxide (B) in SK-Mel-28 cells. Values are expressed as a percentage of the control. Each bar represents the mean \pm standard deviation of tests performed in triplicates representative of three independent assays.*Denotes significant difference versus the control group (n=3 independent experiments). One-way ANOVA, followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test (P<0.05).

FIGURE 7: Effects of caffeic acid on levels of non-protein thiols (A), protein thiols (B) and ascorbic acid (C) in SK-Mel-28 cells untreated (control) or treated with CA (25, 50, 100,

150 and 200 μM) after 24 hours. Bars represent mean values \pm SEM. *Denotes significant difference versus the control group (n=3 independent experiments). One-way ANOVA, followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test ($P<0.05$).

FIGURES

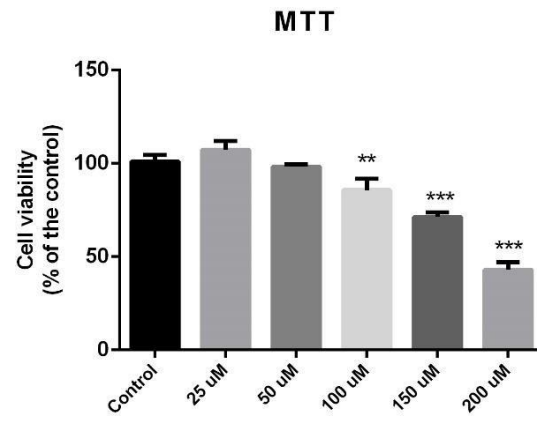


FIGURE 1.

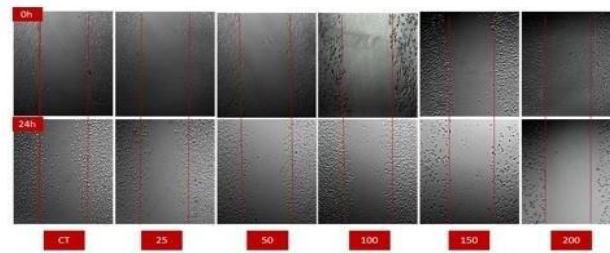
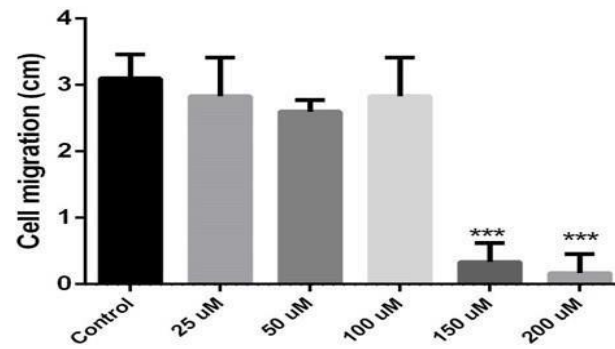
**Wound healing**

FIGURE 2.

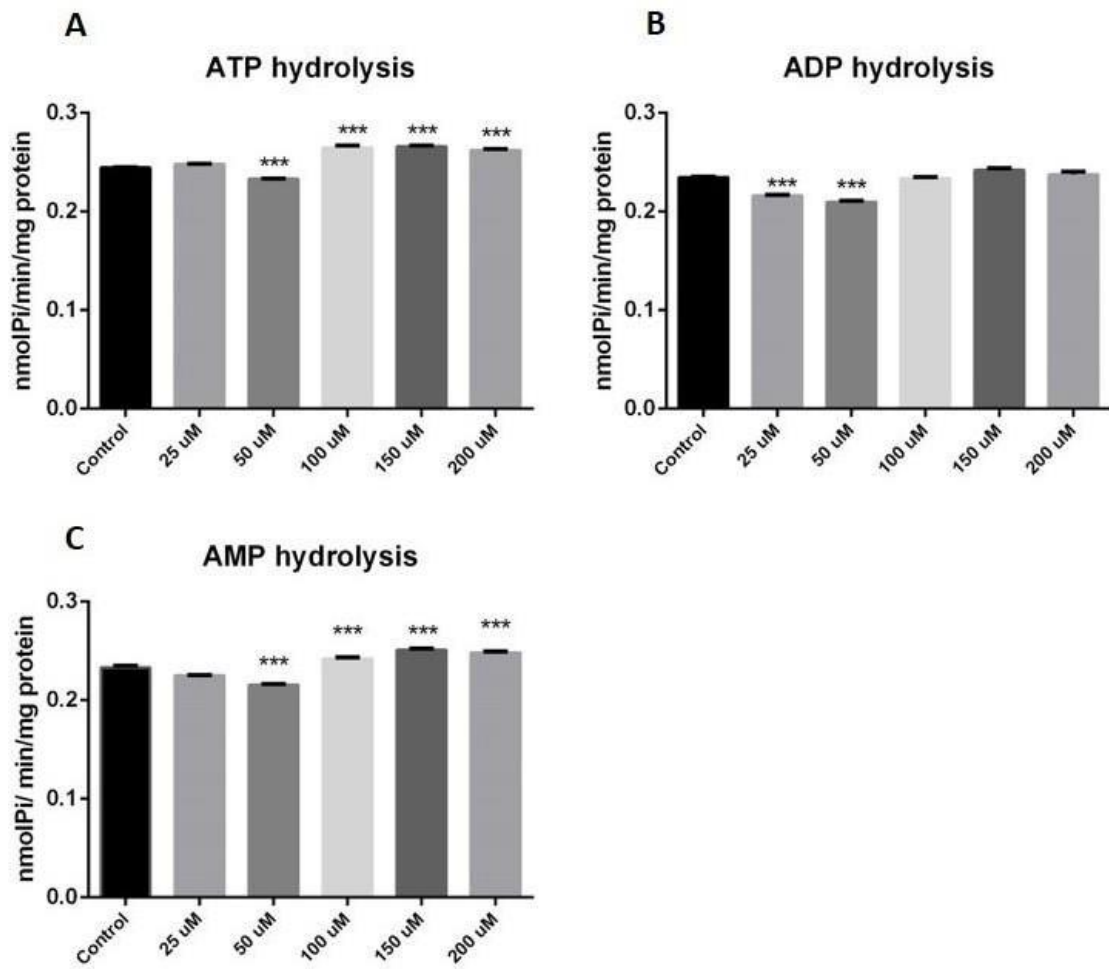


FIGURE 3.

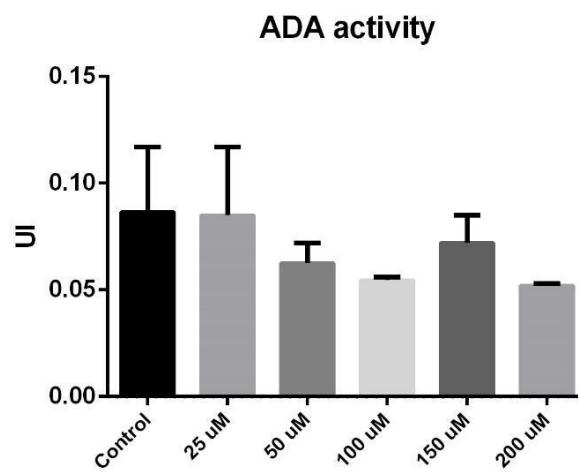


FIGURE 4.

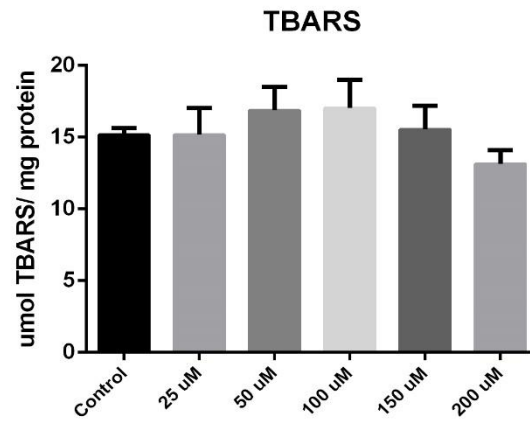


FIGURE 5.

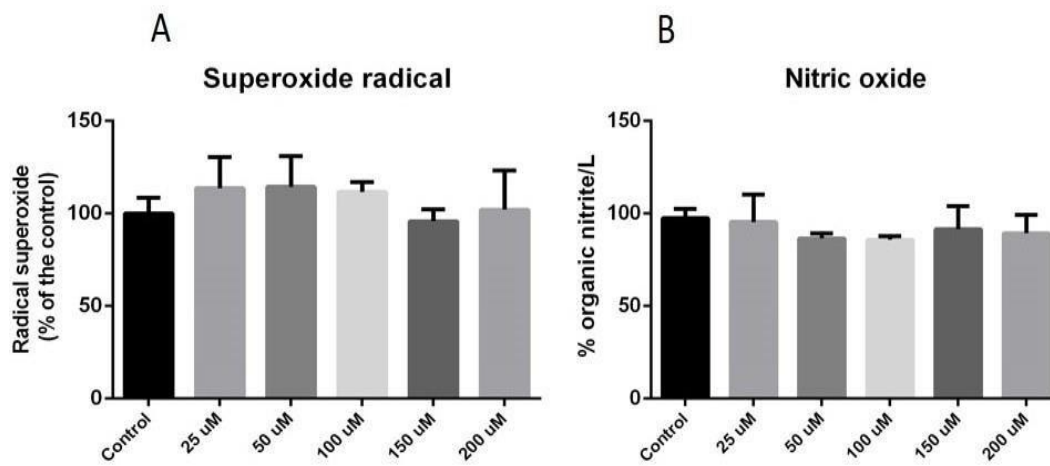


FIGURE 6.

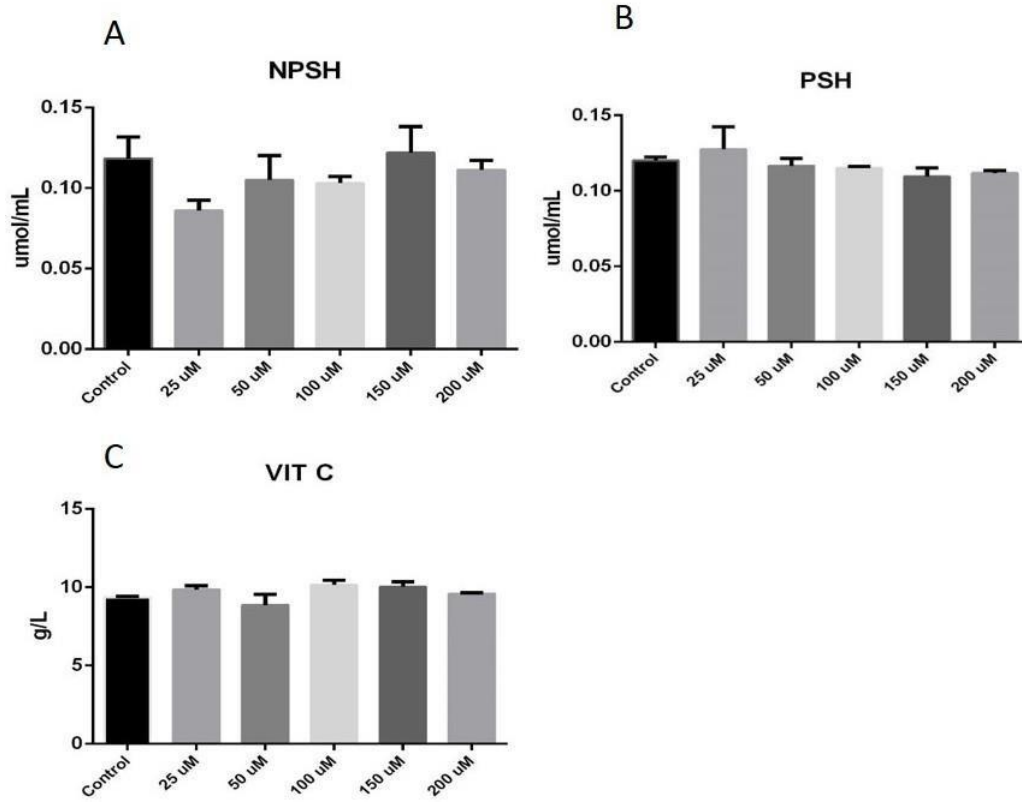


FIGURE 7.

5. DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que o AC foi citotóxico para as células de MC, apresentando capacidade de reduzir a viabilidade celular em comparação com o controle negativo (apenas meio de cultura) após 24h de tratamento. A dacarbazina, medicamento antineoplásico bastante utilizado para o tratamento do melanoma foi utilizada como controle positivo.

Corroborando com nossos resultados, pesquisas têm demonstrado que o AC apresentou a capacidade de reduzir a viabilidade em linhagens celulares de glioblastoma, de carcinoma de mama, de rim (LOPES, 2012), cervical (CHANG et al, 2010), de cólon (JAGANATHAN, 2012), de pulmão (TAKAHASHI et al., 2017), entre outros. E agora demonstramos que esse efeito também é visualizado em linhagem celular de melanoma cutâneo.

Deve salientar-se que para que um composto tenha um potencial antitumoral ideal é necessário que ele possua efeitos citotóxicos contra as células cancerígenas, mas que não apresente esse mesmo efeito em células normais, ou que esse efeito seja muito reduzido, possuindo assim um efeito contra as células do câncer e baixa toxicidade ao organismo (MULDER et al., 2013; HUANG, et al., 2014).

Além de possuir um efeito redutor da viabilidade das células de melanoma, o AC demonstrou um efeito contrário em cultura de células de polimorfonucleares. Corroborando com nossos resultados, pesquisas demonstram que diferente do efeito citotóxico evidenciado em células tumorais (JAGANATHAN, 2012; TAKAHASHI et al., 2017; SILVA et al., 2017), o AC apresenta efeitos protetores em células não tumorais (CHLOPCKOVA et al., 2004; PRASAD et al., 2009; LIANG et al., 2015; CHAIPRASONGSUK et al., 2016). Por apresentar uma toxicidade em células de melanoma, mas não apresentar esse mesmo efeito em células normais, podemos observar uma certa citotoxicidade seletiva do AC na linhagem SK-Mel-28, o que nos propicia uma maior segurança ao propor sua ação antitumoral na linhagem de MC.

A proliferação descontrolada é uma característica comum de todas as células tumorais (GRABSCH et al., 2003; PINTO et al., 2008; BURUM-AUENSEN et al., 2008; KATO et al., 2011) e é de fundamental importância identificar compostos que reduzam a taxa de proliferação nessas células (JAIN, R.; JAIN, S., 2011). Nesse sentido, utilizamos

o ensaio clonogênico para testar a capacidade das células de formarem colônias e nossos resultados demonstraram que todas as concentrações de AC testadas levaram a uma diminuição drástica na formação de colônias.

Sabe-se que as células cancerosas perdem a capacidade de regular seu ciclo celular e, assim, controlar a sua taxa de proliferação. Um passo limitante no ciclo celular, que muitas vezes não é regulada no câncer, é a progressão de células na primeira fase (G1) do ciclo para a fase S, o que leva a uma maior proliferação das células cancerosas (PALOZZA et al., 2009).

Complementarmente, há um grande corpo de evidências mostrando que o bloqueio do ciclo celular em algum estágio é um efeito comum de muitos compostos naturais, como os compostos fenólicos. Foi demonstrado que o AC induz a parada do ciclo celular em muitos tipos de câncer, como câncer de pulmão (MIN et al., 2018), carcinoma escamoso de cabeça e pescoço (DZIEDZIC et al., 2017) e o câncer de mama (KABAŁA-DZIK et al., 2017). Murad et al. já relataram que o AC induz parada do ciclo celular na fase G1 em células de adenocarcinoma do cólon humano. Da mesma forma, em nosso estudo, esse composto também promoveu parada do ciclo celular na fase G0/G1 nas células SK-Mel-28 (PELINSON et al., 2019). Sabe-se que a apoptose e a desregulação do ciclo celular são eventos intimamente relacionados e que uma interrupção na progressão celular pode culminar na morte celular (HE et al., 2012).

A deficiência ou bloqueio da apoptose é uma característica comum de muitas células tumorais, o que é considerado uma causa importante da resistência de tumores a terapia, uma vez que muitos tratamentos atuam através da indução da apoptose (JAGANATHAN, 2012). Os resultados também mostraram que houve indução de apoptose, na linhagem SK-MEL-28 após 24 horas de tratamento com o AC (150 e 200 μ M). De fato já era esperada indução de apoptose, uma vez que observamos parada no ciclo celular após 24 horas de tratamento com estas mesmas concentrações de AC, e esta costuma preceder o processo de morte por apoptose, como já demonstrado por outros estudos (D'AGNILLO & ALAYASH, 2001; ZANOTTO-FILHO et al., 2012).

No processo da apoptose, as caspases são capazes de clivar determinadas proteínas celulares e catalisar a ativação de outros membros dessa família, resultando em amplificação da cascata proteolítica. Em geral, a expressão gênica das caspases 1, 3 e 8 aumentou após o tratamento com AC em comparação com as células que não receberam

tratamento indicando mais uma vez que a morte celular induzida por esse composto acontece pelo processo de apoptose e é dependente de caspases. Esta suposição é apoiada por dados da literatura que sugerem que o AC tem o potencial de aumentar os níveis de caspases nas células tumorais, levando à morte celular apoptótica (SILVA et al., 2017; KAMPA et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2017; CHANG et al., 2010). Estudos evidenciaram a mesma ação do AC em linhagens de células de câncer de intestino (MURAD et al., 2015), câncer de laringe (SILVA et al., 2017), câncer de mama (KAMPA et al., 2004). Além disso, é provável que a apoptose induzida pelo composto nas células SK-Mel-28 aconteça pela via extrínseca, evidenciado pelo aumento da caspase-8, caspase iniciadora ativada na via extrínseca da apoptose, a qual ativa outras caspases efetoras, como a caspase-3 (KROEMER, 2007; VERMEULEN, 2005). Pesquisadores também evidenciaram indução de morte pelo processo de apoptose em células de melanoma provocado pela dacarbazina (CHEN, 2017; BAHARARA et al., 2016).

A migração das células tumorais é um processo crítico de invasão permitindo a adaptação dos tumores primários para a metástase (HE, et al., 2014). Tumores metastáticos são extremamente agressivos, e estão envolvidos diretamente ao mau prognóstico do paciente (ROBERTS et al, 2002). A descoberta de novos produtos naturais que possam bloquear o crescimento do câncer bem como inibir o processo de migração está entre os objetivos principais dos pesquisadores desta área para evitar o avanço tumoral (WENG & YEN, 2012, KABAŁA-DZIK, et al, 2018).

Nesse sentido, estudos demonstraram que a sinalização purinérgica tem uma importante relação com CM e metástase, desempenhando um papel em vários processos celulares, como proliferação, diferenciação, migração e morte celular (VISOVATTI, 2012; ROBSON, 2011). Várias pesquisas já foram desenvolvidas por nosso grupo de pesquisa evidenciando alterações na atividade das enzimas do sistema purinérgico em diversas patologias, entre elas o câncer e, inclusive, o melanoma cutâneo (BAGATINI et al., 2018; BALDISSARELLI et al., 2018; BATTISTI et al., 2013; CARDOSO et al., 2015; SCHETINGER et al., 2007; ZANINI et al., 2012; MANICA et al., 2017).

Ademais, estudos têm demonstrado uma capacidade do AC em modular o sistema purinérgico, alterando a atividade de enzimas e a hidrólise dos nucleotídeos em células normais. (ANWAR et al., 2013) Outras pesquisas também evidenciam um efeito inibitório do AC na invasão e migração celular com ação potencial na redução da

metástase de células cancerígenas (WENG & YEN, 2012, KABAŁA-DZIK, et al, 2018).

Em nossos resultados, o AC apresentou uma capacidade de modular o sistema purinérgico de formas diferentes de acordo com a concentração utilizada. Quando utilizamos 50 μM de AC, observamos uma menor hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP, porém isso não foi acompanhado por alterações nos parâmetros de viabilidade e migração celular.

Por outro lado, as concentrações de 150 e 200 μM de AC, além de modularem a hidrólise dos nucleotídeos, também ocasionaram uma redução no número de células viáveis e na migração celular. Esse composto aumentou a hidrólise dos nucleotídeos, levando a uma maior degradação de ATP, o que leva a uma redução nos seus níveis extracelulares. Estudos recentes demonstram que linhagens de melanoma apresentam uma hidrólise de ATP, ADP e AMP diminuída (BAGATINI et al., 2018; MANICA et al., 2019). Manica et al. (2019) demonstraram que essas células malignas hidrolisam de forma muito baixa esses nucleotídeos. Essa menor hidrólise pode levar a um acúmulo de ATP e a indução da proliferação celular (MANICA et al., 2019).

Pesquisas demonstram que este acúmulo de ATP extracelular no microambiente tumoral desencadeia um efeito imunossupressor e inflamatório nas células dos pacientes com melanoma, além de estimular a proliferação celular (BRAGANHOL, 2010; MANICA et al., 2019). Sabe-se que o desenvolvimento de metástases é favorecido por um ambiente imunossupressor, o que pode agravar muito o quadro do MC (CALLAHAN; FLAHERTY; POSTOW, 2016). Ademais, células de diversos tipos de cancer, incluindo melanoma, apresentaram capacidade de aumentar a migração e estimular a invasão em testes in vitro quando estimuladas com o ATP, revelando que esse nucleotídeo é um fator pró-invasivo em potencial no microambiente tumoral e que sua redução pode ser um alvo terapêutico (FANG; TIAN, 2017). Essa redução na viabilidade e migração ocasionada pelo AC em nosso estudo pode estar relacionada à maior hidrólise do ATP e conseqüente redução dos seus efeitos estimulatórios sobre esses parâmetros.

No entanto, a hidrólise aumentada de AMP observado quando as células foram tratadas com as maiores concentrações de AC pode levar a um acúmulo de adenosina extracelular. Sabe-se que a adenosina medeia uma resposta imunossupressora e anti-inflamatória, atuando como agente protetor dos tecidos saudáveis contra os ataques promovidos pelas células de defesa, promovendo a inibição da liberação de citocinas

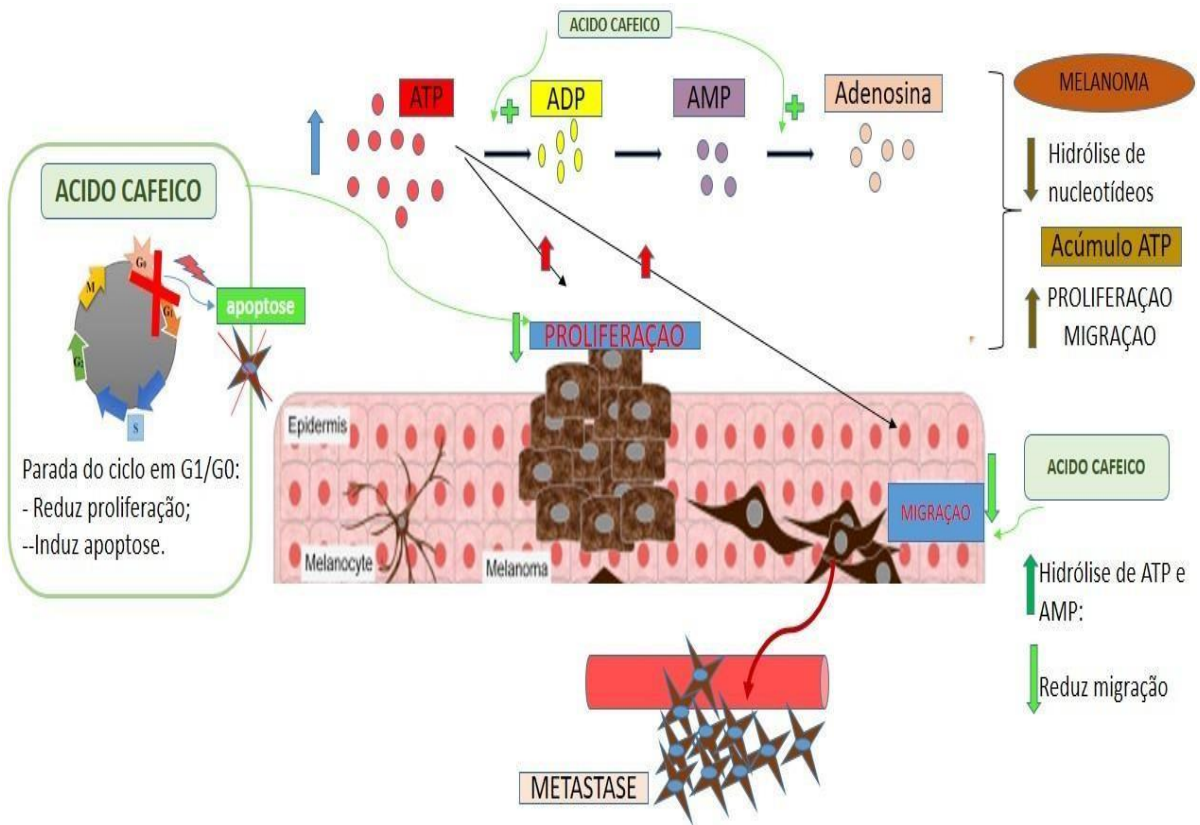
pró- inflamatórias (HASKÓ et al., 2009). Todavia, há controvérsias, possuindo relatos na literatura de que essa molécula apresenta propriedades pró-carcinogênicas, dentre estas, promover o crescimento tumoral e estímulo da angiogênese, fatos que podem agravar ainda mais o estado de saúde dos pacientes que já apresentam MC (GESSI; VARANI; MERIGUI, 2007; ANTONIOLI et al., 2014).

Em resumo, mostramos pela primeira vez que o ácido cafeico tem um forte efeito antitumoral na linhagem de melanoma SK-Mel-28, principalmente por exercer um efeito antiproliferativo e apoptótico, além de inibir a migração celular e, portanto, pode ser um agente natural promissor para tratamento de CM. Os dados sugerem uma parada de ciclo celular na fase G0/G1, onde as células ficam impossibilitadas de chegarem à etapa de mitose e, se multiplicarem, o que leva a uma redução na proliferação e induz morte celular por apoptose nas células de MC. Além disso, o AC foi eficaz em modular o sistema purinérgico, aumentando a hidrólise do ATP quando utilizadas as maiores concentrações, o que pode levar a uma redução nos níveis desse nucleotídeo e consequentemente reduzir a proliferação e migração celular nas células de MC.

Além disso, observamos que as menores concentrações de AC não apresentaram qualquer efeito sobre a indução de morte celular ou inibição do processo de migração celular, mas apresentaram forte efeito na inibição de formação de colônias, evidenciado no teste clonogênico. Esses resultados podem sugerir que as menores concentrações, apesar de não apresentarem efeito antitumoral após a consolidação do tumor, podem ser eficazes na prevenção da formação do MC. No entanto, esse efeito deve ser melhor investigado.

Finalmente, este estudo pode ajudar a fornecer novas idéias para o tratamento do MC no sentido de investigar novos alvos terapêuticos baseados no efeito de compostos naturais, como o ácido cafeico e que possam auxiliar os pacientes acometidos por essa patologia. Utilizando mais ensaios biológicos poderão ser melhor elucidados os mecanismos pelos quais esse composto ocasiona os efeitos observados na linhagem SK-Mel-28. Posteriormente, estudos adicionais devem ser realizados para evidenciar se esses resultados se reproduzem *in vivo* e também para determinar níveis seguros de utilização e eficácia terapêutica do composto em pacientes acometidos por essa patologia.

GRAPHICAL ABSTRACT



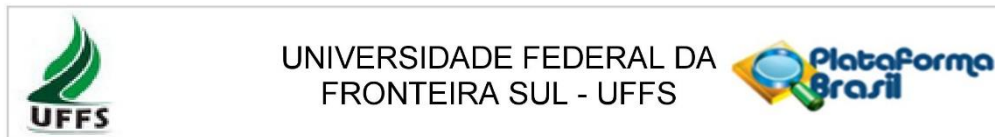
6. CONCLUSÕES

Neste trabalho podemos concluir que existe potencial antitumoral do ácido cafeico na linhagem de melanoma cutâneo SK-Mel-28, onde nos ensaios biológicos:

- Induziu parada do ciclo celular na fase G0/G1, resultando em redução do número de células viáveis e diminuição no processo de formação de novas colônias;
- Induziu morte através processo de apoptose dependente de caspases;
- Modulou o sistema purinérgico, evidenciado por aumento na hidrólise do ATP e AMP, o que resultou em capacidade migratória celular reduzida.

Indicando que o composto possui efeitos importantes no sentido de inibir a proliferação celular descontrolada, induzir morte celular e reduzir a capacidade migratória nessas células, sugerindo potencial ação no controle das metástases e da progressão do melanoma cutâneo. Esse trabalho pode ser útil para auxiliar o desenvolvimento de novos alvos e coadjuvantes terapêuticos com objetivo de reduzir a progressão tumoral em pacientes acometidos pelo melanoma cutâneo.

ANEXO: APROVAÇÃO COMITE DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de Enzimas que Degradam Nucleotídeos e Nucleosídeos de Adenina em Pacientes com Melanoma Cutâneo.

Pesquisador: Margarete Dulce Bagatini

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 33702814.5.0000.5564

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - UFFS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 822.782

Data da Relatoria: 19/10/2014

Apresentação do Projeto:

TRANSCRIÇÃO DO RESUMO:

O Melanoma Cutâneo (MC) é a neoplasia maligna com maior crescimento na última década, tornando-se um problema de saúde pública. No Brasil, as maiores taxas de incidência estão na região sul, devido aos hábitos e as características da população. Vários fatores podem estar envolvidos neste tipo de câncer inclusive o sistema purinérgico. O objetivo deste estudo será avaliar as enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeos de adenina em plaquetas e linfócitos de pacientes com MC. Serão selecionados 60 pacientes, com diagnóstico de MC, com idade entre 30 e 60 anos e 60 indivíduos saudáveis do mesmo sexo e na mesma faixa etária. Será realizada uma coleta de sangue, através de punção venosa para determinação dos parâmetros enzimáticos e da agregação plaquetária. O estudo do MC é de fundamental importância para diminuir a mortalidade e reduzir os gastos públicos, já que a frequência de novos casos está dobrando a cada década e os índices aumentando em pessoas jovens.

Objetivo da Pesquisa:

TRANSCRIÇÃO DOS OBJETIVOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO:

Objetivo Primário:

Endereço: Avenida General Osório, 413d - Ed. Mantelli da UFFS
Bairro: CENTRO **CEP:** 89.802-265
UF: SC **Município:** CHAPECO
Telefone: (49)2049-1478 **E-mail:** joseane@uffs.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



Continuação do Parecer: 822.782

Avaliar os marcadores do sistema purinérgico e enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeos de adenina em plaquetas e linfócitos de pacientes com Melanoma Cutâneo (MC).

Objetivo Secundário:

- Analisar a atividade das enzimas E-NTPDase, E-NPP, E-5'-Nucleotidase e ADA em plaquetas e linfócitos de pacientes com MC e em pacientes controles.
- Verificar a expressão das enzimas E-NTPDase e E-5'-Nucleotidase em plaquetas e linfócitos da população estudada.
- Quantificar o nível sorológico dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP, e do nucleosídeo adenosina em ambos os grupos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos estavam adequadamente descritos no TCLE. Foi solicitado que a informação fosse escrita no campo "Riscos e Benefícios" da plataforma brasil. Atendido.

Riscos e benefícios: de acordo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisadora atendeu às solicitações do CEP e o trabalho apresenta elevada relevância social e científica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

De acordo. Ver parecer consubstanciado do CEP número 816.552.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisadora atendeu às solicitações do CEP.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador(a)

A partir desse momento o CEP passa a ser corresponsável, em termos éticos, do seu projeto de pesquisa – vide artigo X.3.9. da Resolução 466 de 12/12/2012.

Fique atento(a) para as suas obrigações junto a este CEP ao longo da realização da sua

Endereço: Avenida General Osório, 413d - Ed. Mantelli da UFFS

Bairro: CENTRO

CEP: 89.802-265

UF: SC

Município: CHAPECO

Telefone: (49)2049-1478

E-mail: joseane@uffs.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



Continuação do Parecer: 822.782

pesquisa. Tenha em mente a Resolução 466 de 12/12/2012 principalmente, os artigos XI.1 e XI.2 itens c) ao h) , a Normativa 001/2013 e o Capítulo III da Resolução 251/1997.

A página do CEP-UFFS apresenta alguns pontos no documento "Deveres do Pesquisador" acessível no Link http://www.uffs.edu.br/images/proppg/Deveres_do_pesquisador_CEP.pdf

Atente:

- 1) No prazo máximo de 6 meses, a contar da emissão deste parecer consubstanciado, obedecidos os 20 dias antes da reunião do CEP do mês correspondente aos 6 meses, deverá ser enviado um relatório parcial a este CEP (via Plataforma Brasil) referindo em que fase do projeto a pesquisa se encontra (exceto se a pesquisa estiver totalmente finalizada, pois, neste caso, deverá ser enviado o relatório final). Veja modelo na página do CEP, no item "6) Documentos a serem anexados à Plataforma Brasil" no subitem " 6.1) Obrigatórios " . A cada 6 meses novo relatório parcial deverá ser enviado até que seja enviado o relatório final.
- 2) Qualquer alteração que ocorra no decorrer da execução do seu projeto e que não tenha sido prevista deve ser imediatamente comunicada ao CEP para que possa ser avaliada e as medidas adequadas possam ser tomadas. O não cumprimento desta determinação acarretará na suspensão ética do seu projeto. Após um projeto ter sido aprovado, alterações devem ser solicitadas na forma de EMENDA.
- 3) Além do relatório semestral, a qualquer momento o CEP poderá solicitar esclarecimentos sobre a sua pesquisa – vide artigos X.1.3.b), X.3.6 e XI.2.e)
- 4) Ao final da pesquisa deverá ser encaminhado o relatório final.

OBS: Os relatórios deverão ser enviados utilizando-se da opção "enviar notificação", na "Plataforma Brasil".
Em caso de dúvida: (1) contate este CEP pelo telefone 20491478, das 8:00 às 12:00 e das 14:00 às 17:00
(2) contate a Plataforma Brasil pelo telefone 136, opção 8 e opção 9, solicitar ao atendente suporte Plataforma Brasil das 08h às 20h, de segunda a sexta, (3) Contate a "central de suporte "da plataforma Brasil no canto superior direito da plataforma e cujo atendimento é online.

Boa pesquisa!

Endereço: Avenida General Osório, 413d - Ed. Mantelli da UFFS
Bairro: CENTRO **CEP:** 89.802-265
UF: SC **Município:** CHAPECO
Telefone: (49)2049-1478 **E-mail:** joseane@uffs.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



Continuação do Parecer: 822.782

CHAPECO, 07 de Outubro de 2014

Assinado por:
JOSEANE DE MENEZES STERNADT
(Coordenador)

Endereço: Avenida General Osório, 413d - Ed. Mantelli da UFFS

Bairro: CENTRO

CEP: 89.802-265

UF: SC

Município: CHAPECO

Telefone: (49)2049-1478

E-mail: joseane@uffs.edu.br

REFERENCIAS

ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v. 52, p. 46–55, 2014.

ADINOLFI, E.; PIZZIRANI, C.; IDZKO, M.; et al. P2X7 receptor: Death or life? **Purinergic Signalling**, v. 1, p. 219-227, 2005.

ALMEIDA, F. A.; ALMEIDA, G. O. O. Melanoma Cutâneo. In: Ramos e Silva M, Castro MCR, editors. Fundamentos de Dermatologia. 1. ed. Ed. Atheneu, Rio de Janeiro. p. 1737-1743, 2009.

ALMEIDA, M. M. **Determinação e quantificação das Vitaminas C e E associadas em produtos cosméticos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. Cancer Staging Manual, 8th Edition. 2017 Disponível em: <http://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Pages/default.aspx>.

ANTONIOLI, L. COLUCCI, R.; LA MOTTA, C. et al. Adenosine Deaminase in the Modulation of Immune System and its Potential as a Novel Target for Treatment of Inflammatory Disorders. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 6, p. 842–862, 2012.

ANTONIOLI, L. PACHER, P.; SYLVESTER VIZI, E. et al. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 6, p. 355–367, 2013.

ANTONIOLI, L.; HASKÓ, G.; FORNAI, M.; et al. Adenosine pathway and cancer: where do we go from here? **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 18, n. 9, p. 973-977, 2014.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – nota técnica no 009/2012. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2e65b1004c14de8991dcd1dc39d59d3e/\(N%0AOTA+TÉCNICA++009-2012Câmaras+de+bronzamento+GGTPS\)](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2e65b1004c14de8991dcd1dc39d59d3e/(N%0AOTA+TÉCNICA++009-2012Câmaras+de+bronzamento+GGTPS)).

ANWAR, J.; SPANEVELLO, R. M.; PIMENTEL, V. C. et al. Caffeic acid treatment alters the extracellular adenosine nucleotide hydrolysis in platelets and lymphocytes of adult rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 56, p. 459-466, 2013

ATKINSON, B.; DWYER, K.; ENJOJI, K. et al. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: potential as therapeutic targets. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 36, p. 217-222, 2006.

BAGATINI, M. D.; BERTOLIN, K.; BRIDI, A., et al. Dihydroxyvitamin D3 alters ectonucleotidase expression and activity in human cutaneous melanoma cells. **Journal of Cell Biology**, 2018.

BAHARARA, J.; AMINI, E.; NIKDEL, N, et al. The cytotoxicity of dacarbazine potentiated by sea cucumber saponin in resistant B16F10 melanoma cells through apoptosis

induction. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 8, p. 112–119, 2016.

BALCH, C.M.; GERSHENWALD, J.E.; SOONG, S.J., et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 36, p. 6199–6206, 2009.

BALDISSARELLI, J.; SANTI, A; SCHMATZ, R. et al. Hypothyroidism and hyperthyroidism change ectoenzyme activity in rat platelets. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 7, p. 6249–6257, 2018.

BANDARCHI, B.; MA, L.; NAVABET, R. et al. From Melanocyte to Metastatic Malignant Melanoma. **Dermatology Research and Practice**, v. 2010, n. 1, p. 1–8, 2010.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARNHILL, R. L. Pathology of Malignant Melanoma. 1. ed. New York: Springer; 2004.

BATTISTI, R.; NUNES, D. H.; WEBER, A. L. et al. Avaliação do perfil epidemiológico e da mortalidade dos pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo primário no município de Florianópolis - SC, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 4, p. 335–342, 2009.

BEDIKIAN, A. Y.; MILLWARD, M.; PEHAMBERGER, H. et al: Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: The Oblimersen Melanoma Study Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, p. 4738-4745, 2006.

BEHRENS, G.; NIEDERMAIER, T.; BERNEBURG, M. et al. Physical activity, cardiorespiratory fitness and risk of cutaneous malignant melanoma: Systematic review and meta-analysis. **PLOS ONE**, v. 13, n. 10, p. e0206087, 2018.

BENNETT, D. C. How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? **Pigment Cell & Melanoma Research, La Jolla**, v. 21, n. 1, p. 27-28, 2008.

BERGAMIN, L. S.; BRAGANHOL, E.; ZANIN, R. F. et al. Ectonucleotidases in Tumor Cells and Tumor-Associated Immune Cells: An Overview. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012.

BERTOLOTTO, C. Melanoma: From Melanocyte to Genetic Alterations and Clinical Options. **Scientifica**, v. 2013, p. 1–22, 2013.

BIAN, S.; SUN, X.; BAI, A. et al. P2X7 integrates PI3K/AKT and AMPK-PRAS40-mTOR signaling pathways to mediate tumor cell death. **PLoS ONE**, v. 8, e60184, 2013.

BIGONESSE, F.; LÉVESQUE, S. A.; LULKUSKI, F. et al. Cloning and characterization of mouse triphosphate diphosphohydrolase 8. **Biochemistry**, v. 43, p. 5511-5519, 2004.

BLACKBURN, M. R.; KELLEMS, R.E. Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. **Advances in Immunology**, v. 86, p. 1-41, 2005.

BONNEFOY, M.; DRAI, J.; KOSTKA, T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. **La Presse Médicale**, v. 15, p. 1174-1184, 2002.

BONNEFOY, N.; BASTID, J.; ALBERICI, G. et al. CD39: A complementary target to immune checkpoints to counteract tumor-mediated immunosuppression. **OncoImmunology**, v. 4, n. 5, p. 37–39, 2015.

BOUAYED, J.; RAMMAL, H.; DICKO, A. et al. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 262, p. 77-84, 2007.

BOUZAIENE, N. N., JAZIRI, S. K.; KOVACIC, H. et al. The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. **European Journal of Pharmacology**, v. 766, p. 99-105, 2015.

BRAGANHOL, E. Sistema purinérgico e a progressão dos gliomas: avaliação de parâmetros proliferativos e inflamatórios. 243 p, 2010. Tese. (Doutorado em Ciências Biológicas – Bioquímica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 12, p. 1471–1483, 2007.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E.; GREIG, A. V. H. Purinergic signaling in healthy and diseased skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, p. 526-546, 2012.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: From discovery to current developments. **Experimental Physiology**, v. 99, n. 1, p. 16–34, 2014.

BURNSTOCK, G. An introduction to the roles of purinergic signalling in neurodegeneration, neuroprotection and neuroregeneration. **Neuropharmacology**, v. 104, p. 4–17, 2016.

BURNSTOCK, G. Short- and long-term (trophic) purinergic signalling. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1700, p. 20150422, 2016.

BURUM-AUENSEN, E.; DEANGELIS, P. M.; SCHJØLBERG, A. R.; et al. Reduced level of the spindle checkpoint protein BUB1B is associated with aneuploidy in colorectal cancers. **Cell Prolif**, v. 41, p. 645–659, 2008.

CALLAHAN, M. K.; FLAHERTY, C. R.; POSTOW, M. A. Melanoma. **Cham: Springer International Publishing**, v. 167, 2016.

CAMPOS, P. M. Avaliação da atividade inibitória de melanogênese do extrato hidroalcoólico da *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zapp. 106f, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CANNAVÒ, S. P.; TONACCI, A.; BERTINO, L. et al. The role of oxidative stress in the biology of melanoma: A systematic review. **Pathology - Research and Practice**, v. 215, n. 1, p. 21–28, 2019.

CARDOSO, A. M.; SCHETINGER, M. R. C.; CORREIA-DE-SÁ, P. et al. Impact of ectonucleotidases in autonomic nervous functions. **Autonomic Neuroscience**, v. 191, p. 25–38, 2015.

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

CHANG, W.; HISIEH, C. H.; HISIAO, M. W. et al. Caffeic acid induces apoptosis in human cervical cancer cells through the mitochondrial pathway. **Taiwanese Journal Obstetrics Gynecology**, v. 49, n. 4. p. 419-424, 2010.

CHAO, P. C., HSU, C. C., YIN, M. C. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. **Nutrition & Metabolism**, v. 14, p. 6:33, 2009.

CHEN, Y. N. Dacarbazine inhibits proliferation of melanoma FEMX-1 cells by up-regulating expression of miRNA-200. **European Review Medical and Pharmacological Sciences**, v. 21, p.1191–1197, 2017.

CHLOPČÍKOVÁ, Š., PSOTOVA, J., MIKETOVA, P. et al. Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes Part II. caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 5, p. 408-413, 2004.

CHUNG, T. W.; MOON, S. K.; CHANG, Y. C. et al. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic phenyl ester on hepatocarcinoma cells: Complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. **FASEB Journal**, v. 18, n. 14, p. 1670-81, 2004.

CLARK, W. H.; FROM, L.; BERNARDINO, E. A. et al. The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin. **Cancer Research**, v. 29, n. 3, p. 705–727, 1969.

CONRADT, B. Genetic control of programmed cell death during animal development. **Annual Review of Genetics**, [S.l.], v. 43, p. 493–523, 2009.

CUBILLOS-ROJAS M, AMAIR-PINEDO F, PEIRÓ-JORDÁN R, et al. The E3 ubiquitin protein ligase HERC2 modulates the activity of tumor protein p53 by regulating its oligomerization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 14782–14795, 2014.

CUST, A. E. et al. Sunbed use during adolescence and early adulthood is associated with increased risk of early-onset melanoma. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 10, p. 2425–2435, 15, 2011.

D'AGNILLO F, ALAYASH AI. Redox cycling of diaspirin cross-linked hemoglobin

induces G₂/M arrest and apoptosis in cultured endothelial cells. **Blood** **98**, p. 3315-3323, 2001.

D'ARCHIVIO, M., FILESI, C., BENEDETTO, R. et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 43, n. 4, 348–361, 2007.

D'ISCHIA, M.; WAKAMATSU, K.; CICOIRA, F. et al. Melanins and melanogenesis: from pigment cells to human health and technological applications. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 28, n. 5, p. 520–544, set. 2015.

DE VRIES, E.; BRAY, F.; COEBERGH, J. W. et al. Malignant Melanoma: Introduction. In: LeBoit P E, Burg G, Weedon D, Sarasin A. Pathology and Genetics of Skin Tumours. Lyon: IARC Press, 2006.

DI VIRGILIO, F. Dr. Jekyll / Mr. Hyde: the dual role of extracellular ATP. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 81, p. 59-63, 2000.

DI VIRGILIO, F. Purines, Purinergic Receptors, and Cancer. **Cancer Research**, v. 72, p. 5441-5445, 2012.

DI VIRGILIO, F.; ADINOLFI, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. **Oncogene**, v. 36, n. 3, p. 293–303, 2017.

DUNCAN, L.M. The classification of cutaneous melanoma. **Hematology Oncology Clinics of North America**, v. 23, n. 3, p. 501-513, 2009.

DZIEDZIC, A.; KUBINA, R.; KABAŁA-DZIK, A. et al. Induction of cell cycle arrest and apoptotic response of head and neck squamous carcinoma cells (Detroit 562) by caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester derivative. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 6793456, 2017.

EGGERMONT, A. M. M.; SPATZ, A.; ROBERT, C. Cutaneous melanoma. **The Lancet**, v. 383, n. 9919, p. 816–827, 2014.

FANG, J.; CHEN, X.; ZHANG, L. et al. P2X7R suppression promotes glioma growth through epidermal growth factor receptor signal pathway. **Internacional Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 6, p. 1109-20, 2013.

FANG, W. G.; TIAN, X. X. [Identification of a new pro-invasion factor in tumor microenvironment: progress in function and mechanism of extracellular ATP]. **Beijing da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Peking University. Health sciences**, v. 49, n. 2, p. 188–195, 2017.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 18, n. 1, p. 23-36, 2006.

FARIES, M. B.; ARIYAN, S. Current surgical treatment in melanoma. **Current Problems in Cancer**, v. 35, n. 4, p. 173-84, 2011.

FITZPATRICK, T. B.; MOSHER, D. B. Pigmentação cutânea e distúrbio do metabolismo da melanina. In: **Medicina interna**, p. 276–284.

FRANKLIN, C.; LIVINGSTONE, E.; ROESCH, A. et al. Immunotherapy in melanoma: recent advances and future directions. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 43, p. 604–611, 2017.

FONKEM, E.; UHLMANN, E. J.; FLOYD, S. R. et al. Melanoma brain metastasis: overview of current management and emerging targeted therapies. **Expert Review Neurotherapeutics**, v. 12, n. 10, p. 1207-15, 2012.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, p. 107-120, 2012.

GARBE, C.; EIGENTLER, T. K.; KEILHOLZ, U. et al. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. **Oncologist**, v.16, n. 5, p.24, 2011.

GARBE, C.; PERIS, K.; HAUSCHILD, A. et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline – Update 2012. **European Journal of Cancer**, v. 48, n. 15, p. 2375-2390, 2012.

GARBE, C.; LEITER, U. Melanoma epidemiology and trends. **Clinics in Dermatology**, v. 27, n. 1, p. 3–9, 2009.

GESSI, K.; VARANI, S.; MERIGHI, S. Adenosine and lymphocyte regulation, **Purinergic Signalling**, v. 3, p. 109-116, 2007.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**, v. 107, p. 1058-1070, 2010.

GRABSCH, H.; TAKENO, S.; PARSONS, W. J. et al. Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1, BUBR1, and BUB3 in gastric cancer association with tumour cell proliferation. **Journal of Pathology**, v. 200, p. 16–22, 2003.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2011.

GUIRRO, E.; GUIRRO, R. Fisioterapia dermatofuncional. 3 ed. São Paulo: Manole, 2004.

HALE, C. Skin-melanocytic tumor, Miscellaneous, Breslow's system for tumor thickness. PathologyOutlines.com, Inc., 2013. Disponível em: <<http://pathologyoutlines.com/topic/skintumormelanocyticbreslow.html>>. Acesso em 23 de setembro de 2019.

HASKÓ, G.; CSÓKA, B.; NÉMETH, Z. H. et al. A2B adenosine receptors in immunity and inflammation. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 6, p. 263-270, 2009.

HATTORI, F.; OHSHIMA, Y.; SEKI, S., et al. Feasibility study of B16 melanoma therapy

using oxidized ATP to target purinergic receptor P2X7. **European Journal Pharmacology**, v. 15, p. 695 (1-3), 2012.

HE, J.; XU, Q.; JING, Y. et al. Reactive oxygen species regulate ERBB2 and ERBB3 expression via miR199a/125b and DNA methylation. **EMBO Reports**, v. 13, p. 1116–1122, 2012.

HELENO, S. A., MARTINS, A., QUEIROZ, M. J. R. P. et al. Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds, a review. **Food Chemistry**, v.173, p. 501–513, 2015.

HICKS, M. J.; FLAITZ, C. M. Oral mucosal melanoma: epidemiology and pathobiology. **Oral Oncology**, v. 36, n. 2, p.152-169, 2000.

HUANG, W.; SEO, J.; WILLINGHAM, S. B. et al. Learning from host-defense peptides: cationic, amphipathic peptoids with potent anticancer activity. **PLoS ONE**, v. 9, p. e90397, 2014

INCA. Instituto Nacional do Câncer - Estimativa 2018. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/index.asp>.

JAGANATHAN, S.K. Growth inhibition by caffeic acid, one of the phenolic constituents of honey, in HCT 15 colon cancer cells. **The Scientific World Journal**, p.1-8, 2012.

JAIN, R.; JAIN, S.K. Screening of in vitro cytotoxic activity of some medicinal plants used traditionally to treat cancer in Chhattisgarh state, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S147-S150, 2011.

JAMALI, N., MOSTAFAVI-POUR, Z., ZAI, F., et al. Combination Effect of Caffeine and Caffeic Acid Treatment on the Oxidant Status of Ectopic Endometrial Cells Separated from Patients with Endometriosis. **Iranian Journal Medical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 315-324, 2019.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P. Histologia básica: texto e atlas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KABAŁA-DZIK, A.; RZEPECKA-STOJKO, A.; KUBINA, R. et al. Comparison of two components of propolis: caffeic acid (CA) and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) induce apoptosis and cell cycle arrest of breast cancer cells MDA-MB-231. **Molecules**, v. 22, p. E1554, 2017;

KAMPA, M.; ALEXAKI, V.; NOTAS, G. et al. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. **Breast Cancer Research**, v. 6, p. R63–R74, 2004.

KANG, N. J.; LEE, K. W.; SHIN, B. J. et al. Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB induced COX-2 expression. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 2, p. 321330, 2009.

- KARABOGA, I. Caffeic acid phenethyl ester ameliorates pulmonary inflammation and apoptosis reducing Nf- κ B activation in blunt pulmonary contusion model. **Ulus Travma Acil Cerrahi Derg**, v.25, n. 5, p. 433-439, 2019.
- KATO, T.; DAIGO, Y.; ARAGAKI, M. . et al. Overexpression of MAD2 predicts clinical outcome in primary lung cancer patients. **Lung Cancer**, v. 74, p. 124–131, 2011.
- KHAN, B. A.; AKHTAR, N.; RASUL, A. et al. Human skin, aging and antioxidants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n, 1, p. 1-6, 2012.
- KHODJAKOV, A.; RIEDER, C. L. The nature of cell-cycle checkpoints: facts and fallacies. **Journal of Biology, London**, v. 8, n. 10, p. 88-98, 2009.
- KIRKINEZOS, I. G.; MORAES, C.T. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 12, p. 449-457, 2001.
- KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis, **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 239-267, 2004.
- KORN, E. L.; LIU, P-Y.; LEE, S. J. et al. Meta-analysis of phase II cooperative group trials in metastatic stage IV melanoma to determine progression-free and overall survival benchmarks for future phase II trials. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, p. 527-34, 2008.
- KROEMER, G. et al. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 99–163, 2007.
- KRÜGEL, U. Purinergic receptors in psychiatric disorders. **Neuropharmacology**, v. 104, p. 212–225, 2016.
- KUDUGUNTI, S. K.; VAD, N. M.; EKOGB, E. et al. Efficacy of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in skin B16-F0 melanoma tumor bearing C57BL/6 mice. **Investigational New Drugs**, v. 29, p. 52–62, 2011.
- LAFAY, S.; GIL-IZQUIERDO, A. Bioavailability of phenolic acids. **Phytochemical Reviews**, v. 7, p. 301-311, 2008.
- LANDSKRON, G.; DE LA FUENTE, M.; THUWAJIT, P. et al. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, 2014.
- LEONARDI, G.; FALZONE, L.; SALEMI, R. et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **International Journal of Oncology**, v. 52, n. 4, p. 1071–1080, 2018.
- LEV, D. C.; ONN, A.; MELINKOVA, V. O. et al. Exposure of melanoma cells to dacarbazine results in enhanced tumor growth and metastasis in vivo. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, p. 2092-2100, 2004.

LI, W. L.; ZHENG, H. C.; BUKURU, J. et al. Natural medicines used in the traditional chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 1-21, 2004.

LIANG, G.; SHI, B.; LUO, W. et al. The protective effect of caffeic acid on global cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Behavioral and Brain Functions**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2015.

LOPES, S. Estudo in vitro de atividades biológicas dos extratos carotenóidico e polifenólico derivados das folhas de *Zea Mays* em linhagens celulares neoplásicas. (Dissertação) 2012.

LUI, P.; CASHIN, R.; MACHADO, M. et al. Treatments for metastatic melanoma: Synthesis of evidence from randomized trials. **Cancer Treatment Reviews**, v. 33, p. 665-680, 2007.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

MANICA, A.; DA SILVA, A. M.; CARDOSO, A. M. et al. High levels of extracellular ATP lead to chronic inflammatory response in melanoma patients. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 5, p. 3980–3988, 2018.

MANICA, A.; BONADIMAN, B. S. R.; CARDOSO, A. M., et al. The signaling effects of ATP on melanoma-like skin cancer. **Cellular Signalling**, v. 59, p. 122-130, 2019.

MASELLA, R.; DI BENEDETTO, R.; VARI, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.16, p. 577-586, 2005.

MAURILLO, L.; POETA, G. D.; VENDITTI, A. Quantitative analysis of Fas and bcl-2 expression in hematopoietic precursors. **Haematologica**, v. 86, p. 237-243, 2001.

MAXIMOV, G.; MAXIMOV, K. The role of p53 tumor-suppressor protein in apoptosis and cancerogenesis. **Biotechnology & Biotechnological Equipment** v. 22, n. p. 664-668, 2008.

MELANOMA INSTITUTE AUSTRALIA. Melanoma facts and statistics. Disponível em: <https://www.melanoma.org.au/understanding-melanoma/melanoma-facts-and-statistics/>. Acesso em 15 de setembro de 2019.

MENCHÓN, T. M. Biopsia selectiva del ganglio sentinela (BSGC) en melanoma. Comparación de los métodos de procesamiento histológico. 2014. 172 p. Tese (doutorado). Universidad de Murcia Departamento Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física. Murcia – España.

MERVIC, L. Time course and pattern of metastasis of cutaneous melanoma differ between men and women. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1–10, 2012.

MICHALANY, N. S. Exame Anatomopatológico da Lesão Primária. Wainstein AJA, Belfort FA, editors. In: *Melanoma: Prevenção, Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento*. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, p. 161-170, 2014.

MIN, J.; SHEN, H.; XI, W. et al. Synergistic anticancer activity of combined use of caffeic acid with paclitaxel enhances apoptosis of non-smallcell lung cancer H1299 cells in vivo and in vitro. **Cell Physiology and Biochemistry**, v. 48, p.1433–1442, 2018.

MONTEIRO, I.; VIGANO, S.; FAOUZI, M. et al. CD73 expression and clinical significance in human metastatic melanoma. **Oncotarget**, v. 9, n. 42, p. 26659–26669, 2018.

MORENO, M.; BATISTA, F. R. B.; BONETTI, T. C. Sobrevida de Pacientes com Melanoma Cutâneo na Região Oeste de Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, p. 647-653, 2012.

MULDER, K. C.; LIMA, L. A.; MIRANDA, V. J. Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 321, 2013.

MURAD, L. D.; SOARES, N. C. P.; BRAND, C. et al. Effects of Caffeic and 5-Caffeoylquinic Acids on Cell Viability and Cellular Uptake in Human Colon Adenocarcinoma Cells. **Nutrition and Cancer**, v. 67, n. 3, p. 532-542, 2015.

NAKAJIMA, Y., TSURUMA, K., SHIMAZAWA, M. et al. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, n. 4, p.1-9, 2009.

NIELSEN, K.; MÅSBÄCK, A.; OLSSON, H. et al. A prospective, population-based study of 40,000 women regarding host factors, UV exposure and sunbed use in relation to risk and anatomic site of cutaneous melanoma. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 3, p. 706–715, 2012.

OLIVEIRA, D. M., & BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Quimica Nova**, v. 34, n. 6, p.1051–1056, 2011.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 1, p. 66-71. Jan. 2001.

PADDOCK, L. E. et al. Skin self-examination and long-term melanoma survival. **Melanoma Research**, v. 26, n. 4, p. 401–408, 2016.

PALOZZA, P.; BELLOVINO, D.; SIMONE, R. et al. Effect of beta-carotene-rich tomato lycopene beta-cyclase (tlcy-b) on cell growth inhibition in HT-29 colon adenocarcinoma cells. **British Journal of Nutrition**, v. 102, n. 2, p. 207-214, 2009.

PASTUSHENKO, I.; VERMEULEN, P. B.; VAN DEN EYNDEN, G. G. et al. Mechanisms of tumour vascularization in cutaneous malignant melanoma: clinical implications. **The British Journal of Dermatology**, v. 171, n. 2, p. 220–233, 2014.

PECORINO, L. *Molecular Biology of Cancer - Mechanisms, Targets and Therapeutics*. 2.ed. New York: Oxford University Press, 2008. p.

PELINSON, L. P.; ASSMANN, C. E.; PALMA, T. V., et al. Antiproliferative and apoptotic effects of caffeic acid on SK-Mel-28 human melanoma cancer cells. **Molecular Biology Reports**, 2019.

PEREIRA, P., DE OLIVEIRA, P. A., ARDENGHI, P., Neuropharmacological analysis of caffeic acid in rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 99, n. 5, p. 374-8, 2006.

PINHEIRO FERNANDES, F. D.; FONTENELE, A. P. M.; DE SOUSA, J. C. N. et al. Caffeic acid protects mice from memory deficits induced by focal cerebral ischemia. **Behavioural Pharmacology**, v. 25, n. 7, p.637-647, 2014.

PINTO, M.; VIEIRA, J.; RIBEIRO, F. R. et al. Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1 and BUBR1 is associated with genomic complexity in clear cell kidney carcinomas. **Cell Oncology**, v. 30, p. 389–395, 2008.

PINTO, L. F. R.; FELZENSZWALB, I. Genética do Câncer. In: RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. Mutagênese Ambiental. 1º ed. Canoas: Ulbra. 2003. p. 247-279.

PRAMANIK, K. C.; KUDUGUNTI, S. K.; FOFARIA, N. M. et al. Caffeic acid phenethyl ester suppresses melanoma tumor growth by inhibiting PI3K/AKT/XIAP pathway. **Carcinogenesis**, v. 34, p. 2061–2070, 2013.

PRASAD, N. R.; JEYANTHIMALA, K.; RAMACHANDRAN, S. Caffeic acid modulates ultraviolet radiation-B induced oxidative damage in human blood lymphocytes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 95, n. 3, p. 196-203, 2009.

ROBERTS, D. L.; ANSTEY, A. V.; BARLOW, R. J. - U.K. guidelines for the management of cutaneous melanoma. Br. **The Journal of Dermatology**, v. 146, p.7-17, 2002.

ROBSON S C. Role of CD73 and extracellular adenosine in disease : Presented by Maria P. Abbracchio. **Purinergic Signalling**, v. 7, p. 367-72, 2011.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409-430, 2006.

SANLORENZO M, VUJIC I, POSCH C, et al. Melanoma immunotherapy. **Cancer Biology & Therapy**, v. 15, p. 665–674 7, 2014.

SAÚDE, M. DA. PORTARIA N° 357, DE 8 DE ABRIL DE 2013. Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Melanoma Maligno Cutâneo. Anais.. 2013. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0357_08_04_2013.html

SCHADENDORF, D.; FISCHER, D. E.; GARBE, C. et al. Melanoma. **Nature Review Diseases Primers**, v. 23, n. 1, p. 15003, 2015.

SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; BONAN, C. D. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: New perspectives for human health. **BioFactors**, v. 31, n. 2, p. 77–98, 2007.

SCHWARTZ, G. K.; SHAH, M.A. Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v.23, n. 36, p. 9408-9421, 2005.

SEKULIC, A.; HALUSKA, P.Jr.; MILLER, A.J. et al. Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, n. 7, p. 825-846, 2008.

SHI, J.; YU, J.; POHORLY, J. E. et al. Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionally. **Journal of Medicinal Food**, v. 6, n. 4, p. 291-9, 2003.

SILVA, L. M.; FRIÓN-HERRERA, Y.; BARTOLOMEU, A. R. et al. Mechanisms involved in the cytotoxic action of Brazilian propolis and caffeic acid against Hep-2 cells and modulation of P-glycoprotein activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n.11, p. 1625-33, 2017.

SLINGLUFF, JR C. L.; FLAHERTY, K.; ROSENBERG, A. S., et al. Cutaneous Melanoma. In: DeVita Jr VT, Lawrence, T. S.; Rosenberg, S. A. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. 9th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2011.

SMALBERGER, G. J.; SIEGEL, D. M.; KHACHEMOUNE, A. Lentigo maligna. **Dermatology and Therapy**, v. 21, n. 6, p. 439-446, 2008.

SOARES, S. E. Acidos fenólicos como Antioxidantes. **Revista de Nutrição**, 2002, v. 15, p. 71-81.

SOVA, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 12, n. 8, p. 749-767, 2012.

SPYCHALA, J. Tumor-promoting functions of adenosine. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 87, n. 2–3, p. 161–173, ago. 2000.

STIEWE, T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 3, p. 1658, 2007.

TAJARA, E. H. Ciclo Celular. In: FERREIRA, C.G.; ROCHA, J. C. *Oncologia Molecular*. 1 ed. São Paulo: Atheneu. p. 65-76, 2004.

TAKAHASHI, H.; NGUYEN, B. C. Q.; UTO, Y. et al. 1,2,3-Triazolyl esterization of PAK1-blocking propolis ingredients, artemillin C (ARC) and caffeic acid (CA), for boosting their anti-cancer/anti-PAK1 activities along with cellpermeability. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v.11, p. 104–109, 2017.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; INAZU, M. et al. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. **European journal of pharmacology**, v. 449, n. 3, p. 261-267, 2002.

TAPIERO, H.; TEW, K. D.; NGUYEN BA, G. et al. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomedicine Pharmacotherapy**, v. 56, p. 200-207, 2002.

TORTORA, J. G.; NIELSEN, T. Capítulo 5. Tegumento. In: *Princípios de Anatomia Humana*, 12 ed. Ed. Guanabara Koogan, p. 123-135, 2013.

VALKO-ROKYTOVSKÁ, M. et al. Possibilities for the Therapy of Melanoma: Current Knowledge and Future Directions. In: *Human Skin Cancers - Pathways, Mechanisms, Targets and Treatments*. InTech, 2018.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. et al. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. **Annals of Hematology**, v. 84, p. 627-639, 2005.

VESTERGAARD, M. E.; MACASKILL, P.; HOLT, P. E. et al. Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: A meta-analysis of studies performed in a clinical setting. **British Journal of Dermatology**, v. 159, n. 3, p. 669-676, 2008.

VIDEIRA, R. S.; DEBONI, M. C. Z.; ARAUJO, C. A. S. et al. Oncogenes e desenvolvimento do câncer. **Arquivo de Ciências da Saúde Unipar**, v.6, n.1, p. 71-76, 2002.

VISOVATTI, S. H.; HYMAN, M. C.; BOUIS, D. et al. Increased CD39 nucleotidase activity on microparticles from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. **PLoS One**, v. 7, p. e40829, 2012.

VOLKOVÁ, K.; BILANICOVA, D.; BARTONOVA, A. et al. Associations between environmental factors and incidence of cutaneous melanoma. Review. **Environmental Health**, v. 11, n.1, p. 1-13, 2012.

WARD, L.S. Entendendo o processo da tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 4, 2002.

WEI, J.; DEANGULO, G.; SUN, W. et al. Topotecan enhances immune clearance of gliomas. **Cancer Immunol Immunother**, v. 58, n. 2, p. 259-70, 2009.

WENG, C.; YEN, G. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, p.76-87, 2012.

WHITE, N.; BURNSTOCK, G. P2 receptors and cancer. **Trends in Pharmacological Science**, v. 27, n. 4, p. 211-217, 2006.

WICK, M. R. Cutaneous melanoma: A current overview. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 33, n. 4, p. 225–241, 2016.

WOODS, L. T.; AJIT, D.; CAMDEN, J. M. et al. Purinergic receptors as potential therapeutic targets in Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, v. 104, p. 169–179, 2016.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide-and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research**, v. 1783, p. 673–694, 2008.

ZACKS, M. A.; WEN, J. J.; VYATKINA, G. et al. An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 77, p. 695–715, 2005.

ZANOTTO-FILHO, A.; BRAGANHOL, E.; EDELWEISS, M. I, et al. The curry spice curcumin selectively inhibits cancer cells growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.23, p. 591-601, 2012.

ZIMMERMANN, H.; MISHRA, S. K.; SHUKLA, V. Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. **Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia**, v. 73, p. 537-566, 2007.