

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

HANNA SANTANA DE ALMEIDA

Efeitos de antioxidantes na modulação do estresse oxidativo no microambiente do melanoma: uma revisão sistemática.

BRASÍLIA
2022

HANNA SANTANA DE ALMEIDA

Efeitos de antioxidantes na modulação do estresse oxidativo no microambiente do melanoma: uma revisão sistemática.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Borin

BRASÍLIA

2022

Ficha Catalográfica

AA447e Almeida, Hanna Santana de
Efeitos de antioxidantes na modulação do estresse oxidativo no microambiente do melanoma: uma revisão sistemática. / Hanna Santana de Almeida; orientador Maria de Fátima Borin. -- Brasília, 2022.
77 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -- Universidade de Brasília, 2022.

1. melanoma. 2. antioxidantes. 3. estresse oxidativo. 4. célula de melanoma. 5. viabilidade celular. I. Borin, Maria de Fátima, orient. II. Título.

HANNA SANTANA

Efeitos de antioxidantes na modulação do estresse oxidativo no microambiente do melanoma: Uma revisão sistemática.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 25/08/2022

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria de Fátima Borin (presidente)
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Patrícia Medeiros de Souza (examinadora titular)
Universidade de Brasília

Dra. Cinthia Gabriel Meireles (examinadora titular)
Ministério da saúde (MS)

Profa. Dra. Fernanda Cerqueira Barroso Oliveira (examinadora suplente)
Centro Universitário Estácio de Brasília

Em especial, *in memoriam*, dedico este trabalho a minha avó Cecília,
minha eterna incentivadora.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela saúde concedida todos os dias para concluir este trabalho. Foram tempos difíceis, fazer a dissertação durante a pandemia, agradeço a Deus pela vida das pessoas que amo e que vão estar comigo fechando mais um ciclo.

Agradeço a minha mãe, Dona Ana, por estar ao meu lado todos os dias durante o meu mestrado, por acreditar em mim, cuidar de mim. Todas as minhas vitórias são dedicadas a ela.

Agradeço a minha orientadora, Maria de Fátima, que eu tenho a honra, a sorte e o prazer de ser aluna. Obrigada professora, por absolutamente tudo. Por cada palavra, cada ajuda, por acreditar em mim. Obrigada por me ajudar a tornar tudo isso possível.

Agradeço aos meus tios, Valdelice e Carlos, por serem como pai e mãe para mim e me apoiarem sempre durante toda a minha vida, vocês também são parte de todas as minhas conquistas. Agradeço aos meus primos, João Vitor e Cássio, por todo apoio e por estarem sempre comigo. Vocês são a família mais maravilhosa que eu poderia ter, sou grata todos os dias.

Agradeço aos meus amigos, Anyk e Vinicius pela paciência de mesmo com a minha ausência nos últimos meses ainda serem meus amigos e estarem ao meu lado sempre me motivando me fazendo acreditar em dias melhores. Anyk, obrigada por todas as vezes que estávamos juntas e esses momentos era um alívio na rotina de trabalho.

Agradeço a minha amiga Karla, por me aturar em cada surto! Eu não chegaria até aqui sem você. Só nós sabemos como foram todos esses anos, meses e dias. Obrigada pelo apoio, você é maravilhosa. Esse momento é meu e seu.

Agradeço a minha segunda autora, Suzana. Su, obrigada por todo apoio e parceria em todos esses anos de trabalho. A chegada a essa reta final também não seria possível sem você.

Agradeço aos meus amigos de grupo de pesquisa, Manuel, Natália, Daniela por sempre estarem dispostos a me ajudar e me ajudaram muito, todos os dias.

Agradeço a professora Eliete Guerra e suas alunas Juliana e Larissa por todo conhecimento e contribuição.

Agradeço aos professores e alunos do Laboratório de Farmacologia, eu aprendi tanto com todos vocês. Obrigada pelos dias felizes de trabalho.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que me apoiaram e acreditaram em mim nesses anos de mestrado. Muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Lista de siglas e abreviaturas

ACS	<i>American Cancer Society</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AKT	<i>Serine-Threonine Specific protein Kinase</i>
ANISA	<i>Anisic acid 4-methoxybenzoic acid</i>
ARE	Extrato rico em antocianinas
BAX	BCL-2 associada a proteína X
BCL2	Linfoma de célula B 2
BRAF	Proto-oncogene B-Raf
CAT	Catalase
CDKN2A	Inibidor de cinase dependente de ciclina 2A
CHOP	Proteína homóloga <i>C/EBP</i>
DCFH-DA	2',7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EO	Estresse Oxidativo
ERK	Quinases reguladas por sinal extracelular
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FADH	Dinucleótido de flavina e adenina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione oxidada
IC	Concentração inibitória
IL-2	Interleucina 2
INCA	Instituto Nacional do câncer
KIT	Gene KIT
LDH	Lactato desidrogenase
LMM	Melanoma lentigo maligno
MAPK	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos
MC1R	Receptor de melanocortina 1
MDA	Malondialdeído
MEC	Matriz extracelular

MEK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MMP-2	Metaloproteinase de matriz 2
MMP-9	Metaloproteinase de matriz 9
MN	Melanoma nodular
MTT	(brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium])
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT	Nitrozul de tetrazólio
NF1	Gene Neurofibrina 1
NO	Óxido nítrico
NOX 1	NADPH oxidase 1
NRAS	Homologo do oncogene viral RAS neuroblastoma
NRF2	Fator nuclear 2
PAs	Proanthocianidinas
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3 kinase</i>
PRISMA	<i>Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta Analyses</i>
PUMA	Modulador de apoptose regulado positivamente por p53
RAF	Proto-oncogene do vírus RAS (rat sarcoma)
RAS	Homologo do vírus RAS (rat sarcoma)
QCRI	<i>Qatar Computing Research Institute</i>
RT-PCR	Reação de cadeia polimerase em tempo real
SBOC	Sociedade Brasileira de Oncologia
SOD	Superóxido Dismutase
SOD2	Superóxido dismutase 2
SP1	Fator de transcrição proteína 1
SSM	Melanoma extensivo superficial
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TERT	Transcriptase reversa da telomerase
TRP1	Proteína 1 relacionada à tirosinase
TRP2	Proteína 2 relacionada à tirosinase
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick
UV	Ultravioleta

UVA	Ultravioleta A
VACAM	Proteína de adesão celular vascular 1
Viabl	Viabilidade.
VLA-4	Antígeno 4 tardio
WT	<i>Wild type</i>
α -MSH	Hormônio alfa estimulador de melanócitos

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura da Eumelanina e Feomelanina	2
Figura 2 Fluxograma da busca na literatura e critérios de seleção. Adaptado do PRISMA 2020 (PAGE et al., 2021).	22
Figura 3. Características dos tratamentos antioxidantes dos estudos incluídos	33
Figura 4. Modulação do estresse oxidativo (EO) em células de melanoma tratadas com antioxidantes.....	34
Figura 5. Modulação do estresse oxidativo (EO) em células de melanoma e seu efeito na viabilidade celular (Viabl).....	35
Figura 6. Modulação do estresse oxidativo (EO) em células de melanoma e seus efeitos na apoptose.....	36

Lista de Tabelas

Tabela 1. Estratégia PICOS utilizada para elaboração da pergunta da revisão sistemática e critérios de elegibilidade.	16
Tabela 2. Estratégia de busca da revisão sistemática.	18
Tabela 3. Resumo das características descritivas dos estudos incluídos (n=29) (Continua). ..	24
Tabela 4. Resumo das informações sobre mutações gênicas presente nas células de melanoma dos trabalhos incluídos.	37
Tabela 5. Comparação na modulação de EROS intracelular entre células tumorais e não tumorais após tratamento com antioxidante.	38
Tabela 6. Risco de viés de estudos individuais avaliados por critérios adaptados de MARQUES et al., 2016 (continua).	40
Tabela 8. Artigos excluídos e razão da exclusão (n=59) (continua).	57

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Melanoma: Definição e Fisiopatologia	1
1.2	Epidemiologia	4
1.3	Diagnóstico	5
1.4	Tratamento	8
1.5	Microambiente do melanoma e equilíbrio REDOX	9
1.6	Manejo de EROs no microambiente do melanoma	11
2	Objetivos	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos específicos	14
3	Metodologia	15
3.1	Protocolo	15
3.2	Critério de elegibilidade	15
3.3	Crítérios de inclusão	15
3.4	Crítérios de exclusão	16
3.5	Fonte de informação e estratégia de busca	16
3.6	Seleção de estudos	19
3.7	Processo de coleta e extração de dados	19
3.8	Risco de viés	19
3.9	Medida dos resultados	20
4	Síntese dos resultados	21
4.1	Estudos selecionados	21
4.2	Características dos estudos	22
4.3	Características dos tratamentos antioxidantes dos estudos incluídos na revisão	33
4.4	Modulação do estresse oxidativo (EO) em células de melanoma tratadas com antioxidantes	33
4.5	Modulação do estresse oxidativo em células de melanoma e seu efeito na viabilidade celular	34
4.6	Modulação do estresse oxidativo em células de melanoma e seus efeitos na apoptose	35
4.7	Mutação gênica em células humanas dos estudos incluídos na revisão	36
4.8	Tratamento com antioxidante em células de melanoma <i>versus</i> células não tumorais	37
5	Discussão	43

6. Conclusão	51
7. Referências Bibliográficas.....	52
Apêndice A.....	57

Resumo

ALMEIDA, Hanna Santana de. **Efeitos de antioxidantes na modulação do estresse oxidativo no microambiente do melanoma: uma revisão sistemática**. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2022.

O melanoma é um câncer de pele agressivo e de difícil tratamento. Estudos sugerem que a agressividade e falta de resposta a tratamentos do melanoma são adquiridas por mutações e alterações no microambiente tumoral. Também tem sido demonstrado que a capacidade redox da pele saudável é diferente da de células de melanoma, e que o sistema antioxidante das células do melanoma é adaptado para suportar o estresse aumentado. Esta revisão sistemática teve como objetivo avaliar o tratamento com antioxidantes na modulação do estresse oxidativo em modelos de estudos *in vitro*. Para elaboração da pergunta de pesquisa foi utilizada a estratégia PICOS e a busca eletrônica foi realizada nas bases de dados MEDLINE via PubMed, EMBASE, *Web of Science* e literatura cinza utilizando *Google Scholar*. Todos os estudos incluídos foram publicados em língua inglesa sem restrição de data de publicação. O formato de medida de dados usado para apresentar os resultados foi dicotômico para todos os desfechos avaliados. Vinte e nove estudos foram incluídos nesta síntese descritiva, a presença da modulação do estresse oxidativo após tratamento com antioxidante foi definida como desfecho principal e todos os estudos apresentavam estes dados. Dentre os estudos incluídos, 20 estudos mostraram aumento do estresse oxidativo intracelular após tratamento com antioxidante e 9 relataram diminuição no estresse oxidativo nas células de melanoma. Além disso, 21 estudos avaliaram a viabilidade celular, dentre eles 15 mostraram queda na viabilidade celular junto com o desfecho de aumento do estresse oxidativo após tratamento com antioxidante. Treze estudos avaliaram apoptose celular, dentre eles 12 mostraram aumento de apoptose ou alteração em uma das vias da apoptose. Para análise do risco de viés, uma ferramenta foi adaptada para avaliação dos estudos *in vitro*. Os achados desta revisão sistemática sugerem que antioxidantes de origem natural podem atuar como pró-oxidantes em células de melanoma, causando queda na viabilidade e ativando apoptose nas células, sendo possíveis candidatos a agentes anticâncer.

Palavras chaves: Melanoma, antioxidantes, estresse oxidativo, célula de melanoma, viabilidade celular, apoptose.

Abstract

ALMEIDA, Hanna Santana de. **Effects of antioxidants on the modulation of oxidative stress in the microenvironment of melanoma: a systematic review.** Master's Dissertation in Pharmaceutical Sciences – Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brasília 2022.

Melanoma is an aggressive skin cancer that is difficult to treat. Studies suggest that aggressiveness and unresponsiveness of melanoma to treatments are acquired by mutations and changes in the tumor microenvironment. It has also been shown that the redox capacity of healthy skin is different from that of melanoma cells, and that the antioxidant system of melanoma cells is adapted to withstand increased stress. This systematic review aimed to evaluate the treatment with antioxidants in the modulation of oxidative stress in models of *in vitro* studies. For the elaboration of the research question, the PICOS strategy was used and the electronic search was performed in the MEDLINE databases via PubMed, EMBASE, Web of Science and grey literature using Google Scholar. All included studies were published in English without publication date restriction. The data measurement format used to present the results was dichotomous for all outcomes assessed. Twenty-nine studies were included in this descriptive synthesis, the presence of oxidative stress modulation after treatment with antioxidant was defined as the main outcome and all studies showed these data. Among the included studies, 20 studies showed increased intracellular oxidative stress after treatment with antioxidant, and 9 reported a decrease in oxidative stress in melanoma cells. In addition, 21 studies evaluated cell viability, among them 15 showed a decrease in cell viability along with the outcome of increased oxidative stress after treatment with antioxidant. Thirteen studies evaluated cell apoptosis, among them 12 showed increased apoptosis or alteration in one of the apoptosis pathways. To analyze the risk of bias, a tool was adapted for the evaluation of *in vitro* studies. The findings of this systematic review suggest that antioxidants of natural origin may act as pro-oxidants in melanoma cells, causing a decrease in viability and activating apoptosis in cells, which may cause being possible candidates for anticancer agents.

Keywords: Melanoma, antioxidants, oxidative stress, melanoma cell, cell viability, apoptosis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Melanoma: Definição e Fisiopatologia

Melanoma é uma neoplasia melanocítica maligna. Os melanócitos são células pigmentares normais que durante a gestação derivam da crista neural e migram para nossa pele, olhos e outros tecidos em menor número (SHAIN; BASTIAN, 2016 AHMED; QADIR; GHAFOOR, 2020). Mesmo a pele sendo o maior órgão do corpo, um humano adulto apresenta aproximadamente 3 bilhões de melanócitos, o que representa uma população minoritária de células, além de estas células apresentarem uma baixa divisão celular (SHAIN; BASTIAN, 2016). Basicamente a função dos melanócitos é nos proteger da ação genotóxica da radiação ultravioleta (UV) por meio da melanina, produzida por estas células (LIN; FISHER, 2007). Quando a radiação UV toca nossa pele atingindo os queratinócitos, estes são então estimulados a produzir o hormônio alfa estimulador de melanócitos (α -MSH) que se liga ao receptor de melanocortina 1 (MC1R), presente nos melanócitos, e estimula a produção de melanina (LIN; FISHER, 2007 SHAIN; BASTIAN, 2016).

A melanina protege o DNA das células tronco epidérmicas contra o dano causado pela radiação UV, sendo uma das formas de proteção a neutralização das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pela radiação UV (LEUPOLD et al., 2021 AHMED; QADIR; GHAFOOR, 2020).

Os melanócitos produzem dois tipos de melanina: *i)* a eumelanina (preta/marrom) é a que mais oferece proteção contra a radiação UV, e as proteínas relacionadas à tirosinase, TRP1 e TRP2, participam de sua produção; *ii)* a feomelanina (vermelha/amarela) é derivada da conjugação da dopaquinona com cisteína ou glutathione, que forma cisteinildopa e benzotiazinilalanina, e resulta na feomelanina

(Figura 1) (ITO & WAKAMATSU, 2008). Além de proteger menos contra a radiação UV, a feomelanina é mais fotolábil, e pode produzir subprodutos como peróxido de hidrogênio, ânion radical superóxido, e hidroxila, induzida pela radiação ultravioleta A (UVA) principalmente, causando um maior dano ao DNA e produção de carcinógenos (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019 LIN; FISHER, 2007).

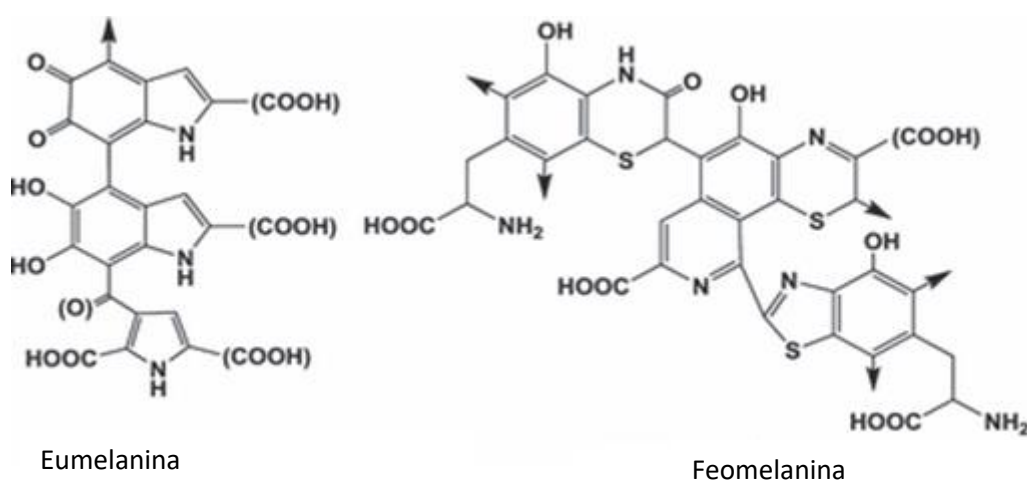


Figura 1. Estrutura da Eumelanina e Feomelanina

Figura extraída e adaptada de Ito e Wakamatsu, 2007.

A forma como a radiação UV causa câncer ainda vem sendo estudada para ser totalmente esclarecida. Uma das linhas de explicação mais comum é a de que a maior produção de eumelanina (pele, cabelo e olhos escuros) causa uma maior proteção contra câncer de pele melanoma e não melanoma, enquanto a pele em que há predominância de feomelanina (pele clara, cabelos loiros ou ruivos, olhos claros) apresenta risco aumentado para o aparecimento estes cânceres (LIN; FISHER, 2007). A coloração da pele, olhos e cabelo é, em parte, controlada pelo MC1R. Alguns polimorfismos no gene que codifica MC1R acarreta numa perda de função que causa uma queda na produção de eumelanina e aumento na produção de feomelanina, e quanto mais polimorfismo e variações de MC1R mais suscetibilidade aos danos causados pela radiação UV ao

DNA; se essas mutações se acumulam o câncer de pele pode surgir (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

A mutação do DNA mais comum causada pela radiação UV que leva ao câncer de pele melanoma é a formação dos fotoprodutos decorrentes da dimerização entre as ligações duplas C5-C6 de bases pirimidinas adjacentes timina (T) e citosina (C), em que ocorre a transição C→T (DOUKI, 2020).

A maior causa de melanoma em pessoas de pele e cabelos claros é a exposição ao sol, e quanto maior o dano crônico causado na pele pela exposição solar, maior o número de mutações somáticas nos genes NF1, NRAS, BRAF e KIT, que afetam as principais vias de sinalização da proliferação celular (SHAIN; BASTIAN, 2016).

O melanoma de pele cronicamente exposta ao sol aparece geralmente acima dos 55 anos, em áreas que foram mais expostas aos sol ao longo da vida, como cabeça, pescoço e costas (LEONARDI et al., 2018). Nestes casos, as vias de sinalização RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK) e PI3K-AKT sofrem ativação constante por diversos mecanismos, e a mutação em BRAF faz parte da iniciação de grande parte dos melanomas, sendo que em 60% dos casos ocorre uma mutação em que um ácido glutâmico substitui uma valina no codon 600 no exon 15 (Val600Glu; BRAF^{V600E}) (GUARNERI et al., 2017).

Além da exposição ambiental ao sol, existe também uma predisposição genética; as pessoas mais susceptíveis geneticamente costumam, ao longo da vida, apresentar ‘nevus’ melanocíticos. A quantidade e tamanho de nevus varia de indivíduo para indivíduo, e estes apresentam, em sua maioria, a mutação BRAF^{V600E} (SHAIN BASTIAN, 2016; SCHADENDORF et al., 2015). Contudo, apenas a mutação em BRAF sozinha não é suficiente para que os nevus progridam para melanoma. Os nevus

podem ficar em endolência por décadas pela vigilância imunológica, o surgimento do melanoma apenas pelo nevo melanocítico está associado a mutações em genes-chave como TERT ou CDKN2A (LEONARDI et al., 2018).

Um histórico familiar de melanoma é um forte fator de risco, e, nesses casos, a mutação mais comumente encontrada é em CDKN2A, e costuma ocorrer em pacientes mais jovens, com menos de 40 anos (MARCO RASTRELLI, SAVERIA TROPEA, 2016). Neste caso o melanoma pode surgir de nevos ou lesão pré-existente, diferente do melanoma causado por uma exposição crônica ao sol, que dificilmente surge de um nevo, mas sim como um melanoma *in situ* – proliferação de melanócitos com alterações nucleares que crescem de maneira irregular dentro da epiderme - ou surgem de lesões displásicas (LEONARDI et al., 2018 SHAIN; BASTIAN, 2016).

1.2 Epidemiologia

A estimativa do Instituto Nacional do Câncer para 2020-2022 (Instituto Nacional de Câncer, 2019) era de que, neste biênio, o número de novos casos de câncer de pele melanoma seria de 4.200 em homens e 4.250 em mulheres, significando 4,03 novos casos a cada 100 mil habitantes para homens e 3,94 para cada 100 mil habitantes para mulheres.

Em 2017, ocorreram no Brasil 1.031 óbitos por câncer de pele melanoma para homens, representando um risco de 1,02/100 mil e 804 óbitos em mulheres, um risco de 0,78/100 mil (INCA, 2019). No mesmo ano, no Brasil, ocorreram 1.301 óbitos de câncer de pele não melanoma em homens; esse valor corresponde ao risco de 0,92/100 mil, e 949 óbitos em mulheres, com risco de 0,92/100 mil (INCA, 2019). Na Região Sul, o câncer de pele melanoma é mais incidente quando comparado com as demais regiões do país, para ambos os sexos (INCA, 2019).

Nos Estados Unidos, o melanoma representa 1% dos casos de câncer de pele, mas representa o maior número de mortes. Para 2022, estima-se que 99.780 casos da doença invasiva e 97.920 casos de melanoma *in situ* serão diagnosticados no país, enquanto 7.650 pessoas morrerão da doença, sendo mais comum a ocorrência em mulheres do que em homens com menos de 50 anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022).

1.3 Diagnóstico

Em 1960, Wallace Clark, dermatologista, descreveu três variantes histológicas do melanoma, melanoma extensivo superficial (SSM), melanoma lentigo maligno (LMM) e o melanoma nodular (MN) (CLARK; ELDER; VAN HORN, 1986; DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019). Dos anos 60 até agora novas formas histológicas já foram conhecidas como melanoma lentiginoso acral, melanoma de mucosa, melanoma desmoplásico e melanoma nevoide, além das três primeiras variantes descritas que continuam conhecidas pela mesma denominação até hoje (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

O melanoma extensivo superficial é comum na idade mediana de 50 anos, e é o tipo mais comum (70%) de melanoma. Geralmente acometem locais que foram expostos ao sol (tronco, costas, extremidades), e é apresentado como uma lesão plana e irregular, de crescimento lento, com pigmentação variada que aumenta de forma radial e, quando ocorre a invasão dérmica, apresenta regiões elevadas. Dentre suas características estão circunscrição, espessamento epidérmico variável e melanização intracitoplasmática proeminente, sendo mais comum em homens (AHMED; QADIR; GHAFOR, 2020; MARCO RASTRELLI, SAVERIA TROPEA, 2016; SCOLYER; LONG; THOMPSON, 2011).

Melanoma nodular é comum em indivíduos mais velhos, próximo aos 70 anos, e podem ocorrer em qualquer local do corpo; corresponde a 5% dos tipos de melanoma (MARCO RASTRELLI, SAVERIA TROPEA, 2016; SCOLYER; LONG; THOMPSON, 2011). Exibe um nódulo de rápida expansão, que pode apresentar ulceração e hemorragia. Além disso, histologicamente não há componente epidérmico, estende-se além das bordas do componente dérmico e crescem verticalmente (AHMED; QADIR; GHAFOR, 2020; SCOLYER; LONG; THOMPSON, 2011).

Melanoma lentigo maligno geralmente acomete locais cronicamente expostos ao sol (cabeça, pescoço, antebraço), e é mais comum em pacientes idosos, por volta dos 80 anos. Corresponde a 4 a 15% dos casos de melanoma (MARCO RASTRELLI, SAVERIA TROPEA, 2016; SCOLYER; LONG; THOMPSON, 2011). Histologicamente, é caracterizado por um lentigo – proliferação de melanócitos atípicos em pele severamente danificada pelo sol, apresentando atrofia epidérmica com perda de cristas epiteliais, elastose solar dérmica severa e afinamento dérmico (AHMED; QADIR; GHAFOR, 2020; SCOLYER; LONG; THOMPSON, 2011).

Essa foi a primeira classificação que reconheceu as heterogeneidades do melanoma, tendo influenciado em seu diagnóstico e tratamento (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

Nas últimas décadas, o diagnóstico do melanoma foi baseado em suas características clínica e lesões pigmentares, sendo o método mais comum a regra do ABCDE: A = assimetria; B = irregularidade da borda; C = variações de cor; D = diâmetro maior que 6 mm; E = evolução de aparência (AHMED; QADIR; GHAFOR, 2020).

O prognóstico do melanoma é diretamente relacionado à profundidade da neoplasia, que aumenta rapidamente (MARCO RASTRELLI, SAVERIA TROPEA, 2016). Quando comparado com outros tipos de câncer, o melanoma tem a vantagem de ter localização cutânea na maioria dos casos, o que facilita sua detecção precoce (MARCO RASTRELLI, SAVERIA TROPEA, 2016).

Outra abordagem clínica é a escala de Glasgow com 7 pontos de verificação, 3 critérios principais (alteração de tamanho, forma, cor) e 4 critérios menores (alteração sensorial, diâmetro de 7 mm ou mais); e presença de inflamação, crostas ou sangramento (AHMED; QADIR; GHAFOR, 2020).

A dermatoscopia é um exame não invasivo que pode ser utilizado no diagnóstico. O dispositivo faz a ampliação óptica que permite a análise das estruturas morfológicas que não são visíveis a olho nu. A dermatoscopia torna os sinais precoces do melanoma mais visíveis e de mais fácil detecção da doença em estágio inicial (MARCO RASTRELLI, SAVERIA TROPEA, 2016).

O *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (GERSHENWALD et al., 2017) e a Sociedade Brasileira de Oncologia (SBOC) utilizam um sistema de estadiamento para pacientes já diagnosticados com o melanoma que combina atributos histológicos do tumor primário (T), a presença e extensão da doença linfonodal regional (N) e a presença e extensão da metástase distante (M), além da profundidade de Breslow, atributos do tumor primário, como ulceração, taxa mitótica, inflamação associada ao tumor e regressão. Os destaques das mudanças baseadas em evidências refletidas nos atuais critérios de estadiamento incluem refinamentos nas medições da espessura do tumor, remoção da atividade mitótica como motivo para ofuscar um melanoma fino, expansão do linfonodo regional (N), categorias com base no número de linfonodos regionais positivos, categorias de expansão de metástases (M), com base na

localização da metástase e agrupamentos de estágios expandidos na doença em estágio III para melhor estratificar o prognóstico em longo prazo (SBOC -SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA, 2022)

1.4 Tratamento

A diretriz de tratamento oncológico para o melanoma da Sociedade Brasileira de Oncologia (publicada em 06/04/2022) orienta que, em caso de doença localizada, a cirurgia é a primeira linha de tratamento com indicação de pesquisa de linfonodo sentinela (SBOC - SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA, 2022). Essa pesquisa é importante devido ao fato de o melanoma ser altamente metastático, sendo os principais sítios pulmões, linfonodo, cérebro, e os menos comuns pâncreas, ossos, intestino delgado e glândulas adrenais (AHMED; QADIR; GHAFOR, 2020).

Atualmente, o tratamento do melanoma é cada vez mais voltado para terapia alvo (AHMED; QADIR; GHAFOR, 2020; DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019); a terapia adjuvante (tratamento pós cirúrgico) recomendada na diretriz da SBOC de 2022 inclui inibidores de BRAF (vemurafenibe, dabrafenibe ou encorafenibe) e MEK (cobimetinibe, trametinibe ou binimetinibe) e todo paciente com melanoma estágio III deve ser submetido á investigação de mutação do gene BRAF.

No caso de doenças em estágio avançado (oligometastática), a diretriz da SBOC recomenda a discussão sobre ressecção cirúrgica ou radioterapia estereotáxica ablativa. Também são recomendadas pesquisas de mutações KIT, NRAS e fusões de TRK. Esses pacientes são candidatos a tratamento com anti-PD-1 (pembrolizumabe ou nivolumabe) por 12 meses. Esses medicamentos são utilizados em protocolos terapêuticos junto com outros quimioterápicos como dacarbazina, cisplatina, paclitaxel e vinblastina (SBOC - SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA, 2022).

O uso da Interleucina 2 (IL-2) é uma terapia imunológica, não são todos os pacientes que apresentam respostas (apenas 6%) com doses pequenas ao tratamento. (AHMED; QADIR; GHAFOOR, 2020; DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

1.5 Microambiente do melanoma e equilíbrio REDOX

O microambiente tumoral do melanoma é formado por células malignas, mas não apenas, no estroma encontram-se células inflamatórias, células imunes, fibroblastos, moléculas solúveis, tudo isso circundado pela matriz extracelular (MEC) (GUARNERI et al., 2017). Durante a progressão do melanoma, a interação destes componentes faz a diferença na progressão do tumor e na sua característica invasiva (GIAVINA-BIANCHI; GIAVINA-BIANCHI JUNIOR; FESTA NETO, 2017). O microambiente tumoral já é considerado na abordagem terapêutica do melanoma, principalmente na doença avançada (GIAVINA-BIANCHI; GIAVINA-BIANCHI JUNIOR; FESTA NETO, 2017). A aprovação de medicamentos como vemurafenibe, dabrafenibe e trametinibe são reflexos de pesquisas moleculares básicas e ensaios clínicos com descobertas de aspectos moleculares do melanoma (GIAVINA-BIANCHI; GIAVINA-BIANCHI JUNIOR; FESTA NETO, 2017).

Para que uma progressão maligna aconteça nos tumores, ocorrem múltiplas alterações em vias metabólicas, principalmente na produção de componentes básicos (aminoácidos, nucleotídeos) que promovem o crescimento tumoral (PANIERI; SANTORO, 2016). Durante essa produção, substratos energéticos são liberados destas vias para outras rotas metabólicas, podendo estas rotas serem de geração de moléculas antioxidantes (NADPH e GSH) ou cofatores redox (NADH e FADH); ambos contribuem para uma homeostase redox adequada (PANIERI; SANTORO, 2016).

As primeiras evidências de alteração redox no microambiente do melanoma foi a observação da superexpressão de SOD2 (isoforma da enzima superóxido dismutase) (OBRADOR et al., 2019). Também foi observado que a superexpressão do gene NOX 1 aumentava a capacidade de invasão celular via metaloproteinase 2 (MMP-2), e a inibição de NOX 1 modificava a adesão celular (OBRADOR et al., 2019). Essas descobertas mostram a interferência de EROs na MEC do melanoma.

EROs são moléculas de vida curta, com elétrons desemparelhados, derivadas do oxigênio molecular parcialmente reduzido que estão em constante geração, eliminação e transformação em uma variedade de processos, como metabolismo, proliferação e diferenciação celular, reação do sistema imunológico e remodelação vascular (PANIERI; SANTORO, 2016). Conforme o tumor progride, mais EROs são produzidas e, para resistir a este aumento de espécies reativas, as células tumorais dependem de suas defesas antioxidantes para manter sua homeostase redox. Assim, as células fazem uso de suas vias metabólicas para suprir o microambiente de moléculas antioxidantes, a glutathione é um exemplo destas moléculas (PANIERI; SANTORO, 2016).

O entendimento de como EROs participam do início da carcinogênese do melanoma é parcialmente compreendido pelo seu envolvimento na forma como a radiação UV causa dano ao DNA; a síntese de melanina nos melanócitos gera EROs, o que torna estas células suscetíveis ao dano causado pela radiação UV (OBRADOR et al., 2019). Além disso, a síntese de feomelanina produz EROs, e a liberação de EROs também ocorre na presença de formas não funcionais do receptor MCR1, que acarreta em uma baixa produção de eumelanina, que apresenta uma maior proteção contra radiação UV e menor produção de EROs (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019). Contudo, o dano oxidativo é mais presente nas mutações causadas pela radiação UV no

DNA, com a formação dos dímeros de timina, como citado anteriormente (DOUKI, 2020). A mutação em BRAF, muito presente no melanoma, não é uma mutagênese oxidativa (OBRADOR et al., 2019; SHAIN; BASTIAN, 2016).

O mecanismo pelo qual as EROs atuam na progressão do melanoma ainda não é totalmente esclarecido, os biomarcadores usados para identificar e estudar o melanoma não englobam marcadores de estresse oxidativo específicos. Entretanto, os estudos mostram níveis elevados de EROs em amostras tumorais de pacientes com melanoma quando comparadas com um controle saudável, além de estudos *in vitro* permitirem a observação do estresse oxidativo aumentado nas células (OBRADOR et al., 2019; SANDER et al., 2004).

O envolvimento de EROs no câncer vem sendo estudado nas últimas décadas, incluindo no câncer de pele melanoma, e a conclusão mais clara até o momento é a de que não existe resposta simples, pois a presença de EROs nas vias do microambiente tumoral pode funcionar como agente promotor ou supressor de tumor (OBRADOR et al., 2019).

1.6 Manejo de EROs no microambiente do melanoma

Sabido que as células tumorais trabalham constantemente para manter um equilíbrio redox que as permitam sobreviver e continuar a progressão do câncer (PANIERI; SANTORO, 2016), entra o questionamento do papel de substâncias pró-oxidantes e antioxidantes no câncer. Antioxidantes são substâncias que eliminam EROs de forma direta ou atuam indiretamente melhorando as defesas endógenas antioxidantes (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Já os pró-oxidantes são substâncias que induzem o estresse oxidativo, formando espécies reativas ou inibindo a defesa antioxidante

endógena; a maioria dos quimioterápicos medeia sua ação desta forma, aumentando EROs (CAROCHO; FERREIRA, 2013; PRASAD; GUPTA; TYAGI, 2017).

Dentre as duas opções, o potencial benéfico dos antioxidantes na saúde é bem estabelecido, sendo substâncias muito citadas quando se trata da prevenção do desenvolvimento de câncer (PRASAD; GUPTA; TYAGI, 2017). Dados epidemiológicos reforçam que o consumo de dietas rica em antioxidantes reduz o risco de doenças crônicas, incluindo o câncer (PRASAD; GUPTA; TYAGI, 2017).

No entanto o tratamento com antioxidantes isolados ou associados à quimioterapia em pacientes com câncer ainda é um tema controverso (PRASAD; GUPTA; TYAGI, 2017). Em 1996, um ensaio clínico mostrou resultados piores para pacientes com câncer de pulmão tratados com betacaroteno e vitamina A (HAWK; MCCALLISTER; SCHAFER, 2016; OMENN et al., 1996). No caso do melanoma, já foi mostrado em um estudo que o antioxidante fisetina inibiu a progressão do melanoma em camundongos (PAL et al., 2015). Um estudo em humanos com consumo de antioxidante não mostrou diferença na supressão do melanoma (ARSLANBAEVA; SANTORO, 2020), alguns estudos já mostraram que, *in vivo*, antioxidantes aumentam metástase do melanoma (ARSLANBAEVA; SANTORO, 2020), e, em 2005, foi sugerido que a associação de antioxidante e quimioterapia/radioterapia não seria benéfica (ARSLANBAEVA; SANTORO, 2020; D'ANDREA, 2005).

Atualmente, poucos dados sobre a defesa antioxidante no câncer melanoma estão disponíveis. Os estudos que avaliaram tumores de melanoma encontraram um equilíbrio antioxidante perturbado, com enzimas antioxidantes muito aumentadas, e algumas hipóteses também sugerem que as células de melanoma aumentam sua produção de EROs para atacar células vizinhas e contribuir com a progressão do câncer,

sugerindo que a homeostase redox no melanoma pode interferir em sua patogênese (SANDER et al., 2004).

Essa característica de EROs aumentadas e defesa antioxidante eficiente no melanoma fez com que fosse sugerido o uso de antioxidantes para diminuir o estresse oxidativo ou pró-oxidantes para aumentar o estresse até que ele se tornasse potencialmente tóxico para esta célula (OBRADOR et al., 2019). Antioxidantes podem reduzir EROS e diminuir a sinalização celular, diminuindo a progressão do câncer, ao passo que os pró-oxidantes podem aumentar EROs de forma que se tornem potencialmente tóxicas para a célula tumoral. No entanto, a estratégia escolhida deve ser pensada no nível da variação de EROs para o melhor controle da sinalização celular (PRASAD; GUPTA; TYAGI, 2017).

Há resultados controversos no uso de antioxidantes no câncer, alguns com resultados até opostos (ARSLANBAEVA; SANTORO, 2020). Para o desenvolvimento de tratamentos bem sucedidos direcionados ao melanoma deve-se buscar entender o papel de cada tratamento atuando sobre a homeostase redox do melanoma (OBRADOR et al., 2019).

Assim, esta revisão teve como objetivo, avaliar os estudos *in vitro* que investigaram o efeito de antioxidantes em células de câncer de pele melanoma, com o intuito de reunir e avaliar dados sobre como os antioxidantes atuam na modulação do estresse oxidativo no microambiente do melanoma.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Descrever de forma sistemática, a partir de estudos *in vitro* disponíveis na literatura científica, o efeito de antioxidantes na modulação do estresse oxidativo em células de câncer de pele melanoma.

2.2 Objetivos específicos

Realizar busca nas bases de dados e literatura cinzenta; realizar leitura de títulos e resumos e leitura integral de estudos selecionados; classificar os artigos de acordo com critérios de inclusão e exclusão; realizar a extração de dados utilizando ferramentas como Excel e Mendeley; adaptar uma ferramenta para análise e fazer a avaliação do risco de viés em estudos *in vitro*.

3. Metodologia

3.1 Protocolo

Esta revisão sistemática foi conduzida e relatada de acordo com as diretrizes *do Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta Analyses* (PRISMA) 2020. O PRISMA 2020 consiste em uma lista com 27 itens para verificação e recomendações que auxilia autores revisores a selecionar, avaliar e sintetizar estudos, e mostrar de maneira clara e objetiva seu método e resultado (PAGE et al., 2021b).

3.2 Critério de elegibilidade

A pergunta que norteou a pesquisa desta revisão sistemática foi: Quais os efeitos dos antioxidantes na modulação do estresse oxidativo no microambiente tumoral do câncer de pele melanoma?

A estratégia PICOS foi utilizada para elaboração da pergunta de pesquisa (DE LUCA CANTO, 2015)

3.3 Critérios de inclusão

Artigos que avaliaram o efeito de antioxidantes, descritos na literatura científica, modulando o estresse oxidativo em células de câncer de pele melanoma e que atendessem à estratégia PICOS descrito na Tabela 1, sendo qualquer dosagem de tratamento elegível para a inclusão.

Tabela 1. Estratégia PICOS utilizada para elaboração da pergunta da revisão sistemática e critérios de elegibilidade.

Acrônimo	Definição	Descrição
P	População	Células de câncer de pele melanoma de modelo murino e humano
I	Intervenção	Uso de antioxidante
C	Comparação	Células não tratadas
O	Outcome / Desfecho	Desfecho primário: modulação do estresse oxidativo. Desfechos secundários: viabilidade celular, migração celular, apoptose celular.
S	Study type / Tipo de estudo	Estudos <i>in vitro</i> com <i>baseline</i> comparável (XIAO et al., 2013)

3.4 Critérios de exclusão

Os estudos foram excluídos pelos seguintes motivos: (1) artigos fora da estratégia PICOS – não avaliaram a modulação do estresse oxidativo após tratamento com antioxidante em célula de melanoma; (2) Artigos que descreviam estudos *in vivo*; (3) Ensaio clínico; (4) Revisões, cartas, opiniões pessoais, capítulos de livros e resumos de conferências; (5) Artigos sem cópia integral disponível; (6) artigos em língua não-inglesa.

3.5 Fonte de informação e estratégia de busca

A busca eletrônica foi realizada em 2021 e atualizada no dia 13 de Abril de 2022, nas bases de dados MEDLINE via PubMed, EMBASE, *Web of Science*, e a literatura cinza foi pesquisada no *Google Scholar*. A estratégia de busca foi realizada por meio do cruzamento de palavras definidas pelo acrônimo PICOS (Tabela 1), sendo as mais relevantes “melanoma”, “antioxidants” e “oxidative stress”, como mostrado na Tabela 2. Além disso, a referência bibliográfica de cada artigo foi verificada de maneira manual para detecção de possíveis estudos que poderiam ter sido perdidos durante a busca nas bases de dados eletrônicos.

Após a busca eletrônica e identificação dos artigos, a ferramenta escolhida para detecção de duplicatas e seleção dos artigos quanto ao critério de inclusão e exclusão foi o Rayyan QCRI (*Qatar Computing Research Institute*, Doha, Qatar).

Tabela 2. Estratégia de busca da revisão sistemática.

Base de dados	Busca 13 de Abril de 2022
PUBMED	#1 ("melanoma" OR "melanoma"[MeSH Terms] OR melanoma[Text Word] OR Melanomas OR "Malignant Melanoma" OR "Malignant Melanomas") #2 ("antioxidants"[All Fields] OR "antioxidants"[MeSH Terms] OR antioxidants[Text Word] OR "Anti-Oxidants" OR "Anti Oxidants" OR "Antioxidant" OR "Anti-Oxidant" OR "Anti Oxidant" OR "Antioxidant Activity" OR "Antioxidant Effect" OR "Anti-Oxidant Effect" OR "Anti Oxidant Effect" OR "Anti-Oxidant Effects" OR "Anti Oxidant Effects" OR "Antioxidant Effects") OR ("Superoxide Dismutase" [All Fields] OR "Superoxide Dismutase" [MeSH Terms] OR "Superoxide Dismutase" OR catalase [All Fields] OR catalase [MeSH Terms] OR catalase [Text Word]) #3 ("oxidative stress" [All Fields] OR "oxidative stress" [MeSH Terms] OR "oxidative stress" [Text Word] OR "reactive oxygen species" [All Fields] OR "reactive oxygen species" [MeSH Terms] OR "reactive oxygen species" [Text Word] OR "oxidative damage" [All Fields] OR "oxidative damage" [Text Word]) OR ("lipid peroxidation" [Text Word] "lipid peroxidation" [MeSH Terms] "lipid peroxidation" [Text Word]) #4 ("cultured cell" OR "in vitro" OR "cultured cells" OR "cell, cultured" OR "cells, cultured" OR "cell culture" OR "cell cultures" OR "cell culture technique" OR "primary cell culture" OR "primary cell cultures" OR in vitro[Text Word]) #5 : #1 AND #2 AND #3 AND #4
WEB OF SCIENCE	#1 - TS=(melanoma OR Malignant Melanoma) #2 – TS=(antioxidants OR "Anti-Oxidants" OR "Antioxidant Effect" OR "Superoxide Dismutase" OR Catalase) #3 – TS=("Oxidative Stress" OR "Reactive Oxygen Species" OR "Oxidative Damage" OR "Lipid Peroxidation") #4 – TS=("cultured cell" OR "in vitro" OR "cell, cultured" OR "cell culture technique" OR "primary cell culture") #5 : #1 AND #2 AND #3 AND #4
EMBASE	#1'melanoma'/exp OR 'melanoma' OR 'malignant melanoma'/exp OR 'malignant melanoma' #2'antioxidant'/exp OR 'antioxidant' OR 'antioxidant effect' OR 'superoxide dismutase' OR 'superoxide dismutase'/exp OR 'catalase' OR 'catalase'/exp #3'oxidative stress' OR 'oxidative stress'/exp OR 'reactive oxygen species' OR 'reactive oxygen metabolite' OR 'reactive oxygen metabolite'/exp OR 'oxidative damage' OR 'oxidative damage'/exp OR 'lipid peroxidation' OR 'lipid peroxidation'/exp #4'cell culture' OR 'cell culture'/exp OR 'in vitro study' OR 'in vitro study'/exp OR 'cell culture technique' OR 'cell culture technique'/exp OR 'primary cell culture' OR 'primary cell culture'/exp #5: #1 AND #2 AND #3 AND #4
GOOGLE SCHOLAR	Melanoma and oxidative stress and antioxidants Onde minhas palavras ocorrem: em qualquer lugar do artigo 150 resultados mais relevantes (15 primeiras páginas)

3.6 Seleção de estudos

Para a seleção dos estudos, foram realizadas duas fases. Na fase 1, a ferramenta Rayyan foi usada e dois revisores (Hanna Santana de Almeida e Suzana Guimarães de Araújo) avaliaram, de forma independente, título e resumo de todos os artigos recuperados na busca eletrônica descrita. Ainda na fase 1, qualquer estudo que não se encaixasse no critério de inclusão foi excluído. Em caso de discordância entre os dois primeiros revisores, um terceiro revisor (Karla Braz Lopez) foi envolvido para tomar a decisão final.

A fase 2 seguiu os mesmos critérios de seleção da fase 1 e os estudos também foram analisados de forma independente pelos mesmos dois revisores (Hanna Santana de Almeida e Suzana Guimarães de Araújo). Nesta fase, ambos os revisores leram os estudos incluídos na fase 1 na íntegra. A leitura na íntegra foi realizada no *software* de gerenciamento de referências Mendeley, e qualquer desacordo foi resolvido por discussão entre os três revisores (Hanna Santana de Almeida, Suzana Guimarães de Araújo e Karla Braz Lopez) até um acordo mútuo.

3.7 Processo de coleta e extração de dados

A coleta de dados foi realizada por um revisor (Hanna Santana de Almeida) e verificada pelo segundo revisor (Suzana Guimarães Araújo). Os dados extraídos dos artigos elegíveis incluíram os nomes dos autores, ano de publicação, país, metodologia, nome da célula, intervenção de interesse (antioxidante usado), mensurações dos desfechos, resultados e conclusões principais, e esses dados foram reunidos em uma planilha. Todos os resultados correspondentes aos desfechos estabelecidos foram pesquisados em cada estudo incluído.

3.8 Risco de viés

Uma vez que não existe até o momento uma ferramenta específica para risco de viés em revisões sistemáticas *in vitro*, foi utilizada a metodologia adaptada do trabalho de MARQUES et al., 2016, que os autores desenvolveram com base em parâmetros imperativos para a realização de estudos de cultura de célula. Foi avaliado nos estudos

os seguintes parâmetros: tipo de célula, descrição do meio de cultura celular, passagem celular, condições de cultivo celular, número de repetição de cada experimento e descrição da metodologia para avaliar o resultado. A avaliação foi feita por dois revisores de forma independente, que para cada critério atribuíram a resposta ‘sim’, quando a informações foram encontradas no artigo, ou ‘não’, quando a informação não foi encontrada. Por fim, artigos que relataram (resposta ‘sim’) de um a três critérios foram classificados como de alto risco de viés, artigos que relataram quatro ou cinco dos critérios avaliados foram classificados como de médio risco de viés, e artigos que relataram seis ou sete dos critérios avaliados foram classificados como de baixo risco de viés.

3.9 Medida dos resultados

A apresentação de todos os resultados nesta revisão foi realizada por medida dicotômica. O desfecho primário: modulação do estresse oxidativo (aumento/queda). Os desfechos secundários: ação na viabilidade celular (aumento/queda/não significativo) modificação em parâmetros apoptóticos (aumento/queda).

4. Síntese dos resultados

4.1 Estudos selecionados

O diagrama de fluxo PRISMA 2020 (PAGE et al., 2021a) foi utilizado aqui para mostrar o processo sistemático da busca e elegibilidade dos artigos (Figura 2). Foram identificados 1.524 resumos nas bases de dados eletrônicas somados aos da literatura cinzenta. Após resolução das duplicas restaram 1.089 citações, e com esse número foi realizada a Fase 1 da seleção, a leitura de títulos e resumos. Nesta fase, 1.001 artigos foram excluídos e 88 seguiram para a Fase 2, de leitura integral do artigo. Após análise do texto integral de cada artigo, 29 artigos foram eleitos para esta síntese descritiva e 59 foram excluídos, sendo os motivos para a exclusão o não acordo a estratégia PICOS (n = 50), estudo que utilizou ensaios *in vivo* (n = 1), estudos em língua não-inglesa (n = 2), e resumos de conferências (n = 6). As informações dos artigos excluídos estão presente no apêndice A deste trabalho.

Os 29 estudos incluídos nesta síntese descritiva foram AL SAQR et al., 2020; ASENSI et al., 2002; BALDIVIA et al., 2018; BANDURA et al., 2005; BIMBIRAITÉ-SURVILIENÉ et al., 2021; DIACONEASA et al., 2017; HEO et al., 2018; HUANG et al., 2015; KANG et al., 2003; KIM, 2012; KIM; KANG; YOKOZAWA, 2008; KIM; YOKOZAWA, 2009; KÜÇÜKGÜL et al., 2016; KYRIAKOU et al., 2022; LEE et al., 2019; LIAO et al., 2017; LO et al., 2010; LOCATELLI et al., 2009; OTTINO; JR, 1997; PALKO-ŁABUZ et al., 2021; PARK; KIM; JEON, 2012; PRASAD; JC; SK, 2016; PROVINCIALI et al., 2015; RAUCA et al., 2019; RUSSO et al., 2008; SATOOKA et al., 2012; SCHOMBERG et al., 2020; SHUXI QIAO et al., 2012; e ZUGIC et al., 2016, e os 59 artigos que foram excluídos, com os motivos de exclusão, estão listados no APÊNDICE A deste trabalho.

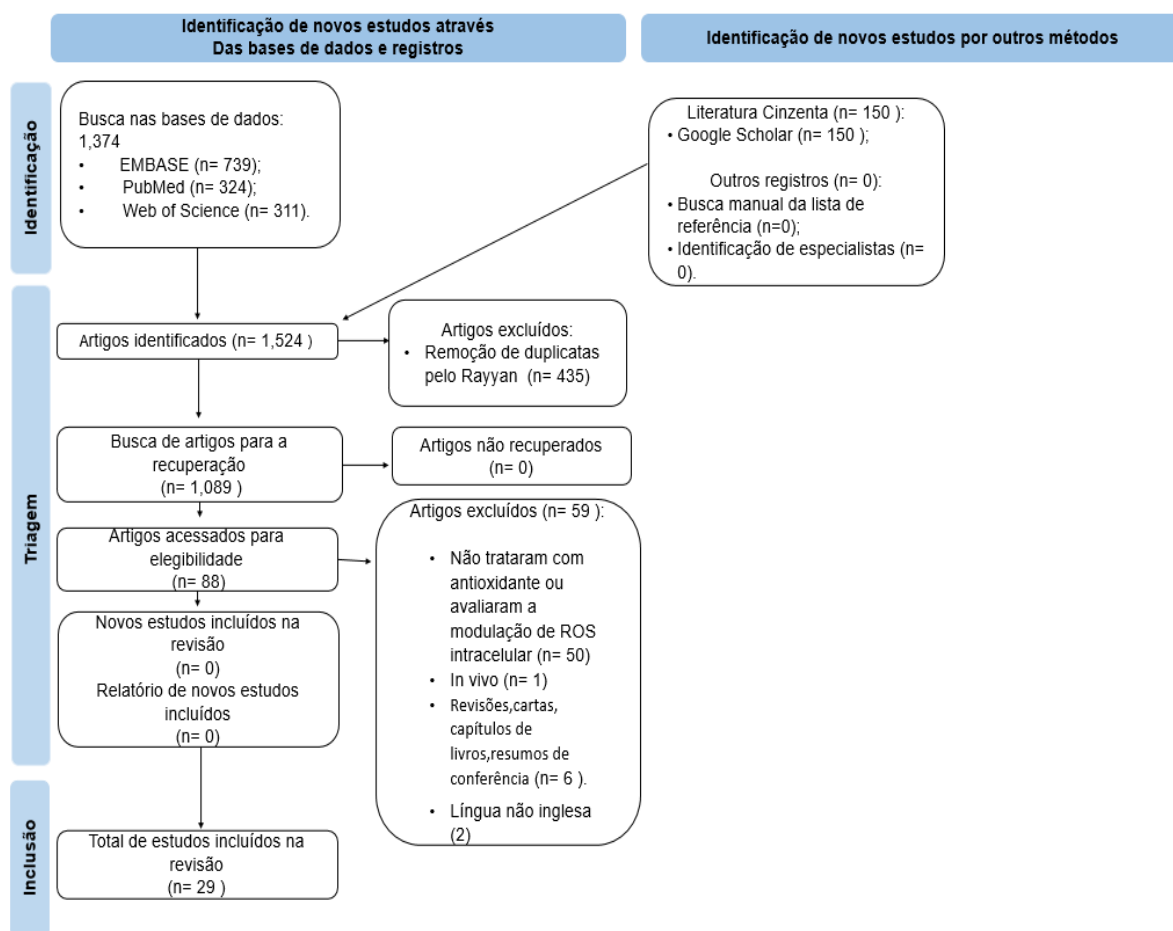


Figura 2 Fluxograma da busca na literatura e critérios de seleção. Adaptado do PRISMA 2020 (PAGE et al., 2021).

4.2 Características dos estudos

Os estudos incluídos na revisão foram publicados em inglês, estando entre eles dois trabalhos do Brasil (BALDIVIA et al., 2018; LOCATELLI et al., 2009), um trabalho da China (LIAO et al., 2017), um trabalho da Grécia (KYRIAKOU et al., 2022), dois trabalhos da Itália (PROVINCIALI et al., 2015; RUSSO et al., 2008), um

trabalho da Lituânia (BIMBIRAITĖ-SURVILIENĖ et al., 2021), dois trabalhos da Polônia (BANDURA et al., 2005; PALKO-ŁABUZ et al., 2021), um trabalho da África do Sul (OTTINO; JR, 1997), sete trabalhos da Coreia do Sul (PARK; KIM; JEON, 2012; LEE et al., 2019; KIM, 2012; KIM; YOKOZAWA, 2009; KIM; KANG; YOKOZAWA, 2008; KANG et al., 2003; HEO et al., 2018), dois trabalhos da Romênia (RAUCA et al., 2019; DIACONEASA et al., 2017), um trabalho da Sérvia (ZUGIC et al., 2016) um trabalho da Arábia Saudita (AL SAQR et al., 2020), dois trabalhos de Taiwan (LO et al., 2010; HUANG et al., 2015), um da Espanha (ASENSI et al., 2002), um da Turquia (KÜÇÜKGÜL, A.; IŞGÖR, M. M.; DÜZGÜNER, 2016), e quatro trabalhos dos Estados Unidos da América (SCHOMBERG et al., 2020; SATOOKA et al., 2012; PRASAD; JC; SK, 2016; PAUFF; MILLER, 2012). Os trabalhos foram publicados entre 1997 e 2022. Todos os trabalhos avaliaram a modulação do estresse oxidativo intracelular em células de melanoma após tratamento com antioxidante, e um resumo das características descritivas dos estudos incluídos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 1. Resumo das características descritivas dos estudos incluídos (n=29) (Continua).

Primeiro autor, ano, país	Célula de Melanoma	Metodologia	Antioxidante	EROS Intracelular	Principais desfechos
AL SAQR et al., 2020, Arábia Saudita	B16BL6 (Murino)	DCFH-DA MTT TBARS reagente de Griess Western blot Fluorimetria (caspases)	Hispolona 5, 10, 30 e 50 µmol/L	↑ Peróxido ↑ TBARS	↓ Viabilidade celular ↑ Geração NO ↑ Caspase 1 ↑ Caspase 3
ASENSI et al., 2002, Espanha	B16M (Murino)	DCFH-DA Iodeto de propídio VLA-4 and VCAM-1 (Citometria de Fluxo)	Resveratrol 2µM, 5 µmol/L and 10 µmol/L	↓ Peróxido	↓ O ₂ ^{•-} ↓ Crescimento celular ↓ Adesão celular ↓ Invasão celular
BALDIVIA et al., 2018, Brasil	B16F10 (Murino) B16F10Nex-2 (Murino)	CM-H2DCFDA MTT Citometria de Fluxo (caspase-3 fluorophore (Asp175)) Citometria de Fluxo (JC-1)	<i>Stryphnodendron adstringens</i> 65 µg/mL	↑ Peróxido	↓ Viabilidade celular ↑ Caspase 3 ↓ Potencial de membrana mitocondrial
BANDURA et al., 2005, Polônia	Hs294t (Humano)	Iodeto de propídio TBARS Citometria de Fluxo (annexina-V e Tubulina)	Selenito de sódio (10 µmol/L) Selenato de sódio (500 µmol/L)	↑ MDA	↓ Viabilidade celular ↓ Crescimento Celular

Legenda: ↓: Diminuição/regulação negativa; ↑: Aumento/regulação positiva; DCFH-DA/ H2DCFDA: 2',7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína; EROS: Espécies reativas de oxigênio; MDA: malondialdeído; MTT: (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium]); NO: óxido nítrico; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; VIA-4: Antígeno 4 tardio; VACAM: Proteína de adesão celular vascular 1.

Tabela 3. Resumo das características descritivas dos estudos incluídos (n=29) (Continuação).

Primeiro autor, ano, país	Célula de Melanoma	Metodologia	Antioxidante	EROS Intracelular	Principais desfechos
BIMBIRAITĖ-SURVILIENĖ et al., 2021, Lituânia	SK-MEL-28 (Humano)	Quantificação de MDA (Cromatografia GC/MS)	<i>Satureja hortensis</i> L. 12.5–100 µg/mL	↑ MDA (100µg/mL- extratos F1, F2 and F3)	↑ peroxidação lipídica
DIACONEASA et al., 2017, Romênia	A-375 (Humano) B16-F10 (Murino)	HPLC MTT LDH –(Kit- Rockford, IL 61,105 USA MitoTracker (MitoTracker™ Red CMXRos)	Extrato Rico em Antocianina (ARE) 300 µg/mL Arônia (C-ARE) Uva vermelha (RG-ARE)	↑ MDA (A-375 RG-ARE)	↓ Proliferação celular ↓ Potencial de membrana mitochondrial (A375) ↑ LDH
HEO et al., 2018, Coreia do Sul	A375SM (Humano)	DCF-DA EZ-cytox (kit do Gen Bio Co) Western blot TUNEL	Resveratrol (1 e 10 µm)	↑ Peróxido	↓ Viabilidade celular ↑ BAX (apoptose) ↓ BCL 2 ↓ NRF2
HUANG et al., 2015, Taiwan	B16-F10 (Murino)	Western Blot (CAT e SOD) Zimografia	Hinoquitilol 1–5 µmol/L	↑ Atividade CAT ↑ Atividade SOD	↓ Atividade MMP 9 ↓ Expressão MMP 9 ↓ Atividade MMP 2 ↓ Expressão MMP 2

Legenda: ↓: Diminuição/regulação negativa; ↑: Aumento/regulação positiva; CAT: Catalase; CHOP: Proteína homóloga *C/EBP*; DCFH-DA/ H2DCFDA: 2',7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína; EROs: Espécies reativas de oxigênio; LDH: lactato desidrogenase; MDA: malondialdeído; MTT: (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium]); MMP-2: Metaloproteinase de matriz -2; MMP-9: Metaloproteinase de matriz 9; NRF2: Fator nuclear 2; SOD: Superóxido Dismutase; TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; TUNEL: Terminal *deoxynucleotidyl* transferase dUTP nick.

Tabela 3. Resumo das características descritivas dos estudos incluídos (n=29) (Continuação).

Primeiro autor, ano, país	Célula de Melanoma	Metodologia	Antioxidante	EROS Intracelular	Principais desfechos
KANG et al., 2003, Coreia do Sul	B16F10 (Murino)	DCFH-DA Anexina V- Citometria de Fluxo	L-Ácido ascórbico (vitamina C) 10 mmol/L	↑ Peróxido	↑ Apoptose ↓ Potencial de membrana Mitocondrial ↑ citocromo-c
KIM et al., 2008, Coreia do Sul	B16 (Murino)	MTT DCFH-DA Griess Reagente NBT DHR 123 Fluorescência (GSH)	Picnogenol 5,10,25,50 µg/mL	↓ Peróxido ↓ NO ↓ ONOO ⁻ ↑ GSH ↓ GSSG	A alteração na viabilidade celular não foi significativa. Os autores consideraram uma ação citotóxica não significativa
KIM et al., 2009, Coreia do Sul	B16 (Murino)	MTT TBARS DCFH-DA Griess Reagente NBT DHR 123 Fluorescência (GSH)	Proantocianidinas (PAs) (Diospyros kaki) 5,10,25,50 µg/mL	↓ Peróxido ↓ TBARS ↓ NO ↓ ONOO ⁻ ↑ GSH	Viabilidade Celular (não significativo)
KIM, 2012, Coreia do Sul	B16 (Murino)	MTT TBARS DCFH-DA Griess Reagente NBT DHR 123 Fluorescência (GSH)	Hiperina e Quercetina 5, 10 e 50 µmol/L	↓ Peróxido ↓ TBARS ↓ NO ↓ ONOO ⁻ ↑ GSH	Viabilidade Celular (não significativo)

Legenda: ↓: Diminuição/regulação negativa; ↑: Aumento/regulação positiva; DCFH-DA/ H2DCFDA: 2',7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína; EROS: Espécies reativas de oxigênio; GSH: Glutathiona Redutase; GSSG: Glutathiona oxidada; MDA: malondialdeído; MTT: (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium; NBT: nitroazul de tetrazólio; NO: óxido nítrico ; ONOO⁻: Peroxinitrito TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Tabela 3. Resumo das características descritivas dos estudos incluídos (n=29) (Continuação).

Primeiro autor, ano, país	Célula de Melanoma	Metodologia	Antioxidante	EROS Intracelular	Principais desfechos
KÜÇÜKGÜL et al., 2016, Turquia	Célula de melanoma Humano	MTT Griess Reaction Reagente de Ellman (GSH)	Oleuropeina 100 µL	↑GSH ↓NO	↓ Viabilidade celular
KYRIAKOU et al., 2022, Grécia	A375 (Humano)	Alamar Blue TBARS 3, 8 and 9 kit Caspases (Abcam, UK)	Agrião (<i>Nasturtium officinale</i>) Comestível 1,3% (v/v) PEITC e Não comestível 2,5% (v/v) PEITC 10 µmol/L PEITC sintético	↑ MDA	↓ Viabilidade celular ↑ Atividade Caspase 3 ↑ Atividade Caspase 8 ↑ Atividade Caspase 9
LEE et al., 2019, Coreia do Sul	G361 (Humano) SK-MEL-2 (Humano)	MTT Anexina V-PE DCF-DA (apenas em G361) MACSQuant-Citometria de fluxo Western blot	Morin (3,5,7,2',4'-pentahidroxi-flavona) 100, 200 e 300 µmol/L	↑ Peróxido	↓ Viabilidade celular ↑ Apoptose ↑ Caspase-3 Clivada ↑ BAX ↑ PUMA ↓ Potencial de membrana mitocondrial ↓ BCL2 ↓ SP1 ↓ MCL1

Legenda: ↓: Diminuição/regulação negativa; ↑: Aumento/regulação positiva; BAX: BCL-2 associada à proteína X; BCL2: Linfoma de célula B 2; DCFH-DA/ H2DCFDA: 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína; EROS: Espécies reativas de oxigênio; GSH: Glutathione Redutase; MCL1: Regulador de apoptose família BCL-2; MDA: malondialdeído; MTT: (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium]); NBT: *nitroazul* de *tetrazólio*; NO: óxido nítrico ; PUMA: Modulador de apoptose regulado positivamente por p53 SP1: Fator de transcrição proteína 1 TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Tabela 3. Resumo das características descritivas dos estudos incluídos (n=29) (Continuação).

Primeiro autor, ano, país	Célula de Melanoma	Metodologia	Antioxidante	EROS Intracelular	Principais desfechos
LIAO et al., 2017, China	A375 (Humana)	MTT Annexina V-(FITC/PI) Citometria de Fluxo (Ciclo celular) Fluorocromo Verde lipofílico Rh123 DCFH-DA Citometria de Fluxo (GSH) Western blot	Curcumina 80 µmol/L	↑ Peróxido ↓ GSH	↓ Viabilidade Celular ↑ BAX ↓ BCL2
LO et al., 2010, Taiwan	A375.S2 (Humana)	Citometria de Fluxo (apoptose) DAPI DCFH-DA RT- PCR	Ácido Gálico 250 µmol/L	↑ Peróxido	↓ Viabilidade celular ↑ BAX ↓ BCL2 ↑ Atividade Caspase 3 ↑ Atividade Caspase 8 ↑ Atividade Caspase 9 ↑ Apoptose ↓ Potencial de membrana mitocondrial

Legenda: ↓: Diminuição/regulação negativa; ↑: Aumento/regulação positiva; BAX: BCL-2 associada a proteína X; BCL2: Linfoma de célula B 2; DAPI: 4',6'-diamino-2-fenil-indol; DCFH-DA/ H2DCFDA: 2',7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína; EROS: Espécies reativas de oxigênio; GSH: Glutathione Redutase; GSSG: Glutathione oxidada; MDA: malondialdeído; MTT: (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium]); NFKβ: Fator nuclear kappa B; RT-PCR: Reação de cadeia da Polimerase em tempo real.

Tabela 3. Resumo das características descritivas dos estudos incluídos (n=29) (Continuação).

Primeiro autor, ano, país	Célula de Melanoma	Metodologia	Antioxidante	EROS Intracelular	Principais desfechos
LOCATELLI et al., 2009, Brasil	B16F10 (Murino)	MTT DTNB Glutathione reductase DCFH-DA Cristal Violeta Análise Imunoblot	Ácido Gálico 5-100 µmol/L	↑ Peróxido ↓ GSH ↑ GSSG ↓ GSH:GSSG ↓ GamaGSH	↓ Viabilidade Celular ↓ Adesão celular ↑ Nf-KB
OTTINO; JR, 1997, África do Sul	B16-F10-BL6 (Murino)	TBARS NBT	vitamina E succinato 2,4,6,8,10 µg/mL	↑ (8;10 µg/mL) ns (2;4 µg/mL) ↑ MDA	↓ Crescimento Celular
PALKO-LABUZ et al., 2021, Polônia	Me45 (Humano) 1205-Lu (Humano) 451-Lu (Humano)	MTT DCFH-DA Citometria de Fluxo (Annexin-V)	derivados do ácido anísico ácido 4-metoxibenzóico (ANISA)-3a,5a,8a ácido verátrico (3,4-ácido dimetoxibenzóico; VA)-3b,5b,8b	↓ Peróxidos	↓ Viabilidade celular (1205-Lu e 451-Lu) ↑ Apoptose
PARK et al., 2012, Coreia do Sul	B16F0 (Murino) B16F10 (Murino)	MTT DCF-DA Ensaio “arranhão” de migração celular	Dieckol 25 µg/mL	↓ Peróxidos	Viabilidade Celular (não significativo) ↓ Invasão celular

Legenda: ↓: Diminuição/regulação negativa; ↑: Aumento/regulação positiva; DCFH-DA/ H2DCFDA: 2',7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína; DTNB: ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico; EROS: Espécies reativas de oxigênio; GSH: Glutathione Redutase; GSSG: Glutathione oxidada; MDA: malondialdeído; MTT: (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium]); NFKβ: Fator nuclear kappa B; TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Tabela 3. Resumo das características descritivas dos estudos incluídos (n=29) (Continuação).

Primeiro autor, ano, país	Célula de Melanoma	Metodologia	Antioxidante	EROS Intracelular	Principais desfechos
PRASAD et al., 2016, Estados Unidos da América	A375 (humana) Hs294t (humana) SK-Mel 28(humana) Mel1241(humana) Mel1011(humana) SK-Mel119(humana) Mel928 (humana)	DCFH-DA Western blot (NADPH) Ensaio do “arranhão” de migração	Honokiol 20 µmol/L	↓ Peróxido (Hs294t e SK-Mel 28) ↑ Atividade Nox	↓ Migração celular ↓ MMP 2 expressão ↓ MMP 9 expressão ↑ p47phox ↓ p22phox
PROVINCIALI et al., 2015, Itália	WM 266-4 (Humana)	Citometria de fluxo (EROS, annexina- V) Trypan Blue	Zinco 33,7 µmol/L e 75 µmol/L	↑ Peróxido	↓ Viabilidade celular ↑ Apoptose ↑ p53 ↑ FASL
RAUCA et al., 2019, Romênia	B16.F10 (Murino)	quantificação de MDA catalase (Aebi, 1984) Western Blot	EEAG (<i>A. genevensis</i>) IC40=650 µg/MI ou IC20=260 µg/mL, EEAC (<i>A. chamaepitys</i>) IC80=650 µg/mL ou IC50=406,7 µg/mL, and EEAL (<i>A. laxmannii</i>) IC80=325 µg/mL ou IC50=236,8 µg/mL	↑ MDA (IC40 e IC80) ↓ MDA (EEAG IC20) Catalase (tendência a melhora - EEAG IC20)	↓ Migração celular ↓ Nf-KB ↓ p65

Legenda: ↓: Diminuição/regulação negativa; ↑: Aumento/regulação positiva; DCFH-DA/ H2DCFDA: 2',7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína; EROS: Espécies reativas de oxigênio FASL: Ligante Fas; MDA:malondialdeído; MMP-2: Metaloproteinase de matriz -2; MMP-9: Metaloproteinase de matriz 9; MTT: (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium]); NBT: nitroazul de tetrazólio; TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick.

Tabela 3. Resumo das características descritivas dos estudos incluídos (n=29) (Continuação).

Primeiro autor, ano, país	Célula de Melanoma	Metodologia	Antioxidante	EROS Intracelular	Principais desfechos
RUSSO et al., 2008, Itália	M14 (MDA-MB-435)	MTT Ensaio COMETA/TUNEL DCFH-DA Caspase (Kit SIGMA)	<i>Sphaerophorin e Pannarin Sphaerophorus globosus</i> 12,5–50 µmol/L	↑ Peróxido	↓ Viabilidade ↑ LDH (50 µM) ↑ Caspase-3 (12,5 and 25 µM) ↓ Caspase-3 (50 µmol/L) ↑ Apoptose
SATOOKA et al., 2012, Estados Unidos da América	B16-F10 (Murino)	MTT Trypan Blue DCFH-DA	Timol 75-1200 µmol/L	↑ Peróxido	↓ Viabilidade celular
SCHOMBERG et al., 2020, Estados Unidos da América	A375 (Humano) SK-Mel2 (Humano) SK-Mel28 (Humano) WM3211 (Humano)	MTT Western blotting H2DCFDA	Luteolina 5-25 µmol/L	↑ Peróxido ↑ Catalase ↓ SOD1 (WM3211) ↑ SOD 2	↓ Viabilidade celular ↑ Morte celular SOD1 não significativa em A375
SHUXI et al, 2012, Estados Unidos da América	A375 (Humano) G361 (Humano) LOX-IMVI (Humano)	DCFH-DA RT-PCR Análise Imunoblote Citometria de Fluxo (análise da morte celular) GSH-Glo kit (Promega)	D- Penicilamina-cisteína 10 mmol/L	↑ Peróxido ↓ Expressão Catalase ↓ GSH	↓ Viabilidade celular ↑ p53 ↓ BCL2 ↑ Caspase-3 clivada ↑ Caspase-3 ↓ Potencial de membrana mitocondrial ↓ PUMAα e PUMAβ ↑ Noxa

Legenda: ↓: Diminuição/regulação negativa; ↑: Aumento/regulação positiva; BCL2: Linfoma de célula B 2; DCFH-DA/ H2DCFDA: 2',7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína; EROS: Espécies reativas de oxigênio; GSH: Glutathione Redutase; LDH: Lactato desidrogenase MTT: (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium; NBT: nitroazul de tetrazólio; NOXA: Proteína 1 induzida por forbol-12-miristato-13-acetato; PUMA: Modulador de apoptose regulado positivamente por p53; TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Tabela 3. Resumo das características descritivas dos estudos incluídos (n=29) (Continuação).

Primeiro autor, ano, país	Célula de Melanoma	Metodologia	Antioxidante	EROS Intracelular	Principais desfechos
ZUGIC et al., 2016; Sérvia.	B16 (Murino)	Fosfatase ácida Marcado com iodeto de propídio (DNA) Di-idrorodamina 123	<i>Usnea barbata</i> (L.) 31,21 µg/mL	↑ Peróxido	↓ Viabilidade celular ↑ Apoptose

Legenda: ↓: Diminuição/regulação negativa; ↑: Aumento/regulação positiva; EROS: Espécies reativas de oxigênio.

4.3 Características dos tratamentos antioxidantes dos estudos incluídos na revisão

Foram observados, nos 29 estudos incluídos nesta revisão, 3 diferentes tipos de tratamento de natureza antioxidante. Vinte e um estudos (ASENSI et al., 2002; BALDIVIA et al., 2018; BIMBIRAITE et al., 2021; DIACONEASA et al., 2017; HUANG et al., 2015; HEO et al., 2018; KIM et al., 2008; KIM et al., 2009; KIM, 2012; KÜÇÜKGÜL et al., 2016; KYRIAKOU et al., 2022; LEE et al., 2019; LIAO et al., 2017; LO et al., 2010; LOCATELLI et al., 2009; PALKO-LABUZ et al., 2021; PARK et al., 2012; PRASAD et al., 2016; RAUCA et al., 2019; SATOOKA et al., 2012; SCHOMBERG et al., 2020) utilizaram tratamentos extraídos de plantas, 5 estudos (BANDURA et al., 2005; KANG et al., 2003; OTTINO; JR, 1997; PROVINCIALI et al., 2015; SHUXI et al., 2012) estudaram vitaminas (E e C) e minerais, e, além disso, 3 estudos usaram tratamentos a base de compostos extraídos de fungos (AL SAQR et al., 2020; RUSSO et al., 2008; ZUGIC et al., 2016.). Um resumo das informações está presente na Figura 3.

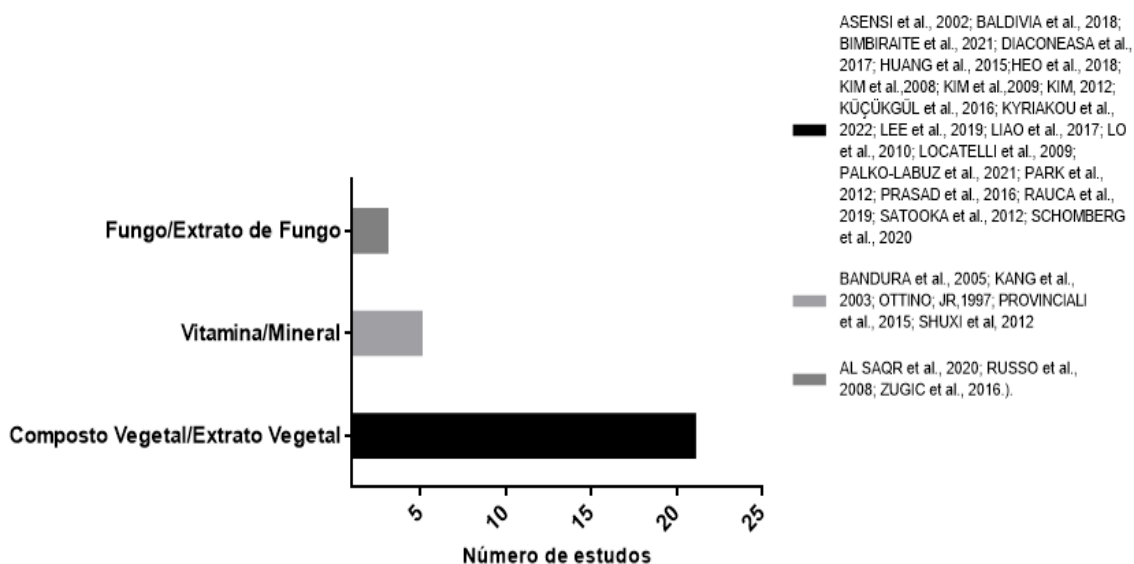


Figura 3. Características dos tratamentos antioxidantes dos estudos incluídos

4.4 Modulação do estresse oxidativo (EO) em células de melanoma tratadas com antioxidantes

A Figura 4 resume a modulação do estresse oxidativo intracelular nos 29 estudos incluídos na revisão; 20 estudos (AL SAQR et al., 2020; BALDIVIA et al., 2018; BANDURA et al., 2005; BIMBIRAITE et al., 2021; DIACONEASA et al., 2017; HEO et al., 2018; KANG et al., 2003; KYRIAKOU et al., 2022; LEE et al., 2019; LIAO et al., 2017; LO et al., 2010; LOCATELLI et al., 2009; OTTINO; JR, 1997; PROVINCIALI et al., 2015; RAUCA et al., 2019; RUSSO et al., 2008; SATOOKA et al., 2012; SCHOMBERG et al., 2020; SHUXI et al., 2012; ZUGIC et al., 2016) mostraram um aumento de EROs intracelular após o tratamento com antioxidantes, e 9 estudos mostraram uma queda de EROs ou melhora na defesa antioxidante das células (ASENSI et al., 2002; HUANG et al., 2015; KIM et al., 2008; KIM et al., 2009; KIM, 2012; KÜÇÜKGÜL et al., 2016; PALKO-LABUZ et al., 2021; PARK et al., 2012; PRASAD et al., 2016).

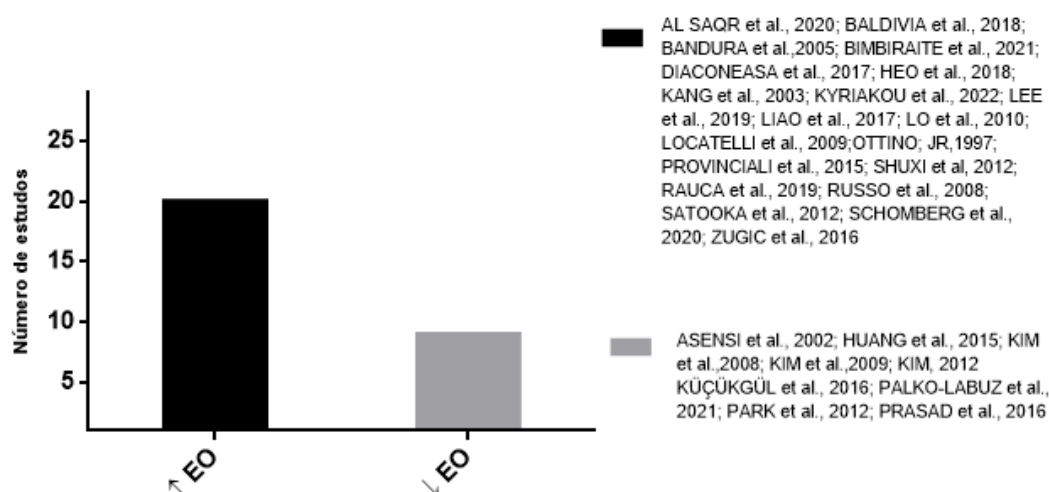


Figura 4. Modulação do estresse oxidativo (EO) em células de melanoma tratadas com antioxidantes.

4.5 Modulação do estresse oxidativo em células de melanoma e seu efeito na viabilidade celular

Vinte e um artigos incluídos na revisão avaliaram a modulação do estresse oxidativo e seu efeito na viabilidade das células, e, dentre estes, 15 estudos (AL SAQR et al., 2020; BALDIVIA et al., 2018; BANDURA et al., 2005; DIACONEASA et al., 2017; KYRIAKOU et al., 2022; LEE et al., 2019; LIAO et al., 2017; LO et al., 2010;

LOCATELLI et al., 2009; PROVINCIALI et al., 2015; RUSSO et al., 2008; SATOOKA et al., 2012; SCHOMBERG et al., 2020; SHUXI et al., 2012; ZUGIC et al., 2016) mostraram que o aumento de EROs intracelular implicou em queda na viabilidade das células.

Nenhum artigo mostrou aumento do estresse oxidativo sem alteração na viabilidade das células, 2 estudos (KÜÇÜKGÜL et al., 2016; PALKO-LABUZ et al., 2021) mostraram queda no estresse oxidativo intracelular e queda da viabilidade celular, enquanto 4 estudos (PARK et al., 2012; KIM et al., 2008; KIM et al., 2009; KIM, 2012) mostraram diminuição do estresse oxidativo sem alteração significativa na viabilidade celular (Figura 5)

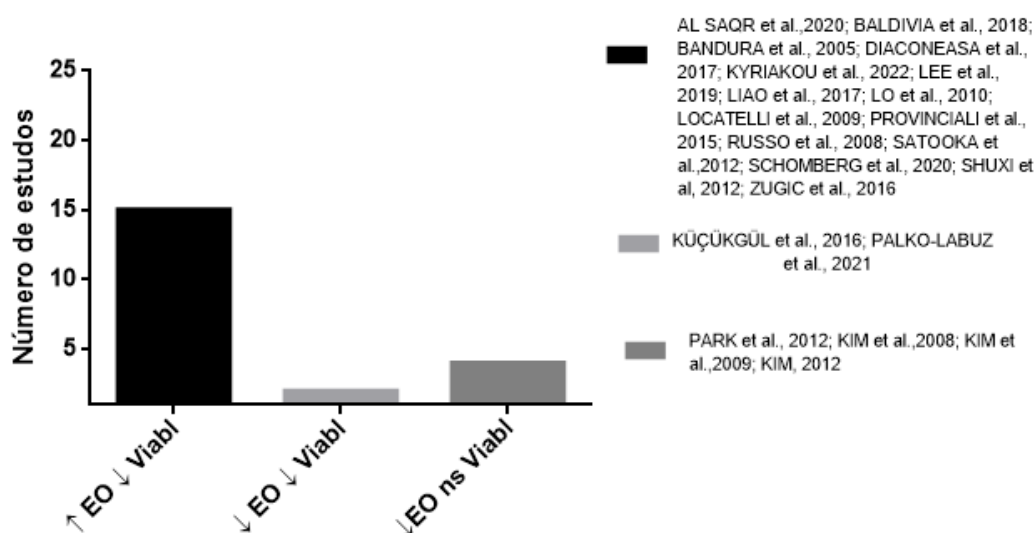


Figura 5. Modulação do estresse oxidativo (EO) em células de melanoma pelo tratamento com antioxidantes e seu efeito na viabilidade celular (Viabl).

4.6 Modulação do estresse oxidativo em células de melanoma e seus efeitos na apoptose

Dentre os 29 estudos, 13 avaliaram apoptose ou alguma via apoptótica nas células. Destes, 12 estudos (AL SAQR et al., 2020; BALDIVIA et al., 2018; HEO et al., 2018; KANG et al., 2003; KYRIAKOU et al., 2022; LEE et al., 2019; LIAO et al., 2017; LO et al., 2010; PROVINCIALI et al., 2015; RUSSO et al., 2008; SHUXI et al., 2012; ZUGIC et al., 2016) mostraram aumento do estresse oxidativo em conjunto com

um resultado de aumento de células em apoptose ou com expressão aumentada de proteínas pró-apoptóticas, e apenas 1 estudo (PALKO-LABUZ et al., 2021) mostrou resultado de queda de EROs e aumento da apoptose.

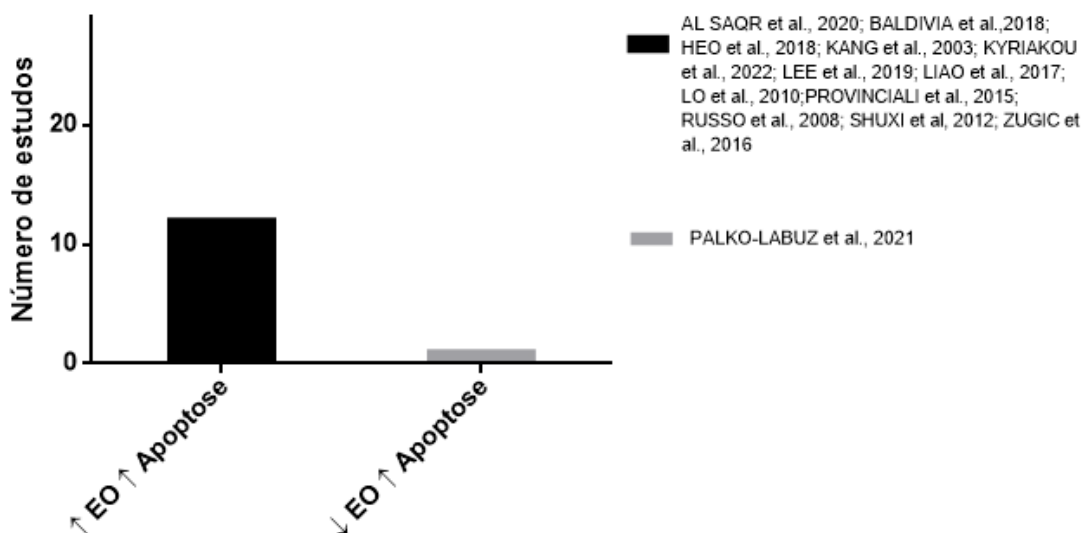


Figura 6. Modulação do estresse oxidativo (EO) em células de melanoma pelo tratamento com antioxidantes e seus efeitos na apoptose.

4.7 Mutação gênica em células humanas dos estudos incluídos na revisão.

Com base em informações fornecidas pelos autores dos estudos e no trabalho de Vincent e Postovit (VINCENT; POSTOVIT, 2017), foi feito um levantamento das mutações características das células usadas nos ensaios, com o objetivo de observar se havia alguma correlação entre essas mutações e a resposta de EROs intracelular após o tratamento com antioxidante. O resumo destas informações está presente na Tabela_4. Nesta revisão, 11 estudos (BANDURA et al., 2005; BIMBIRAITE et al., 2021; DIACONEASA et al., 2017; KYRIAKOU et al., 2022; HEO et al., 2018; LEE et al., 2019; LIAO et al., 2017; LO et al., 2010; PRASAD et al., 2016; RUSSO et al., 2008; SCHOMBERG

et al., 2020; SHUXI et al, 2012) avaliaram células de melanoma humana com mutação em BRAF ou NRAS, contudo, nos artigos incluídos nesta revisão sistemática não foi observada uma diferença de resposta a tratamentos antioxidantes entre células mutada em BRAF ou NRAS em relação a EROs intracelular.

Tabela 2. Resumo das informações sobre mutações gênicas presente nas células de melanoma dos trabalhos incluídos.

Célula	Gene Mutado	Sequência	Referência
A-375	BRAF	V600E	DIACONEASA et al., 2017; KYRIAKOU et al., 2022; HEO et al., 2018; LIAO et al., 2017; LO et al., 2010; PRASAD et al., 2016; SHUXI et al, 2012; SCHOMBERG et al., 2020.
G-361	BRAF	V600E	LEE et al., 2019; SHUXI et al, 2012
Hs294t	BRAF	V600E	BANDURA et al., 2005; PRASAD et al., 2016
LOX-IMVI	BRAF	V600E	SHUXI et al, 2012
MDA-MB-435(M14)	BRAF	V600E	RUSSO et al., 2008
Mel 928	BRAF	V600E	PRASAD et al., 2016
SK-MEL-2	NRAS	Q61R	LEE et al., 2019; SCHOMBERG et al., 2020
SK-MEL-28	BRAF	V600E	BIMBIRAITE-SURVILIENE et al., 2021; PRASAD et al., 2016; SCHOMBERG et al., 2020;
SK-MEL-119	NRAS	***	PRASAD et al., 2016

Legenda: *** Dados não fornecidos pelo autor.

4.8 Tratamento com antioxidante em células de melanoma versus células não tumorais

Dos artigos incluídos nesta revisão sistemática, apenas quatro estudos (BANDURA et al., 2005; BIMBIRAITE et al., 2021; DIACONEASA et al., 2017; OTTINO; JR,1997) mostraram resultados na modulação de EROs intracelular em células tumorais e não tumorais (Tabela 5).

Tabela 3. Comparação na modulação de EROS intracelular entre células tumorais e não tumorais após tratamento com antioxidante.

Referência	Comparação	Desfecho
BANDURA et al., 2005	Hs294t vs melanócitos	Os compostos selenito e selenato de sódio causaram aumento significativo de MDA nos dois tipos de células. No entanto, o aumento causado pelo selenito foi sete vezes maior nos melanócitos quando comparado com as células Hs294t (melanoma).
BIMBIRAITE et al., 2021	SK-MEL-28 vs melanócitos	Nenhum dos extratos de <i>S. hortensis</i> L. até a concentração de 50 µg/mL aumentou MDA, tanto em melanócitos quanto em células de melanoma (SK-MEL-28). Foi observado aumento de MDA em ambas as células, causado pelo tratamento com extrato F3 na concentração de 100 µg/mL.
DIACONEASA et al., 2017	A-375 e B16-F10 (Murino) vs Hs27 (fibroblastos humanos)	O tratamento com antocianinas (C-ARE e RG-ARE) causou um aumento significativo de MDA nas células de melanoma (humano e murino) e uma queda significativa de MDA em fibroblastos, atuando como pró-oxidativo em células de melanoma e antioxidante nos fibroblastos.
OTTINO; JR, 1997	BL6-F10 (Murino) vs LLCMK (células de rim de macaco, não malignas)	Foi observado um aumento significativo de MDA nas células de melanoma murino e efeito não significativo nas células não tumorais de rim de macaco tratadas com vitamina E na concentração de 10 mg/mL.

Legenda: MDA: Molondealdeído; ARE: Extrato rico em antocianinas

4.9. Risco de viés

A Tabela 6 mostra a avaliação do risco de viés dos artigos usados na revisão.

Dos 29 estudos, 4 apresentaram médio risco de viés e 25 estudos apresentaram baixo

risco de viés. A maior perda de informação ocorreu na não descrição do número da passagem das células usadas nos ensaios, apenas 1 trabalho descreveu em qual passagem celular a célula estava durante a realização dos experimentos, e os trabalhos não trouxeram informação sobre uso de célula imortalizada.

Tabela 4. Risco de viés de estudos individuais avaliados por critérios adaptados de MARQUES et al., 2016 (continua).

Autores	Especificação célula de melanoma	Meio de cultura celular	Passagem celular	Condições de cultura celular	Nº de células plaqueadas por poço	Nº de repetições de experimentos	Descrição da metologia	Risco de viés
AL SAQR et al.,	S	S	N	S	S	S	S	Baixo
ASENSI et al.	S	S	N	S	S	S	S	Baixo
BALDIVIA et al.	S	S	N	S	S	S	S	Baixo
BANDURA et al.	S	S	N	S	S	S	S	Baixo
BIMBIRAITÊ et al.	S	S	N	S	S	S	S	Baixo
DIACONEASA et al.	S	S	N	S	S	S	S	Baixo
HEO et al.	S	S	N	S	S	S	S	Baixo
HUANG et al.	S	S	N	S	S	S	S	Baixo
KANG et al	S	S	N	S	S	S	S	Baixo
KIM et al.*	S	S	N	S	S	S	S	Baixo
KIM et al.**	S	S	N	S	S	S	S	Baixo
KIM ***	S	S	N	S	S	S	S	Baixo

Legenda: S= Sim; N= Não; *KIM et al., 2008; **KIM et al., 2009; ***KIM, 2012.

Tabela 6. Risco de viés de estudos individuais avaliados por critérios adaptados de MARQUES et al., 2016 (continuação).

Autores	Especificação célula de melanoma	Meio de cultura celular	Passagem celular	Condições de cultura celular	Nº de células plaqueadas por poço	Nº de repetições de experimentos	Descrição da metologia	Risco de viés
KÜÇÜKGÜL et al.	N	S	N	S	S	N	S	Médio
LEE et al.	S	S	N	S	S	S	S	Baixo
LIAO et al.	S	S	N	S	S	S	S	Baixo
LO et al.,	S	S	N	S	S	S	S	Baixo
LOCATELLI et al	S	S	N	S	S	S	S	Baixo
OTTINO; JR,	S	S	N	S	S	S	S	Baixo
PALKO-LABUZ et al.	S	S	N	S	S	S	S	Baixo
PARK et al.	S	S	S	S	S	S	S	Baixo

Legenda: S= Sim; N= Não

Tabela 6. Risco de viés de estudos individuais avaliados por critérios adaptados de MARQUES et al., 2016 (continuação).

Autores	Especificação célula de melanoma	Meio de cultura celular	Passagem celular	Condições de cultura celular	Nº de células plaqueadas por poço	Nº de repetições de experimentos	Descrição da metodologia	Risco de viés
PRASAD et al.	S	S	N	S	S	N	S	Médio
PROVINCIALI et al.	S	S	N	S	N	S	S	Médio
RAUCA et al.	S	S	N	S	S	S	S	Baixo
RUSO et al.	S	S	N	S	S	S	S	Baixo
SATOOKA et al.,	S	S	N	S	S	S	S	Baixo
SCHOMBERG et al.	S	S	N	S	S	S	S	Baixo
SHUXI et al	S	S	N	S	S	S	S	Baixo
ZUGIC et al.	S	S	N	S	N	S	S	Médio

Legenda: S= Sim; N= Não

5. Discussão

Os trabalhos incluídos nesta revisão avaliaram, em sua maioria, produtos naturais, a maior parte extraída de plantas. Esse achado reforça que produtos de origem natural estão em constante ascensão nas pesquisas para novos tratamentos oncológicos. Os produtos naturais ricos em compostos fenólicos, dentre eles flavonoides, flavonóis, flavanóis, antocianinas, isoflavonoides, flavanonas e flavonas, além dos ácidos fenólicos, atuam como agentes redutores, doadores de hidrogênio e sequestradores de espécies reativas de oxigênio (CAROCHO; FERREIRA, 2013), o que explica o uso destes produtos como agentes antioxidantes nos estudos.

Mishra e colaboradores, escreveram, em sua revisão da literatura, que, entre os anos de 2005 e 2010, um total de 19 medicamentos à base de produtos naturais foram aprovados para uso no mundo em diversas áreas, incluindo a oncologia (MISHRA; TIWARI, 2011). Patridge et al., 2015, escreveram que, em 2013, a FDA aprovou 547 produtos naturais, incluindo novas entidades moleculares (*new molecular entities*), produtos naturais bioquímicos (*biochemical natural products*), além de produtos naturais derivados de animais não mamíferos (*non-mammalian natural products*).

Não somente plantas, mas também estudos para registro de compostos extraídos de fungos vêm crescendo. Em 2015, os fungos representavam a origem de 12% de novos produtos registrados e de 22% de produtos naturais de não-mamíferos (PATRIDGE et al., 2015).

Produtos naturais vêm, ao longo dos anos, mostrando seu potencial antitumoral; vinblastina, vincristina, taxol, etoposide são exemplos deste potencial. Mais de 600 compostos naturais já foram relatados como tendo algum efeito anticâncer (SINGH et al., 2016).

Esta revisão sistemática avaliou o efeito do tratamento com antioxidantes na modulação do estresse oxidativo em células de melanoma, e, como desfecho secundário, na viabilidade e apoptose celular. O envolvimento do estresse oxidativo nas características do melanoma vem sendo alvo de estudos nos últimos anos. Cannavó e colaboradores mostraram, em uma revisão sistemática, que o estresse oxidativo está envolvido desde a iniciação do melanoma até a sua metástase (CANNVÒ et al., 2019).

Neste trabalho foram incluídos 29 estudos, 20 estudos apresentaram pelo menos um resultado em que o antioxidante atuava como pró-oxidante na célula de melanoma, mas este efeito ainda não está totalmente esclarecido. Hawk e colaboradores, 2016, reportaram em sua revisão que alguns antioxidantes podem apresentar formas oxidadas que podem ser mais absorvidas por células de câncer, e que este efeito pode ser mais observado com altas doses de antioxidantes. Os autores citaram como exemplo um estudo com vitamina C e câncer colo retal, em que altas doses de vitamina C aumentava EROS intracelular.

Nos trabalhos avaliados nesta revisão também foram observados estudos com diferentes doses do mesmo antioxidante gerando diferentes efeitos em EROS intracelular. OTTINO; JR, 1997, mostrou que, com doses menores de vitamina E succinato (1 a 3 µg/mL), não foi observado efeito no aumento de EROS intracelular, incluindo peróxidos, em células B16F10. Contudo, em doses mais altas (5 a 10 µg/ml) do mesmo antioxidante foi observado aumento significativo de EROS intracelular e peroxidação lipídica nas células de melanoma. O mesmo foi observado por RAUCA et al., 2019, que reportaram que o tratamento de células B16F10 com a concentração mais baixa dos extratos de *Ajuda genevensis* e *Ajuda laxmannii* (IC20) promoveu uma tendência de queda na peroxidação lipídica e leve melhora na atividade da enzima catalase nas células, ao contrário dos tratamentos das células com as maiores

concentrações dos mesmos extratos (IC40 e IC80), que causaram aumento da produção de MDA nas células de melanoma de maneira significativa.

Uma outra linha de investigação sobre o efeito de antioxidantes em células tumorais sugere que estas células apresentam um metabolismo redox alterado (CANNAVÒ et al., 2019). Alguns estudos incluídos nesta revisão compararam o efeito de um mesmo tratamento antioxidante com respostas diferentes em células tumorais (neste caso células de melanoma) e células não tumorais, como mostrado na Tabela 6. BANDURA et al., 2005, observaram o efeito de dois compostos de selênio (selenito e selenato de sódio). Os compostos de selênio e zinco são os mais relevantes em promoção do efeito antioxidante (CAROCHO; FERREIRA, 2013), pois são partes indispensáveis em enzimas antioxidantes, como catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, além das metaloproteínas. No caso do estudo de Bandura e colaboradores (2005), os compostos apresentaram toxicidade tanto em células de melanoma (Hs294t) quanto em células não tumorais (melanócitos e queratinócitos), com algumas respostas diferentes. O composto com ação antioxidante mais potente (selenito) causou um efeito estressor mais efetivo, com o aumento de MDA, em melanócitos quando comparado com a célula de melanoma, e os autores sugeriram que esse efeito pode ser um reflexo da resistência do sistema redox da célula de melanoma. Os autores também atribuíram o resultado à ação pró-oxidante do selenito, pelo fato de que este reage com tióis e causa estresse oxidativo massivo, o que corrobora com a informação já citada de que, dependendo do metabolismo, do pH do ambiente e da concentração usada, antioxidantes podem atuar como pró-oxidativos.

Outro estudo que avaliou o efeito antioxidante observando célula de melanoma *versus* melanócitos foi o de BIMBIRAITE-SURVILIENE et al., 2021. Ambas as células mostraram aumento de EROS intracelular, contudo os autores observaram que um dos

extratos de *Satureja hortensis* L usado como tratamento (F2, rico em substâncias antioxidantes como a rutina) mostrou uma maior toxicidade em células de melanoma e menor nos melanócitos. Os autores relataram que a rutina tem a capacidade de aumentar a peroxidação lipídica em células tumorais.

Em outro estudo, DIACONEASA et al., 2017, compararam células de melanoma humano (A-375), melanoma murino (B16F10) e fibroblasto humano tratados com duas antocianinas [de Arônia (C-ARE) e de Uva vermelha (RG-ARE)]. Foi observado que apenas as células tumorais sofreram os danos causados pelo aumento do estresse oxidativo intracelular, nas células de fibroblastos dérmicos normais as antocianinas mostraram efeito antioxidante. E por fim, OTTINO; JR, 1997, trataram B16F10 e LLCMK (células não malignas de rim de macaco) com vitamina E na forma de succinato, e observaram que a maior dose de tratamento (5 a 10 µg/mL) aumentava a peroxidação lipídica em células de melanoma, efeito que não foi observado em células não malignas.

Ainda sobre a modulação de EROs intracelular, é interessante pontuar alguns achados nos estudos que apresentaram uma queda do estresse oxidativo em células de melanoma. ASENSI et al., 2002, trataram células B16F10 com resveratrol e observaram uma queda nos peróxidos intracelulares. Os autores também relataram que, em um experimento de avaliação de viabilidade celular, 60% das células tumorais morreram quando tratadas com resveratrol, contudo este resultado não foi mostrado no artigo e, para este experimento, os autores não informaram quais doses de resveratrol foram utilizadas para o tratamento das células. Os autores sugeriram que a queda no estresse oxidativo intracelular causou parada em seu crescimento, pois o estresse aumentado é um sinalizador para crescimento de células tumorais. No mesmo estudo, foi demonstrado que o resveratrol promoveu uma menor adesão de células de melanoma a

células endoteliais (HSE), o que poderia afetar o potencial metastático da célula de melanoma. Contudo, um estudo *in vivo* mostrou que a dose necessária para causar este efeito não é alcançada pela biodisponibilidade do resveratrol. Outro estudo também incluído nesta revisão, de HEO e colaboradores (2018), mostrou que no tratamento de outro tipo de célula de melanoma (A-375SM) com resveratrol, quanto mais alta a dose do resveratrol mais tóxico ele se apresentou para a célula de melanoma humano, com aumento significativo do estresse oxidativo intracelular, estresse esse que ativou o fator pró-apoptótico BAX e causou queda do fator anti-apoptótico Bcl2. Além disso, segundo os autores, o tratamento com resveratrol acarretou em queda na expressão de Nrf2, causando uma maior sensibilidade ao estresse oxidativo nas células de melanoma. No caso desses dois estudos (ASENSI et al., 2002 e HEO et al., 2018), o antioxidante apresentou natureza pró-oxidativa em um tipo de célula (A-375) e antioxidante em outro tipo de célula (B16F10), e mostrou propriedades anticâncer em ambos.

Huang e colaboradores, 2015, trataram células B16F10 com antioxidante hinoquitinol, e as doses de 2 μ M e 5 μ M regularam negativamente a expressão de metaloproteinases 2 e 9. Os autores atribuíram esse efeito à melhora na defesa antioxidante da célula, pois a mesma dose do antioxidante atuou aumentando a atividade da enzima catalase.

Três estudos incluídos nesta revisão avaliaram efeito dos antioxidantes na melanogênese e na concentração de EROs intracelular em célula de melanoma. KIM et al., 2008, KIM et al., 2009, e KIM, 2012 avaliaram o efeito de 3 antioxidantes naturais (hiperina, quercitina e picnogenol) em células B16F10, e observaram que os compostos atuaram suprimindo a melanogênese e melhorando a defesa antioxidante das células de melanoma. Esse achado pode sugerir que agentes antimelanogênicos podem não ser bons agentes anticâncer para o melanoma.

O estudo de PALKO-LABUZ e colaboradores, 2021, mostrou que o composto fenólico ANISA e seus conjugados promoveram uma diminuição no estresse oxidativo intracelular em células de melanoma (Me45, 1205-Lu, 451-Lu). Contudo, foi observado que o tratamento com antioxidante promoveu uma parada no ciclo celular na fase G1 e G2M nas três células de melanoma, e o mesmo não aconteceu com fibroblastos normais, sugerindo que as células de melanoma sofreram um dano no DNA após o tratamento com ANISA e seus conjugados (3 a, 5 a, 8 a, 1bVa, 3b,5b,8b) . Também foi observado um aumento de células de melanoma em apoptose após o tratamento com ANISA e seus conjugados, e em fibroblasto não foi observado o mesmo efeito. A linhagem de células mais sensível ao tratamento foi a 1205-Lu e a menos sensível foi a Me45. Portanto, neste caso o antioxidante atuou como um antioxidante de fato e como agente anticâncer, sem causar um aumento de EROs intracelular e sem causar efeitos citotóxicos em células não tumorais.

Ainda na análise das modificações celulares e a resposta aos antioxidantes, foi feito um levantamento sobre as mutações gênicas presentes nas células humanas usadas nos estudos incluídos nesta revisão. Nos estudos *in vitro*, principalmente em estudos sobre câncer, é importante que as células representem bem o ambiente real de um tumor para que os mecanismos moleculares sejam bem entendidos. Pensando nisso, de Vincent e Postovit, 2017, fizeram uma comparação entre as linhagens de células de melanoma mais usadas nas pesquisas atualmente e células de tumores de pacientes. No geral, as linhagens de células de melanoma se mostraram transcritionalmente representativas de tumores. Tomando como base as informações do trabalho de Vincent e Postovit, 2017, foi avaliado quais as linhagens de células de melanoma usadas nos artigos incluídos nesta revisão apresentavam a mutação em BRAF, a mais comum em câncer melanoma, e se nos trabalhos que usaram estas linhagens de células de

melanoma com mutação em BRAF havia alguma resposta diferente aos tratamentos com antioxidantes.

As informações sobre as mutações das linhagens de células de melanoma usadas nos trabalhos incluídos nesta revisão estão presentes na Tabela 4. A maioria das células humanas utilizadas nos artigos são BRAF mutadas, contudo a mutação em BRAF não foi algo que causou uma resposta específica na modulação do estresse oxidativo. As células BRAF mutadas foram, em sua maioria, sensíveis ao aumento do estresse oxidativo causado pelos antioxidantes.

No entanto, algumas diferenças foram observadas em relação a outros aspectos pelos autores. Lee et al., 2019, mostraram uma diferença na viabilidade de células tratada com antioxidante (flavonoide morina). A célula G361 (BRAF MUT) apresentou uma porcentagem de queda maior na viabilidade (18,7%) quando comparada com a célula SK-MEL-2 (BRAF WT), que apresentou uma queda de 16,1% na viabilidade após o tratamento com morina. No trabalho de Prasad et al., 2016, as células mutadas em BRAF apresentaram 20-55% (A375), 20-70% (Hs294t) e 40-80% (SK-MEL-28) de queda na viabilidade e a célula BRAF WT SK-MEL-119 apresentou 40-70% de queda na viabilidade após o tratamento com o antioxidante. Schomberg et al., 2020, não observaram diferença na inibição do crescimento celular em células BRAF mutada ou BRAF WT. O nível de proteína SOD1 foi aumentado em WM3211 (BRAF WT) e não houve diferença significativa da concentração da mesma enzima nas células A375 (BRAF MUT). O tratamento com a luteolina regulou negativamente BRAF nas células SK-MEL-2 (BRAF WT) e KRAS foi regulado negativamente na célula A375 e na célula SK-MEL-28, ambas KRAS WT.

Assim mais estudos com antioxidantes comparando os efeitos em linhagens de células com diferentes mutações são necessários para que o entendimento de seus efeitos sejam melhor elucidados.

Por fim, uma limitação deste trabalho foi a avaliação do risco de viés dos estudos, por ser uma revisão de estudos *in vitro* para os quais ainda não existe uma ferramenta padrão estabelecida. Foi utilizado um método adaptado focando nas principais etapas de cultivos de células. De acordo com a avaliação dos critérios estabelecidos, 25 estudos apresentaram baixo risco de viés e 4 estudos médio risco de viés. Para estes estudos que apresentaram médio risco de viés, as maiores falhas de informação de metodologia foram no número de repetição dos experimentos e na quantidade de células plaqueadas por poço. No geral, a informação que menos foi encontrada na metodologia dos estudos foi a passagem celular das células usadas nos ensaios. É importante ressaltar que mesmo com a maioria dos artigos apresentando baixo risco de viés, a falta dessas informações pode impactar na qualidade dos estudos.

6. Conclusão

Os achados desta revisão sistemática sugerem que antioxidantes de origem natural podem atuar como pró-oxidantes em células de melanoma, causando queda na viabilidade e ativando apoptose nas células, sendo possíveis candidatos a agentes anticâncer. Contudo, são necessários mais estudos sobre a biodisponibilidade destes antioxidantes *in vivo*.

7. Referências Bibliográficas

AHMED, B.; QADIR, I.; GHAFOR, S. Malignant Melanoma : Skin Cancer — **Diagnosis , Prevention , and Treatment**. v. 30, n. 4, p. 291–297, 2020.

AL SAQR, A. et al. Elucidating the anti-melanoma effect and mechanisms of Hispolon. **Life Sciences**, v. 256, n. March, p. 117702, 2020.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2022**. [s.l: s.n.].

ARSLANBAEVA, L. R.; SANTORO, M. M. Adaptive redox homeostasis in cutaneous melanoma. **Redox Biology**, v. 37, n. July, p. 101753, 2020.

ASENSI, M. et al. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 3, p. 387–398, 2002.

BALDIVIA, D. DA S. et al. Evaluation of in vitro antioxidant and anticancer properties of the aqueous extract from the stem bark of stryphnodendron adstringens. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, p. 1–23, 2018.

BANDURA, L. et al. Differential effects of selenite and selenate on human melanocytes, keratinocytes, and melanoma cells. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 83, n. 2, p. 196–211, 2005.

BIMBIRAITÈ-SURVILIENÈ, K. et al. Evaluation of chemical composition, radical scavenging and antitumor activities of satureja hortensis L. Herb extracts. **Antioxidants**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2021.

CANNAVÒ, S. P. et al. **The role of oxidative stress in the biology of melanoma: A systematic review**. **Pathology Research and Practice** Elsevier GmbH, , 1 jan. 2019.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, n. 1, p. 15–25, 2013.

CLARK, W. H.; ELDER, D. E.; VAN HORN, M. The biologic forms of malignant melanoma. **Human Pathology**, v. 17, n. 5, p. 443–450, 1986.

D'ANDREA, G. M. Use of Antioxidants During Chemotherapy and Radiotherapy Should Be Avoided. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 55, n. 5, p. 319–321, 2005.

DAVIS, L. E.; SHALIN, S. C.; TACKETT, A. J. Current state of melanoma diagnosis and treatment. **Cancer Biology and Therapy**, v. 20, n. 11, p. 1366–1379, 2019.

DE LUCA CANTO, G. **Revisões sistemáticas da literatura: guia prático**. [s.l: s.n.].

DIACONEASA, Z. et al. Melanoma Inhibition by Anthocyanins Is Associated with the Reduction of Oxidative Stress Biomarkers and Changes in Mitochondrial Membrane Potential. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 72, n. 4, p. 404–410, 2017.

DOUKI, T. Oxidative Stress and Genotoxicity in Melanoma Induction: Impact on Repair Rather Than Formation of DNA Damage? **Photochemistry and Photobiology**, v. 96, n. 5, p. 962–972, 2020.

GERSHENWALD, J. E. et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 6, p. 472–492, 2017.

GIAVINA-BIANCHI, M. H.; GIAVINA-BIANCHI JUNIOR, P. F.; FESTA NETO, C. Melanoma: Tumor microenvironment and new treatments. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 2, p. 156–166, 2017.

GUARNERI, C. et al. NF- κ B inhibition is associated with OPN/MMP-9 downregulation in cutaneous melanoma. **Oncology Reports**, v. 37, n. 2, p. 737–746, 2017.

HAWK, M. A.; MCCALLISTER, C.; SCHAFER, Z. T. Antioxidant activity during tumor progression: A necessity for the survival of cancer cells? **Cancers**, v. 8, n. 10, 2016.

HEO, J. et al. Resveratrol induced reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis, and cell cycle arrest in the A375SM malignant melanoma cell line. **International journal of molecular medicine**, v. 42, n. 3, p. 1427–1435, 2018.

HUANG, C. H. et al. Hinokitiol exerts anticancer activity through downregulation of MMPs 9/2 and enhancement of catalase and SOD enzymes: In vivo augmentation of lung histoarchitecture. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 17720–17734, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro : INCA, 2019.** [s.l: s.n.].

ITO, S.; WAKAMATSU, K. Chemistry of mixed melanogenesis - Pivotal roles of dopaquinone. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, n. 3, p. 582–592, 2008.

KANG, J. S. et al. L-Ascorbic acid (vitamin C) induces the apoptosis of B16 murine melanoma cells via a caspase-8-independent pathway. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 52, n. 11, p. 693–698, 2003.

KIM, Y. J. Hyperin and quercetin modulate oxidative stress-induced melanogenesis. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 11, p. 2023–2027, 2012.

KIM, Y. J.; KANG, K. S.; YOKOZAWA, T. The anti-melanogenic effect of pycnogenol by its anti-oxidative actions. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2466–2471, 2008.

KIM, Y. J.; YOKOZAWA, T. Modulation of oxidative stress and melanogenesis by proanthocyanidins. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 7, p. 1155–1159, 2009.

KÜÇÜKGÜL, A.; İŞGÖR, M. M.; DÜZGÜNER, V. **In Vitro Effects of Oleuropein**

on Melonoma Cells. , 2016.

KYRIAKOU, S. et al. Evaluation of Bioactive Properties of Lipophilic Fractions of Edible and Non-Edible Parts of *Nasturtium officinale* (Watercress) in a Model of Human Malignant Melanoma Cells. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 2, 2022.

LEE, Y. J. et al. Flavonoid morin inhibits proliferation and induces apoptosis of melanoma cells by regulating reactive oxygen species, Sp1 and Mcl-1. **Archives of Pharmacal Research**, v. 42, n. 6, p. 531–542, 2019.

LEONARDI, G. C. et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **International Journal of Oncology**, v. 52, n. 4, p. 1071–1080, 2018.

LEUPOLD, D. et al. From melanocytes to melanoma cells: Characterization of the malignant transformation by four distinctly different melanin fluorescence spectra (review)[†]. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 10, 2021.

LIAO, W. et al. Curcumin inhibited growth of human melanoma A375 cells via inciting oxidative stress. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 95, n. March, p. 1177–1186, 2017.

LIN, J. Y.; FISHER, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 843–850, 2007.

LO, C. et al. Gallic acid induces apoptosis in A375.S2 human melanoma cells through caspase-dependent and -independent pathways. **Int. J. Oncol.**, v. 37, n. 2, p. 377–385, 2010.

LOCATELLI, C. et al. Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death. **Chemico-Biological Interactions**, v. 181, n. 2, p. 175–184, 2009.

MARCO RASTRELLI, SAVERIA TROPEA, C. R. R. AND M. A. Melanoma Pathology. **Melanoma**, v. 1012, p. 10–30, 2016.

MARQUES, M. M. et al. Photobiomodulation of Dental Derived Mesenchymal Stem Cells: A Systematic Review. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 34, n. 11, p. 500–508, 2016.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769–4807, 2011.

OBRADOR, E. et al. Oxidative stress and antioxidants in the pathophysiology of malignant melanoma. **Biological Chemistry**, v. 400, n. 5, p. 589–612, 2019.

OMENN, G. S. et al. Effects of a Combination of Beta Carotene and Vitamin A on Lung Cancer and Cardiovascular Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 18, p. 1150–1155, 1996.

OTTINO, P.; JR, D. Effect of alpha-tocopherol succinate on free radical and lipid

peroxidation levels in BL6 melanoma cells. **Free radical biology & medicine**, v. 22, n. 7, p. 1145–1151, 1997.

PAGE, M. J. et al. The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. **The BMJ**, v. 372, 2021a.

PAGE, M. J. et al. The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. **Journal of clinical epidemiology**, v. 134, p. 178–189, 1 jun. 2021b.

PAL, H. C. et al. Fisetin, a phytochemical, potentiates sorafenib-induced apoptosis and abrogates tumor growth in athymic nude mice implanted with BRAF-mutated melanoma cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 29, p. 28296–28311, 2015.

PALKO-ŁABUZ, A. et al. Conjugation with phospholipids as a modification increasing anticancer activity of phenolic acids in metastatic melanoma—in vitro and in silico studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, 2021.

PANIERI, E.; SANTORO, M. M. Ros homeostasis and metabolism: A dangerous liason in cancer cells. **Cell Death and Disease**, v. 7, n. 6, p. e2253-12, 2016.

PARK, S. J.; KIM, Y. T.; JEON, Y. J. Antioxidant dieckol downregulates the Rac1/ROS signaling pathway and inhibits Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-family verprolin-homologous protein 2 (WAVE2)-mediated invasive migration of B16 mouse melanoma cells. **Mol. Cells**, v. 33, n. 4, p. 363–369, 2012.

PATRIDGE, E. et al. Natural Products and Their Derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 00, n. January, p. 8–11, 2015.

PRASAD, R.; JC, K.; SK, K. Inhibition of NADPH oxidase 1 activity and blocking the binding of cytosolic and membrane-bound proteins by honokiol inhibit migratory potential of melanoma cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 7, p. 7899–7912, 2016.

PRASAD, S.; GUPTA, S. C.; TYAGI, A. K. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. **Cancer Letters**, v. 387, p. 95–105, 2017.

PROVINCIALI, M. et al. Zinc induces apoptosis of human melanoma cells, increasing reactive oxygen species, p53 and FAS ligand. **Anticancer Research**, v. 35, n. 10, p. 5309–5316, 2015.

RAUCA, V. F. et al. Biologically active *Ajuga* species extracts modulate supportive processes for cancer cell development. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. APR, p. 1–16, 2019.

RUSSO, A. et al. Lichen metabolites prevent UV light and nitric oxide-mediated plasmid DNA damage and induce apoptosis in human melanoma cells. **Life sciences**, v. 83, n. 13, p. 468–474, 2008.

SANDER, C. S. et al. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. **International Journal of Dermatology**, v. 43, n. 5, p. 326–335, 2004.

SATOOKA, H. et al. Effects of Thymol on B16-F10 Melanoma Cells. **JOURNAL OF**

AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, v. 60, n. 10, p. 2746–2752, 2012.

SBOC -SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA. Diretrizes de tratamentos oncológicos recomendados pela Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica -Melanoma Cutâneo. 2022.

SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. April, p. 1–20, 2015.

SCHOMBERG, J. et al. Luteolin inhibits melanoma growth in vitro and in vivo via regulating ECM and oncogenic pathways but not ROS. **Biochemical pharmacology**, v. 177, p. 114025, 2020.

SCOLYER, R. A.; LONG, G. V.; THOMPSON, J. F. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. **Molecular Oncology**, v. 5, n. 2, p. 124–136, 2011.

SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 6, p. 345–358, 2016.

SHUXI QIAO, CHRISTOPHER M. CABELLO, SARAH D. LAMORE, JESSICA L. LESSON, AND G. T. W. D-Penicillamine targets metastatic melanoma cells with induction of the unfolded protein response (UPR) and Noxa (PMAIP1)-dependent mitochondrial apoptosis. **Bone**, v. 78, n. 2, p. 711–716, 2012.

SINGH, S. et al. Lead phytochemicals for anticancer drug development. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. November 2016, p. 1–13, 2016.

VINCENT, K. M.; POSTOVIT, L. M. Investigating the utility of human melanoma cell lines as tumour models. **Oncotarget**, v. 8, n. 6, p. 10498–10509, 2017.

XIAO, Z. et al. Interventions to improve chronic cyclosporine A nephrotoxicity through inhibiting renal cell apoptosis: A systematic review. **Chinese Medical Journal**, v. 126, n. 19, p. 3767–3774, 2013.

ZUGIC, A. et al. Evaluation of anticancer and antioxidant activity of a commercially available CO₂ supercritical extract of old man's beard (*Usnea barbata*). **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, 2016.

Apêndice A

Tabela 5. Artigos excluídos e razão da exclusão (n=59) (continua).

Número	Primeiro autor/ano	Razão da exclusão
1	(HUANG et al., 2020)	(1)
2	(AHSAN et al., 2018)	(1)
3	(AKABERI et al., 2018)	(1)
4	(AN KEUN KIM, 2004)	(6)
5	(ARSLANBAEVA et al., 2022)	(1)
6	(BANO et al., 2020)	(1)
7	(BAO et al., 2016)	(1)
8	(BARADARAN RAHIMI et al., 2017)	(1)
9	(CENARIU et al., 2021)	(1)
10	(DE CICCIO et al., 2021)	(1)
11	(DING et al., 2014)	(1)
12	(DUAN et al., 2010)	(1)
13	(DÜZGÜNER et al., 2016)	(4)
14	(EMAMI et al., 2017)	(1)
15	(ESPOSITO et al., 2020)	(1)
16	(FILIPOVIĆ et al., 2014)	(1)
17	(GAL et al., 2015)	(2)
18	(GISMONDI et al., 2013)	(1)
19	(HILL-MÜNDEL; NOHR, 2021)	(1)
20	(HU et al., 2021)	(1)
21	(HUANG et al., 2012)	(1)
22	(HUANG et al., 2013)	(1)
23	(HUANG et al., 2014a)	(1)
24	(HUANG et al., 2014b)	(1)
25	(HUANG et al., 2015)	(1)
26	(HUANG et al., 2016)	(1)
27	(HUANG et al., 2020)	(1)
28	(IMEN et al., 2015)	(1)
29	(JIANG et al., 2017)	(1)
30	(JUANG et al., 2019)	(1)

Critérios de exclusão

- (1) Não concordância com o PICOS – Não avaliou a modulação do estresse oxidativo em células de melanoma após tratamento com antioxidante
- (2) Estudos *in Vivo*
- (4) Resumo de Conferência
- (6) Artigos publicados em língua não-inglesa

Tabela 8. Artigos excluídos e razão da exclusão (n=59) (continuação).

Número	Primeiro autor/ano	Razão da exclusão
31	(KHAR et al., 2001)	(1)
32	(LING et al., 2016)	(1)
33	(LIU et al., 2021)	(4)
34	(LIU-SMITH et al., 2017)	(4)
35	(MA et al., 2017)	(1)
36	(MENDIS et al., 2007)	(1)
37	(MH et al., 2018)	(1)
38	(MOKHTARI et al., 2015)	(1)
39	(PANCHUK et al., 2017)	(1)
40	(PAYEN et al., 2017)	(1)
41	(PIRES, 2012)	(4)
42	(PRIETO et al., 2012)	(1)
43	(RJ et al., 2013)	(1)
44	(RODEMEISTER; HILL, 2017)	(1)
45	(RODRIGUES et al., 2019)	(1)
47	(SABATIER et al., 2021)	(1)
48	(SERINI et al., 2020)	(1)
49	(SIM et al., 2017)	(1)
50	(SINICROPI et al., 2009)	(1)
51	(SOWINSKA et al., 2019)	(1)
52	(SUN; JIANG; WEI, 2013)	(1)
53	(TAKÁCS et al., 2020)	(1)
54	(VALCIC et al., 1996)	(1)
55	(WANG et al., 2017)	(4)
56	(YAMASAKI et al., 2015)	(1)
57	(YE et al., 2014)	(1)
58	(YU; AK, 2009)	(4)
59	(YU; KIM, 2004)	(6)

Critérios de exclusão

- (1) Não concordância com o PICOS – Não avaliou a modulação do estresse oxidativo em células de melanoma após tratamento com antioxidante
- (2) Estudos *in vivo*
- (4) Resumo de Conferência
- (6) Artigos publicados em língua não-inglesa.

Referências Bibliográficas

- AHMAD EMAMI, S. et al. Inhibitory effects of different fractions of *Nepeta satureioides* on melanin synthesis through reducing oxidative stress. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 2, p. 160–167, 2017.
- AHSAN, M. J. et al. Synthesis, Antiproliferative, and Antioxidant Activities of Substituted N-[(1,3,4-Oxadiazol-2-yl) Methyl] Benzamides. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 17, n. 2, p. 145–154, 2018.
- AKABERI, M. et al. Evaluation of antioxidant and anti-melanogenic activity of different extracts of aerial parts of *N. Sinenisii* in murine melanoma B16F10 cells. **Iran. J. Pharm. Res.**, v. 17, n. 1, p. 225–235, 2018.
- AN KEUN KIM, E. J. C. C. Effect of Pharbitidis Seed Extract on the Antioxidant Enzyme Activity in B16F10 Murine Melanoma Cells by Oxidative Stress. **Yakhak Hoeji**, v. 48, n. 1, p. 93–98, 2004.
- ARSLANBAEVA, L. et al. UBIAD1 and CoQ10 protect melanoma cells from lipid peroxidation-mediated cell death. **Redox Biology**, v. 51, 2022.
- BANO, S. et al. Enhancement of the cancer inhibitory effect of the bioactive food component resveratrol by nanoparticle based delivery. **Food & function**, v. 11, n. 4, p. 3213–3226, 2020.
- BAO, J. et al. Forsythiae Fructus Inhibits B16 Melanoma Growth Involving MAPKs/Nrf2/HO-1 Mediated Anti-Oxidation and Anti-Inflammation. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 44, n. 5, p. 1043–1061, 2016.
- BARADARAN RAHIMI, V. et al. Anti-melanogenic activity of *Viola odorata* different extracts on B16F10 murine melanoma cells. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 20, n. 3, p. 242–249, 2017.
- CENARIU, D. et al. Zeaxanthin-rich extract from superfood *lycium barbarum* selectively modulates the cellular adhesion and mapk signaling in melanoma versus normal skin cells in vitro. **Molecules**, v. 26, n. 2, 2021.
- DE CICCIO, P. et al. Inhibitory effects of cynaropicrin on human melanoma progression by targeting MAPK, NF- κ B, and Nrf-2 signaling pathways in vitro. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 3, p. 1432–1442, 2021.
- DING, H.-Y. et al. Methanol partition fraction of ethanol extract of *discorea nipponica* makino inhibits melanogenesis. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 5, p. 719–726, 2014.
- DUAN, Y. Q. et al. Inhibition effect of procyanidins from lotus seedpod on mouse B16 melanoma in vivo and in vitro. **FOOD CHEMISTRY**, v. 122, n. 1, p. 84–91, 2010.
- DÜZGÜNER, V. et al. The effects of *ziziphus jujuba* on skin cancer cells. **Turk. J. Biochem.**, v. 41, 2016.
- EMAMI, S. A. et al. Anti-melanogenic activity of different extracts from aerial parts of *nepeta glomerulosa* on murine melanoma B16F10 cells. **Iran. J. Pharm. Sci.**, v. 13, n. 2, p. 61–74, 2017.
- ESPOSITO, T. et al. Study on *Ajuga reptans* Extract: A Natural Antioxidant in

Microencapsulated Powder Form as an Active Ingredient for Nutraceutical or Pharmaceutical Purposes. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 7, 2020.

FILIPOVIĆ, N. R. et al. A Comparative Study of In Vitro Cytotoxic, Antioxidant, and Antimicrobial Activity of Pt(II), Zn(II), Cu(II), and Co(III) Complexes with N-heteroaromatic Schiff Base (E)-2-[N'-(1-pyridin-2-yl-ethylidene)hydrazino]acetate. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 99–110, 2014.

GAL, K. LE et al. Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 308, p. 0–8, 2015.

GISMONDI, A. et al. Antioxidant extracts of African medicinal plants induce cell cycle arrest and differentiation in B16F10 melanoma cells. **International Journal of Oncology**, v. 43, n. 3, p. 956–964, 2013.

HILL-MÜNDEL, K.; NOHR, D. Cytotoxic activity of high dose ascorbic acid is enhanced by 2-deoxy-d-glucose in glycolytic melanoma cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 546, p. 90–96, 2021.

HU, C. et al. Effect of antioxidants coenzyme Q10 and β -carotene on the cytotoxicity of vemurafenib against human malignant melanoma. **Oncology letters**, v. 21, n. 3, p. 208, 2021.

HUANG, H.-C. et al. Inhibition of melanogenesis and antioxidant properties of Magnolia grandiflora L. flower extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, 2012.

HUANG, H.-C. et al. Supercritical fluid extract of Lycium chinense Miller root inhibition of melanin production and its potential mechanisms of action. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, 2014a.

HUANG, H.-C. et al. Investigation of the anti-melanogenic and antioxidant characteristics of Eucalyptus camaldulensis flower essential oil and determination of its chemical composition. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 5, p. 10470–10490, 2015.

HUANG, H.-C. et al. Dihydromyricetin from Ampelopsis grossedentata inhibits melanogenesis through down-regulation of MAPK, PKA and PKC signaling pathways. **Chemico-Biological Interactions**, v. 258, p. 166–174, 2016.

HUANG, H. C. et al. [8]-Gingerol inhibits melanogenesis in murine melanoma cells through down-regulation of the MAPK and PKA signal pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 438, n. 2, p. 375–381, 2013.

HUANG, H. C. et al. Inhibitory effects of adlay extract on melanin production and cellular oxygen stress in B16F10 melanoma cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, p. 16665–16679, 2014b.

HUANG, H. C. et al. Phoenix dactylifera L. Seed extract exhibits antioxidant effects and attenuates melanogenesis in B16F10 murine melanoma cells by downregulating PKA signaling. **Antioxidants**, v. 9, n. 12, p. 1–19, 2020.

IMEN, M. B. et al. Anti-melanogenesis and antigenotoxic activities of eriodictyol in murine melanoma (B16-F10) and primary human keratinocyte cells. **Life Sciences**, v. 135, p. 173–178, 2015.

JIANG, R. et al. Ethyl acetate extract from *Panax ginseng* C.A. Meyer and its main constituents inhibit α -melanocyte-stimulating hormone-induced melanogenesis by suppressing oxidative stress in B16 mouse melanoma cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 208, p. 149–156, 2017.

JUANG, L.-J. et al. Safety assessment, biological effects, and mechanisms of *Myrica rubra* fruit extract for anti-melanogenesis, anti-oxidation, and free radical scavenging abilities on melanoma cells. **J. Cosmet. Dermatol.**, v. 18, n. 1, p. 322–332, 2019.

KHAR, A. et al. **Induction of stress response renders human tumor cell lines resistant to curcumin-mediated apoptosis: role of reactive oxygen intermediates. Cell stress & chaperones**, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11795474/>>

LING, B. et al. **Evaluating the cytotoxic effects of the water extracts of four anticancer herbs against human malignant melanoma cells. Drug design, development and therapy**, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27843296/>>

LIU-SMITH, F. et al. Double discordance in the ros-induction and anti-tumor activity of luteolin, a classical free radical scavenger. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 112, p. 93, 2017.

LIU-SMITH, F.; WANG, Z.; MEYSKENS, F. ROS-independent inhibition of melanoma tumor growth by luteolin involves BRAF and the MAPK pathway. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 128, p. S70, 2018.

LIU, Y.-J. et al. The anti-melanogenesis effect of 3,4-dihydroxybenzalacetone through downregulation of melanosome maturation and transportation in b16f10 and human epidermal melanocytes. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n. 6, p. 1–15, 2021.

MA, H. et al. Cosmetic applications of glucitol-core containing gallotannins from a proprietary phenolic-enriched red maple (*Acer rubrum*) leaves extract: inhibition of melanogenesis via down-regulation of tyrosinase and melanogenic gene expression in B16F10 melanoma cells. **Archives of Dermatological Research**, v. 309, n. 4, p. 265–274, 2017.

MENDIS, E. et al. An in vitro cellular analysis of the radical scavenging efficacy of chitooligosaccharides. **Life sciences**, v. 80, n. 23, p. 2118–2127, 2007.

MH, C. et al. Antioxidative and Anti-Melanogenic Activities of Bamboo Stems (*Phyllostachys nigra* variety henosis) via PKA/CREB-Mediated MITF Downregulation in B16F10 Melanoma Cells. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, 2018.

MOKHTARI, K. et al. Maslinic Acid, a Triterpene from Olive, Affects the Antioxidant and Mitochondrial Status of B16F10 Melanoma Cells Grown under Stressful Conditions. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

PANCHUK, R. R. et al. Tissue-protective activity of selenomethionine and D-panthetine in B16 melanomabearing mice under doxorubicin treatment is not connected with their ROS scavenging potential. **Croatian Medical Journal**, v. 58, n. 2, p. 171–184, 2017.

PAYEN, V. L. et al. (+)-catechin in a 1:2 Complex with lysine inhibits cancer cell

migration and metastatic take in mice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. DEC, p. 1–11, 2017.

PIRES, A. S. THE IN VITRO AND IN VIVO EFFECT OF ASCORBIC ACID IN A MELANOMA CELL LINE: A NEW MECHANISM OF ACTION? **Annals of Oncology**, 2012.

PRIETO, J. M. et al. Comparative study of the in vitro bioactivities of *Bupleurum rigidum* and *B. frutescens*. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 6, p. 757–760, 2012.

RJ, B. et al. Visfatin affects redox adaptative responses and proliferation in Me45 human malignant melanoma cells: an in vitro study. **Oncology reports**, v. 29, n. 2, p. 771–778, 2013.

RODEMEISTER, S.; HILL, K. Pyruvate diminishes the cytotoxic activity of ascorbic acid in several tumor cell lines in vitro. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 493, n. 3, p. 1184–1189, 2017.

RODRIGUES, M. J. et al. Sea knotgrass (*Polygonum maritimum* L.) as a potential source of innovative industrial products for skincare applications. **INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS**, v. 128, p. 391–398, 2019.

SABATIER, P. et al. Comprehensive chemical proteomics analyses reveal that the new TRi-1 and TRi-2 compounds are more specific thioredoxin reductase 1 inhibitors than auranofin. **Redox Biology**, v. 48, n. November, 2021.

SERINI, S. et al. The combination of sulforaphane and farnblock® xp improves individual beneficial effects in normal and neoplastic human skin cell lines. **Nutrients**, v. 12, n. 6, 2020.

SIM, M. O. et al. Anti-melanogenesis and anti-oxidant of *Salix pseudo-lasiogyne* water extract in α -MSH-induced B16F10 melanoma cells. **Food and Agricultural Immunology**, v. 28, n. 6, p. 1003–1016, 2017.

SINICROPI, M. S. et al. Synthesis, inhibition of NO production and antiproliferative activities of some indole derivatives. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 5, p. 1148–1153, 2009.

SOWINSKA, M. et al. Molecular antioxidant properties and in vitro cell toxicity of the p-aminobenzoic acid (PABA) functionalized peptide dendrimers. **Biomolecules**, v. 9, n. 3, 2019.

SUN, Y.; JIANG, L.; WEI, D. Partial characterization, in vitro antioxidant and antiproliferative activities of patatin purified from potato fruit juice. **Food Funct**, v. 4, n. 10, p. 1502–1511, 2013.

TAKÁCS, A. et al. Alpha-lipoic acid alters the antitumor effect of bortezomib in melanoma cells in vitro. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 14287, 2020.

VALCIC, S. et al. Inhibitory effect of six green tea catechins and caffeine on the growth of four selected human tumor cell lines. **ANTI-CANCER DRUGS**, v. 7, n. 4, p. 461–468, 1996.

WANG, Z. et al. Luteolin inhibits melanoma growth in vitro and in vivo via mitochondrial ROS induction. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 30, n. 1, p.

116, 2017.

YAMASAKI, M. et al. Placental extracts induce the expression of antioxidant enzyme genes and suppress melanogenesis in B16 melanoma cells. **Natural product research**, v. 29, n. 22, p. 2103–2106, 2015.

YE, Y. et al. Optimization of phenolics extracted from *Idesia polycarpa* defatted fruit residue and its antioxidant and depigmenting activity in vitro and in vivo. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

YU, J.; AK, K. Effect of taurine on antioxidant enzyme system in B16F10 melanoma cells. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 643, p. 491–499, 2009.

YU, J. S.; KIM, A. K. Effect of myricetin combined with vitamin C or vitamin E on antioxidant enzyme system in murine melanoma cells. **Korean J. Pharmacogn.**, v. 35, n. 4, p. 357–363, 2004.