

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

BRUNO CAMPOS FONTOURA

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL DE CAMUNDONGOS PORTADORES DE
MELANOMA EXPERIMENTAL**

**PONTA GROSSA
2019**

BRUNO CAMPOS FONTOURA

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL DE CAMUNDONGOS PORTADORES DE
MELANOMA EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada para obtenção
do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas na Universidade Estadual
de Ponta Grossa em parceria com a
Universidade Estadual Centro Oeste.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino
Fávaro.

Coorientador: Prof. Dr. Everson Augusto
Krum

PONTA GROSSA

2019

F684 Fontoura, Bruno Campos
Avaliação da Função Renal de Camundongos Portadores de Melanoma Experimental / Bruno Campos Fontoura. Ponta Grossa, 2019.
43 f.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Farmacos, medicamentos e biociências aplicadas à farmácias), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Favero.
Coorientador: Prof. Dr. Everson Augusto Krum.

1. Câncer. 2. Câncer de pele. 3. Melanoma. I. Favero, Giovani Marino. II. Krum, Everson Augusto. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Farmacos, medicamentos e biociências aplicadas à farmácias. IV.T.

CDD: 616



Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Programa de
Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas
Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta



Ponta Grossa, 19 de fevereiro de 2019.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 01/2019 DO MESTRANDO BRUNO CAMPOS FONTOURA REALIZADA NO DIA 19 DE FEVEREIRO DE 2019, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos dezenove dias de fevereiro de dois mil e dezenove, às 09h00min, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – sala 115 - Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência do Professor Doutor Giovanni Marino Favero reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas do mestrando Bruno Campos Fontoura na linha de pesquisa: Avaliação Clínico/Laboratorial de Processos Fisiopatológicos, constituída pelos Professor Doutor Giovanni Marino Favero (UEPG/PR), demais Doutores (membros titulares): Angelo César D'Urso Panerari (UNICESUMAR-UNINGA/PR) e José Fabiano Costa Justus (UEPG/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

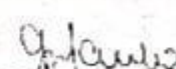
O título do trabalho foi: **"AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL DE CAMUNDONGOS PORTADORES DE MELANOMA EXPERIMENTAL."**

Encerrada a defesa, a banca pronunciou-se APROVADO a dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30-dias, a versão definitiva da dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

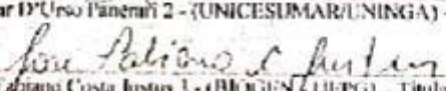
Observações (se necessário):

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título:


Giovanni Marino Favero 1 - (BIOGEN - UEPG) Presidente


Angelo César D'Urso Panerari 2 - (UNICESUMAR/UNINGA) – Titular


José Fabiano Costa Justus 3 - (BIOGEN - UEPG) – Titular

Pós - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Farmacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia - Fone (41)
3220-3337 - ppgf@uepg.br
Av. Carlos Cavalcanti, 4246 - Ponta Grossa - Paraná - Brasil - CEP: 84030-900

“Quando o campo começa a ficar grande é preciso conhecer os atalhos”

Romário

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que nos momentos mais difíceis nunca me faltou.

Ao amor da minha vida Silvia Maria minha verdadeira inspiração.

À minha família e amigos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos nesses dois anos, em especial ao Prof. Flávio Beltrame, coordenador nesse período, sempre disposto a esclarecer as dúvidas relacionadas às normativas do mestrado.

Ao Prof. Giovani, meu orientador, que confiou em mim e me proveu abundantemente de conhecimento nesses dois anos de convívio.

Aos professores Dr. José Fabiano Costa Justus e Dr. Mauro Paes pela imensa colaboração dada na qualificação deste trabalho.

Ao Prof. Leandro Lipinski e Bruno Ribeiro Cruz, por todo o auxílio na experimentação animal e laboratorial.

RESUMO

O câncer está entre as principais causas de morte em todo o mundo. O melanoma é o tumor de pele com pior prognóstico quando não tratado no início da doença. As características desse tumor são associadas à intensa secreção que essas células com um alto grau de indiferenciação produzem. Interessantemente, além de despejarem na corrente sanguínea catecolaminas, microvesículas, e outras substâncias, devido a sua alteração morfofuncional, elas mantêm a produção e secreção contínua de melanina. Em meados dos anos dois mil, foi caracterizada a presença de melanúria em um paciente com melanoma avançado, nessa mesma época relatos de insuficiência renal associada a essa doença foram também descritos. A progressão da doença leva a nefropatia, um aumento inicial da pressão arterial, seguido de imunossupressão, sepse, ascite e hipotensão. Os depósitos de melanina nos órgãos internos são comuns em um estágio avançado. O objetivo desse trabalho foi avaliar marcadores bioquímicos de lesão hepática e, principalmente, renal em um modelo experimental de melanoma em camundongos. Os animais foram divididos em três grupos, sendo: controle, implante de células B16F10 (melanoma murino) e animais que receberam injeções diárias de sobrenadante de cultura de melanoma B1610. Foi avaliado em dois períodos dez e vinte dias. Os resultados mostraram que as enzimas hepáticas, TGO e TGP, estão aumentadas após 10 e 20 dias de experimentação apenas nos animais portadores de melanoma; ocorreu uma perda da função renal nos camundongos portadores de melanoma experimental avaliados pelos marcadores urinários; a aplicação diária de melanina e outros fatores derivados do sobrenadante de melanoma não alterou a função renal dos camundongos.

Palavras Chave: Câncer. Câncer de pele. Melanoma.

ABSTRACT

Cancer is among the leading causes of death worldwide. Melanoma is the skin tumor with poor prognosis when not treated at the onset of the disease. The characteristics of this tumor are associated with the intense secretion that these cells, with a high degree of indifferenciation, produce. Interestingly, besides these cells leads to the bloodstream catecholamines, microvesicles, and other substances, due to their morphofunctional change, they maintain the production and continuous secretion of melanin. In the middle of the two thousand years, the presence of melanuria was characterized in a patient with advanced melanoma, at that same time was reported a renal failure associated with this disease. The progression of the disease leads to nephropathy, an initial increase in blood pressure, followed by immunosuppression, sepsis, ascites and hypotension. Melanin deposits in the internal organs are common in an advanced stage. The aim of this study was to evaluate biochemical markers of hepatic and, mainly, renal damage in an experimental model of melanoma in mice. The animals were divided into three groups: control, B16F10 (murine melanoma) cell implantation and animals receiving daily injections of B1610 melanoma culture supernatant. It was evaluated in two periods ten and twenty days. The results showed that hepatic enzymes, TGO and TGP, are increased after 10 and 20 days of experimentation only in animals with melanoma; there was a loss of renal function in mice with experimental melanoma evaluated by urinary markers; the daily application of melanin and other factors derived from the melanoma supernatant did not alter the renal function of the mice.

Keywords: Cancer. Skin cancer. Melanoma.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Avaliação bioquímica de Uréia (A) e Creatinina (B) de camundongos C57BL/6 submetidos a implante de melanoma B16F10 ou dose diárias de sobrenadante de cultura de melanoma B16F10, após 10 dias de experimentação. *	
p<0,05.....	34
FIGURA 2 - Avaliação bioquímica de TGO (A) e TGP (B) de camundongos C57BL/6 submetidos a implante de melanoma B16F10 ou dose diárias de sobrenadante de cultura de melanoma B16F10, após 10 dias de experimentação. * p<0,05.....	34
FIGURA 3 - Avaliação bioquímica de Uréia (A) e Creatinina (B) de camundongos C57BL/6 submetidos a implante de melanoma B16F10 ou dose diárias de sobrenadante de cultura de melanoma B16F10, após 20 dias de experimentação. *	
p<0,05.....	35
FIGURA 4 - Avaliação bioquímica de TGO (A) e TGP (B) de camundongos C57BL/6 submetidos a implante de melanoma B16F10 ou dose diárias de sobrenadante de cultura de melanoma B16F10, após 20 dias de experimentação. * p<0,05.....	35
FIGURA 5 - Quantificação sérica de Interleucina-18 em camundongos sem tratamento, portadores de melanoma (20 dias após a injeção de células 5×10^4 células B16F10) e tratados com sobrenadante de cultura de B16F10 por vinte dias. * p<0,05.....	36

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	Classificação dos tumores malignos.....	18
QUADRO 2 -	Grupamento por Estádios.....	18
QUADRO 3 -	Classificação TNM do melanoma cutâneo.....	25

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	CÂNCER.....	12
3	CÂNCER DE PELE.....	18
4	MELANOMA.....	21
5	FUNÇÃO RENAL.....	25
6	INSUFICIÊNCIA RENAL EM MELANOMA.....	27
7	OBJETIVOS.....	28
7.7	OBJETIVO GERAL.....	28
7.8	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
8	METODOLOGIA.....	29
8.1	CULTURA DE MELANOMA	29
8.2	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E CONTAGEM DE CÉLULAS PARA ESTIMATIVA DE MELANINA PELO MÉTODO DO AZUL TRIPAN.....	29
8.3	DETERMINAÇÃO DA ESTIMATIVA DE MELANINA EM SOBRENADANTE DE CÉLULAS B16F10.....	29
8.4	MODELO ANIMAL.....	30
8.5	IMPLANTE DAS CÉLULAS TUMORAIS.....	30
8.6	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL.....	30
8.7	DETERMINAÇÃO DE ENZIMAS HEPÁTICAS.....	31
8.8	AVALIAÇÃO DE IL-18 PELO MÉTODO DE ELISA.....	31
8.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
9	RESULTADOS.....	33
10	DISCUSSÃO.....	36
11	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS.....	40
	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO.....	43

1 INTRODUÇÃO

O melanoma é uma neoplasia de pele com maior potencial de mortalidade (SBOC, 2011). Representa cerca de 4% de todos os tumores de pele, tendo sua origem a partir dos melanócitos. (MATHEUS, 2015).

Os melanócitos são células especializadas que, na pele, residem na camada basal da epiderme e nos folículos pilosos, formando as unidades produtoras de melanina da epiderme. Possuem papel fundamental na proteção da pele contra os danos causados pelos raios ultravioleta. (FREITAS, 2018).

A história de exposição excessiva à radiação ultravioleta (em particular na infância), a presença de antecedentes familiares, assim como o número de nevos típicos e atípicos, são descritos como importantes fatores de risco para o melanoma. (ALMEIDA, 2016). Isto porque estes fatores contribuem para a perturbação intracelular nos melanócitos, permitindo que se proliferem e se espalhem.

A proliferação exacerbada pode ficar restrita à epiderme, constituindo geralmente tumores benignos; porém, podem progredir para a fase de crescimento radial, atingindo um estágio mais perigoso, com nódulos invadindo a derme, onde as células apresentam potencial metastático. (FREITAS, 2018). O melanoma quando avança profundamente apresenta grande capacidade de metástase, mesmo em fases iniciais, já que a característica de invadir e disseminar poderiam ser consideradas uma característica inata deste tipo celular. (CANNAVÒ, 2019; WAINSTEIN, 2014).

O melanoma está entre as causas de Nefropatia Membranosa. Esta, é uma doença caracterizada pelo espessamento difuso da parede do capilar glomerular, devido ao acúmulo de depósitos eletrodensos contendo imunoglobulinas ao longo do lado subepitelial da membrana basal. A parede glomerular se torna defeituosa, o que a longo prazo pode acarretar em perda da função renal. (UBACK, 2012). Além do depósito de complexo de imunoglobulinas, a abundante secreção de melanina, por esse tipo de tumor, leva a uma insuficiência renal.

A progressão clínica dos portadores de melanoma metastático é a insuficiência renal, com uma sequência de infecções devido ao comprometimento imunológico, ascite, hipertensão e posterior hipotensão associada a sepse. Poucos estudos tem

mostrado experimentalmente e/ou cronologicamente os efeitos dessa doença na função renal. Assim, objetivamos essa avaliação de eventos nefrotóxicos, com uma correlação inicial da atividade hepática, em um modelo clássico de melanoma em camundongos.

2 CÂNCER

O Câncer é um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo responsável por mais de 6 milhões de mortes ao ano. (GUERRA, 2005). Com a melhora gradativa da esperança de vida no planeta, estima-se que até 2020 a patologia alcançará mais de 15 milhões de novos casos. (BRASIL, 2016).

No ano de 2011, o câncer foi responsável por 16,4% dos óbitos, sendo a segunda causa de morte no Brasil. Esse panorama se mantém por anos, continuando nessa posição, em 2018 mais de 200 mil pessoas morreram de diferentes tipos de tumores no Brasil. Os dados de internação do Sistema Único de Saúde (SUS) informam que as neoplasias foram a terceira causa de internação no período de 2002 à 2012. (OLIVEIRA, 2015). A distribuição epidemiológica da doença no Brasil envolve um aumento entre os tipos de câncer normalmente associados ao alto status socioeconômico (câncer de mama, próstata, cólon e reto) e, simultaneamente, a presença de taxas de incidência persistentemente elevadas de tumores geralmente associados à pobreza (câncer de colo de útero, pênis, estômago e cavidade oral). Esta distribuição certamente resulta de exposição à diferentes fatores de risco ambientais – agentes químicos, físicos e biológicos – e de exposição a outros fatores relacionados à disparidades sociais. (GUERRA, 2005).

O câncer é considerado uma desordem de células que se dividem anormalmente, o que conduz à formação de agregados que crescem causando danos à tecidos vizinhos, se nutrem do organismo e alteram sua fisiologia. Estas células podem migrar e invadir outros tecidos, onde encontram um local apropriado para continuar seu crescimento, originando uma metástase. (SÁNCHEZ, 2013). Caracteriza-se por uma desordem genética causada por mutações do DNA que, em sua maior parte, são adquiridas espontaneamente ou induzidas por agressões do ambiente. É a denominação genérica usada para tumores malignos. O termo tumor é usado como sinônimo de Neoplasia, que significa crescimento novo. (KUMAY, 2013).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o crescimento celular responde às necessidades específicas do corpo, sendo um processo cuidadosamente regulado; tal crescimento envolve o aumento da massa celular, duplicação do ácido desoxirribonucleico (ADN) e divisão física da célula em duas células filhas idênticas

(mitose). O ciclo celular possui 5 fases: G1, S, G2, M e G0, tendo cada fase duração variável, porém com os processos que ocorrem em seu interior se mantendo iguais para todas.

Fase G1: ocorre a preparação para a síntese de ADN mediante a mobilização de bases puras e pirimídicas, fosfatos e riboses, para a síntese de nucleotídeos, aminoácidos, proteínas, inclusive enzimas. Tanto a síntese de ARN como a de proteínas são indispensáveis para que a célula passe da fase G1 para a seguinte. Células como a da pele, mucosas e da medula óssea, como estão em constante divisão, têm G1 muito curto, podendo-se dizer que não apresentam a fase G0.

Fase S: uma proteína desencadeante é produzida para fazer a interação entre o ADN e a enzima duplicasse o ADN; ocorrendo esta reação, ele é inteiramente duplicado.

Fase G2: período pré-mitótico, onde a síntese de ADN está completa e os cromossomos, em número dobrado, reorganizam-se e o núcleo prepara-se para a divisão celular.

Fase M: é curta e corresponde a mitose, onde ocorrem movimentações cromossômicas e clivagem, cujo resultado é a distribuição de pares de cromossomos para as duas células-filha. Estas, dependendo de sua função, morrem, iniciam a fase G1 ou passam para a fase G0.

Fase G0: as células apresentam menos atividade metabólica, apresentando um período prolongado de repouso, durante o qual as células não respondem aos estímulos que iniciam a síntese de ADN.

Diversos organismos vivos podem apresentar, em alguma fase da vida anormalidade no crescimento celular, com as células se dividindo de maneira rápida, agressiva e incontrolável, espalhando-se por diversas regiões do corpo. (INCA, 2011). Isso ocorre devido a ruptura dos mecanismos de regulação do crescimento celular, resultando daí uma célula propensa à anomalia de crescimento e divisão, insensível ao mecanismo de regulação normal, que resulta na formação da neoplasia (INCA, 2002).

Em estudo de Sánchez (2013), o processo pelo qual as células normais se transformam em cancerosas se denomina carcinogênese. A transformação

progressiva de células normais em células malignas se origina em mutações genéticas; esta mutação confere às células a capacidade de se dividirem em uma velocidade maior e gerar uma descendência que conserva a mutação. As células filha apresentam maior capacidade de sobrevivência e crescimento, o que permite gerar um clone neoplásico resistente. Kumay (2013), citam que células neoplásicas são transformadas, pois continuam a replicação “desatentas” à regulação do crescimento normal; portanto, as neoplasias desfrutam de um certo grau de autonomia e tendem a aumentar de tamanho, independentemente de seu ambiente local.

Normalmente, as células do sistema imunológico são capazes de eliminar as células tumorais, em um processo chamado imunovigilância tumoral. (SÁNCHEZ, 2013). Por intermédio de uma complexa rede de interações, o sistema imunológico é capaz de reconhecer ameaças internas e externas, reagindo de forma a eliminar, neutralizar ou tolerar alterações da homeostase orgânica; para isto, várias subpopulações de linfócitos passam por processo de seleção e diferenciação, no qual a capacidade de auto reconhecimento é desenvolvida e faz com que eventuais alterações do meio molecular interno gerem respostas biológicas de adaptação do organismo. As moléculas estranhas que modificam as redes de interações habituais podem ser reconhecidas pelos linfócitos desencadeando uma resposta imunológica e exercendo vigilância sobre a integridade do meio interno. (INCA, 2002). Porém, algumas células podem adquirir novas capacidades que as permitem fugir destes mecanismos de controle, gerando a neoplasia. (SÁNCHEZ, 2013).

De acordo com INCA (2002), o comportamento biológico, as neoplasias são divididas em benignas e malignas. Os critérios que permitem estabelecer com segurança o diagnóstico são:

- Encapsulação: os tumores benignos possuem pseudo cápsulas fibrosas que se formam em decorrência da compressão dos tecidos vizinhos pelo crescimento lento e expansivo do tecido tumoral; os tumores malignos, devido ao crescimento rápido, desordenado e infiltrativo do tecido, não permite a formação de pseudo cápsulas.
- Crescimento: os tumores benignos apresentam crescimento lento e expansivo, possuindo estroma adequado, bom suprimento vascular, raramente mostrando necrose e hemorragia; os tumores malignos apresentam rapidez e desordem de crescimento, por seu caráter infiltrativo e alto índice de multiplicação celular,

apresentando grande desproporção entre o parênquima tumoral e o estroma vascularizado.

- **Morfologia:** as células parenquimatosas dos tumores benignos são bem diferenciadas e reproduzem o aspecto da célula original; as células dos tumores malignos apresentam menores graus de diferenciação e, conseqüentemente, não apresentam as características dos tecidos que as originaram.
- **Mitoses:** nos tumores benignos são raras e têm aspecto típico; no caso dos tumores malignos, as figuras de mitose são vistas em maior número e podem ter aspecto atípico.
- **Antigenicidade:** por serem diferenciadas, as células dos tumores benignos não apresentam a capacidade de produzir antígenos; as células malignas podem apresentar essa capacidade, o que vem permitindo a identificação de alguns antígenos tumorais e trazido progressos no estudo da imunologia de neoplasias.
- **Metástase:** os tumores malignos têm capacidade de invasão e disseminação, o que resulta na produção de metástases, que constituem o crescimento neoplásico secundário, a distância, sem continuidade com o foco primitivo.

A designação dos tumores benignos é feita, geralmente, acrescentando o sufixo *oma* ao tipo celular do qual eles surgem. (KUMAY, 2013); como exemplos, temos os *condromas* (tumor benigno do tecido cartilaginoso) ou os *adenomas* (tumor benigno do tecido epitelial). Quanto aos tumores malignos, é necessário considerar a origem embrionária dos tecidos de que deriva o tumor; quando o epitélio de origem for glandular, passam a ser chamados de *adenocarcinomas* (ex.: adenocarcinoma de face) e quando a origem é o tecido conjuntivo, é formado pelo nome do tecido mais a determinação sarcoma (ex.: condrossarcoma – tumor maligno do tecido cartilaginoso). (INCA, 2002).

Ainda quanto à nomenclatura, notam-se algumas inconsistências flagrantes. Por exemplo, são usados os termos *linfoma*, *mesotelioma*, *melanoma* e *seminoma* para neoplasias malignas. (KUMAY, 2013).

Segundo INCA (2002), apesar de sua variedade, os tumores malignos seguem um curso biológico mais ou menos comum a todos eles, que se inicia pelo crescimento e invasão local, segue pela invasão dos órgãos vizinhos e termina com a disseminação regional e sistêmica. Outro estudo do INCA (2011), mostra que o grau

de disseminação é avaliado através de um método denominado Estadiamento, sendo o mais utilizado o preconizado pela União Internacional Contra O Câncer. É denominado *Sistema TNM de Classificação de Tumores Malignos* e se baseia na extensão anatômica da doença, levando em conta as características do tumor primário (T), as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N) e a presença ou ausência de metástase à distância (M).

QUADRO 1 - Classificação dos tumores malignos

Estádio	Descrição
Tumor (T)	
TX	Tumor primário, não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ
T1, T2, T3 e T4	Tamanho crescente e/ou extensão local do tumor primário
Linfonodos regionais (N)	
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1, N2 e N3	Comprometimento crescente dos linfonodos regionais
Metástase à distância	
MX	Presença de Metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

Fonte: BOTTON, 2015.

QUADRO 2 - Grupamento por Estádios

(continua)

Estádio		Tumor	Linfonodo	Metástase
0		Tis	N0	M0
I	Ia	T1	N0	M0
	Ib	T0	N1	M0
		T1	N1	M0
II	IIa	T0	N1	M0
		T1	N1	M0
		T2	N0	M0
	IIb	T2	N1	M0
		T3	N0	M0
III	IIIa	T0	N2	M0
		T1	N2	M0
		T2	N2	M0
		T3	N1	M0
		T3	N2	M0
	IIIb	T4	N0	M0
		T4	N1	M0
		T4	N2	M0

(continuação)

	IIIC	Qualquer T	N3	M0
IV		Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: INCA, 2011.

Além do TNM, a classificação das neoplasias malignas deve considerar a localização, o tipo histopatológico, produção de substâncias e manifestações clínicas do tumor, além de comportamentos e características biológicas do paciente.

As mutações dos genes responsáveis pela carcinogênese podem ser herdadas ou adquiridas novamente, geralmente produto da exposição a substâncias do ambiente (carcinógenos), ou agentes biológicos (vírus oncogênicos). (SÁNCHEZ, 2013). Não há dúvida de que a susceptibilidade genética tem papel importante para o surgimento do câncer, mas é a interação entre susceptibilidade, fatores de risco e modo de vida que determina o risco de adoecimento. (INCA, 2016).

A energia radiante, solar e ionizante, é o mais importante carcinógeno físico; a radiação ultravioleta natural pode causar câncer de pele em quem se expõe a altas doses por um longo período de tempo. (INCA, 2002). Hoje está bem estabelecido que o número de queimaduras devido à exposição solar na infância e na adolescência está associado ao aparecimento de melanoma na idade adulta, o que torna a proteção das radiações solares de extrema importância nessa fase da vida. (INCA, 2016).

3 CÂNCER DE PELE

A pele é um órgão complexo que participa ativamente da regulação de eventos celulares e moleculares que regem as interações do corpo com o ambiente externo. É constantemente banhada por antígenos microbianos e não microbianos que são processados pelas células de Langerhans, que iniciam as respostas imunes. As doenças de pele são comuns e diversificadas, sendo a pele uma “janela” acessível pelas quais numerosas doenças podem ser visualizadas e reconhecidas. (KUMAY, 2013). Protege o corpo contra a ação de raios solares; a exposição prolongada a tais raios torna a epiderme mais espessa e os melanócitos aumentam a produção de melanina, que provê a pele a sua cor. A melanina absorve a energia dos raios ultravioleta e impede que estes penetrem mais profundamente nos tecidos, sendo uma substância protetora natural. (SONDA, 2011).

A sensibilidade à luz solar varia de acordo com a raça, a exposição prévia e a cor da pele. Quanto mais se possui melanina, maior a resistência aos efeitos nocivos do sol como queimaduras, envelhecimento prematuro da pele e câncer de pele, (SONDA, 2011).

O câncer de pele é a neoplasia de maior incidência no Brasil. (CASTILHO, 2010). Corresponde a cerca de 25% dos cânceres malignos registrados no país. (INCA, 2011). Para o ano de 2014, foram estimados 188.020 novos casos. (FEITOSA, 2015).

Indivíduos de cabelo claro, olhos claros, efélides, ruivos, com ancestrais célticos e fototipo de Fitzpatrick I e II tem risco elevado de câncer de pele – apresentam tendência a queimaduras, tem história de queimaduras na infância e não se bronzeiam com a exposição solar. Isto porque, sabe-se, a melanina tem efeito protetor na pele por dificultar a penetração dos raios solares. (ZINK, 2014). É relativamente raro em crianças e negros, com exceção daqueles portadores de doenças cutâneas prévias. (INCA, 2011).

A radiação ultravioleta solar é reconhecida como o principal fator de risco para tumores cutâneos. Outros fatores de risco ambientais relacionados são a redução da camada de ozônio e viver em regiões de alta e baixa latitude. (PEREIRA, 2015). Doenças cutâneas prévias, fatores irritadiços crônicos, cicatrizes de queimadura e exposição a fatores químicos podem levar ao diagnóstico de câncer de pele; nestes

casos, a doença costuma se manifestar muitos anos após a exposição contínua aos fatores de risco citados. (POPIM, 2004).

Os raios ultravioleta (UV), além de facilitar mutações genéticas, exercem efeito supressor no sistema imune cutâneo. (CASTILHO, 2010). De acordo com o comprimento de onda, o espectro da radiação ultravioleta é subdividido em três bandas: os raios UVA apresentam comprimento de onda mais longo (315-400nm), indutora de processos oxidativos; os raios UVB (280-315nm), são responsáveis por danos diretos ao DNA, foto-imunossupressão, eritema, espessamento do estrato córneo e melanogênese; os raios UVC (100-280nm), são carcinogênicos e contém o pico de absorção pelo DNA puro. A incidência de raios UVA independe da camada de ozônio e, portanto, causa câncer de pele em indivíduos que se expõe ao sol, sobretudo em horários de alta incidência. (POPIM, 2004).

Existem dois tipos distintos de câncer de pele: o câncer de pele não melanoma e o melanoma. (ZINK, 2014). O câncer de pele não melanoma é o mais incidente no país, tendo sido previstos 182.130 novos casos para 2014; o melanoma tem letalidade alta, porém com baixa incidência, com previsão de 5.890 novos casos para o mesmo ano. (FEITOSA, 2015). Parece haver relação entre a cópia do fator p53 mutado e câncer de pele, sendo este maligno em mais de 50% dos humanos. O p53 é um gene supressor tumoral encontrado em muitos tumores malignos e benignos, cuja função primária é manter as células em repouso, após um dano ao DNA. (POPIM, 2004).

O câncer de pele não melanoma (CPNM), possui baixa taxa de metástase, mas significativa morbidade. Uma de suas características é a multiplicidade de lesões, especialmente quando o tumor inicial é o carcinoma basocelular (CBC). (PEREIRA,

2015). Além do carcinoma basocelular, existe o carcinoma epidermóide ou espinocelular (CEC); representam 70% e 25% dos casos, respectivamente. Contudo, como são diagnosticados precocemente, o índice de cura é elevado. (POPIM, 2004).

Segundo Zink (2014), o CBC é um tumor maligno originado de células não queratinizantes que formam a camada basal da epiderme. É a neoplasia mais comum

e sua origem é multifatorial, embora a maioria das lesões esteja associada à exposição excessiva aos raios UV. Pode ser classificado em: nodular ou nóduloulcerado, superficial, esclerodermiforme, cístico, metaplasico, adenoide,

ceratótico, infundibular, infiltrativo, micronodular e pigmentado. Estudo de Souza (2009), mostra que caracteristicamente, o CBC desenvolve-se em uma área exposta ao sol, com 30% das lesões ocorrendo no nariz. Sua progressão é lenta e o

diagnóstico é feito, comumente, pela presença de lesão inicialmente em forma de pápula que evolui para nódulo e, posteriormente, desenvolve uma ulceração central

Zink (2014), também expõe sobre o CEC, como sendo um tumor maligno derivado de ceratinócitos. O maior fator de risco é a exposição crônica e excessiva ao sol, também sendo relacionado à presença do papiloma vírus humano (HPV) e com a imunossupressão. Embora o poder de invasão e destruição tecidual e a chance de metástase seja maior neste câncer do que no CBC, a taxa de cura do CEC pode chegar à 95% quando detectado precocemente. Souza (2009), explica que seu diagnóstico é feito principalmente pela identificação de uma mancha avermelhada, ligeiramente elevada, ou em pápula nas áreas de exposição ao sol, mas também pode surgir em qualquer parte do corpo.

A prevenção e o diagnóstico precoce do câncer de pele, mediante o conhecimento de seus fatores de risco e marcadores, são fundamentais na redução de sua morbidade e mortalidade. (FERREIRA, 2011). O tratamento tem por objetivo erradicar o tumor. O método de tratamento depende de sua localização, tipo, profundidade das células, natureza invasiva do tumor e presença de linfonodos metastáticos. (FEITOSA, 2015). Independente da abordagem utilizada, os objetivos são a ressecção completa do tumor, a preservação da maior quantidade de tecido normal ao redor da lesão, o mínimo de dano cosmético e, conseqüentemente, a alta taxa de cura. (SOUZA, 2009).

4 MELANOMA

O Melanoma é uma neoplasia cancerosa em que melanócitos atípicos estão presentes na epiderme e na derme. (FEITOSA, 2015). Tem origem ectodérmica pouco comum, formando-se a partir de melanócitos, células produtoras de melanina, que por sua vez, migram da crista neural para toda a epiderme durante a embriogênese; por este fato, o tumor apresenta grande capacidade de metastatização mesmo em fases iniciais, já que as características de invadir e disseminar poderiam ser uma prerrogativa inata deste tipo celular. (WAINSTEIN, 2014). É mais frequente entre pessoas de 30 e 60 anos de idade, apresentando maior incidência em indivíduos de pele clara que vivem em baixas altitudes. Representa somente 5% dos cânceres cutâneos, porém, corresponde à 75% das mortes por ele causadas. (ALMEIDA, 2016). No Brasil, corresponde a 0,15% de todas as neoplasias malignas. (FIGUEIREDO, 2003). Na maioria das vezes se origina na pele, embora possa surgir a partir de mucosas ou em outros locais para os quais migram as células da crista neural. (WAINSTEIN, 2014).

É um tumor altamente imunogênico, capaz de provocar respostas imunes espontâneas no hospedeiro, apesar desse fenômeno não se relacionar, necessariamente, com um melhor desfecho clínico. (GATO, 2013).

O melanoma pode iniciar como um pequeno tumor cutâneo pigmentado sobre a pele normal, mais frequentemente em áreas expostas ao sol; quase metade dos casos ocorre a partir de nevos pigmentados pré-existentes. (SONDA, 2011). Sua cor característica é marrom ou preta, podendo apresentar pigmentações variando entre o rosado, bege e branco. (BOTTON, 2015).

A patologia se apresenta em diferentes formas: melanoma com disseminação superficial, extensivo superficial, lentigo-melanoma maligno, melanoma nodular e melanoma lentiginoso acral. Estes tipos apresentam características histológicas e clínicas específicas e diferentes comportamentos biológicos. (FEITOSA, 2015). Segundo Calmon (2005) e Feitosa (2015), são essas características:

Melanoma Expansivo Superficial: representa 70% dos casos, surgindo na quarta e quinta décadas de vida, em tronco e membros inferiores. A coloração varia, sendo hipopigmentado no centro e tendo expansão periférica. O matiz cinza escuro

translúcido é altamente sugestivo. Evolui de maneira crônica, podendo surgir ao longo do tempo nódulos elevados, sangramento ou transudação, o que caracteriza um estágio mais avançado, de crescimento vertical.

Melanoma Extensivo Superficial: ocorre em qualquer área do corpo, principalmente tronco e membros inferiores, afetando habitualmente indivíduos de meia idade. A lesão tende a ser circular, com porções externas irregulares. Pode aparecer em combinação de cores, com tonalidade bronzeada, acastanhada ou preta.

Lentigo-melanoma maligno: representa apenas 5% dos casos, atingindo indivíduos na sexta e sétima décadas de vida. Surge em área de lentigo solar que se apresenta como mácula acastanhada ou enegrecida, de limites nítidos e irregulares, alcançando vários centímetros de diâmetro, principalmente em face (90%), mãos e membros inferiores (10%). Invasão perpendicular à superfície, caracterizada por nódulo elevado, com diversos tons de pigmentação, ocorre após longo período de crescimento radial. Nessa fase podem ocorrer ulcerações, sangramento e formação de crostas.

Melanoma Nodular: representa de 15% a 30% dos casos, na quinta e sexta décadas de vida, atingindo preferencialmente o sexo masculino na proporção 2:1. Apresenta-se como lesão papulosa, elevada, de cor castanha, negra ou azulada, sendo frequentes a ulceração e o sangramento. Existe a variante amelanótica, com superfície crítematosa.

Melanoma Lentiginoso Acral: surge nas regiões palmoplantares, extremidades digitais, mucosas e semimucosas. É mais frequente em não brancos, sem predileção por sexo, na sétima década de vida. Nas extremidades digitais pode se apresentar como lesão tumoral acastanhada subungueal, melanoníquea estriada, fragmentação longitudinal da lâmina ungueal, além de paroníquia crônica e persistente.

Para identificação, utiliza-se o ABCDE do melanoma. (BOTTON, 2015):

Assimetria: a metade da mancha não coincide com a outra metade.

Borda: as bordas são irregulares, entalhadas ou dentadas.

Cor: quase sempre é desigual. Pode variar entre tons de preto, marrom e canela, podem ser vistas cores avermelhadas, azuladas, brancas e cinzas.

Diâmetro: o tamanho é maior que 6 milímetros.

Evolução: a mancha existente muda de tamanho, forma, cor, aparência, a textura pode mudar tornando-se dura, irregular ou escamosa, podendo coçar ou sangrar, mas geralmente não dói.

Outros sinais de alerta podem ser observados, como uma ferida que não cicatriza, expansão do pigmento de uma mancha na pele, vermelhidão ou inchaço, coceira, sensibilidade, dor ou mudança na superfície na pinta. Qualquer alteração na pele deve sempre ser informada ao médico. (BOTTON, 2015). O exame metuculoso da pele, a palpação de linfonodos regionais que drenam a área da lesão e uma anamnese minuciosa devem ser incluídos na avaliação. Uma amostra de biopsia excisional fornece informações sobre o tipo, o nível de invasão e a espessura da lesão. (FEITOSA, 2015).

O estadiamento clínico requer avaliação cuidadosa da lesão primária, pele adjacente, cadeias linfonodais e órgãos frequentemente envolvidos por metástases. (WAINSTEIN, 2004).

QUADRO 3 – Classificação TNM do melanoma cutâneo

Classificação T	Espessura	Ulceração
T1	≤1,0mm	a: sem ulceração b: com ulceração
T2	1,01 – 2,0mm	a: sem ulceração b: com ulceração
T3	2,01 – 4,0mm	a: sem ulceração b: com ulceração
T4	>4,0mm	a: sem ulceração b: com ulceração
Classificação N	Número de linfonodos acometidos	Massa linfonodal metastática
N1	1	a: micrometástases b: macrometástases
N2	2-3	a: micrometástases b: macrometástases
		c: metástases em trânsito e/ou satelitoses sem linfonodo metastático
N3	≥4 ou metástases em trânsito e/ou satelitoses com linfonodo metastático	
Classificação M	Local	DHL Sérico
M1a	Pele, subcutâneo ou linfonodos distantes	Normal
M1b	Metástase pulmonar	Normal
M1c	Outras metástases viscerais	Normal
	Qualquer metástase à distância	Elevado

Fonte: WAINSTEIN, 2014.

O tratamento baseia-se na ampliação das margens cirúrgicas e no acompanhamento da base linfática de drenagem. O tratamento cirúrgico possui duas etapas: na primeira, obtém-se o diagnóstico e delimita-se o microestadiamento do

tumor; a segunda realiza-se após a confirmação do melanoma, tendo como objetivo a retirada de algum tumor residual. O acompanhamento clínico dos linfonodos é indicado para tumores com espessura menos que 0,76mm, ao passo em que em tumores de maior espessura é preconizada a biópsia do linfonodo sentinela. O linfonodo sentinela é o primeiro linfonodo responsável pela drenagem linfática na área entre o tumor e primário e a cadeia linfática. (MATHEUS, 2015).

O melanoma tem a capacidade de metastizar localmente, por invasão direta, ou para os gânglios linfáticos regionais. (RIBEIRO, 2012). Cerca de 30% dos casos podem vir a desenvolver lesões metastáticas, frequentemente a nível pulmonar. O risco de recidiva depende do estágio da doença, com taxas de recidiva aos 10 anos, oscilando entre 10% para o estágio 1a (T1, N0, M0) e 65% no estágio 2c (T4, N0, M0). (ALMEIDA, 2016).

5 FUNÇÃO RENAL

As diversas funções exercidas pelos rins para a manutenção da homeostase, encontram-se: regulação do equilíbrio ácido-base por meio da excreção de ácidos e da regulação de tampões líquidos corporais; regulação da pressão arterial por meio da excreção de quantidades variáveis de sódio e água e da secreção de substâncias como a renina; regulação do equilíbrio de água e eletrólitos; excreção de produtos residuais do metabolismo e substâncias químicas estranhas.

Para a remoção de produtos residuais e substâncias químicas estranhas, o corpo humano conta com a participação do sistema linfático. O sistema linfático transporta fluidos dos espaços teciduais para o sangue; devido à alta permeabilidade dos capilares linfáticos, bactérias e outros pequenos materiais alterados do organismo penetram a linfa, que atravessa uma série de nodos ao longo do percurso até o sangue.

A eliminação dos resíduos e substâncias químicas se dá através da urina. Sua formação se dá através da filtração glomerular, evento onde 20% do plasma que entra no rim e alcança os capilares glomerulares são filtrados, atingindo o espaço de Bowmann; os 80% de plasma restante que não foram filtrados circulam ao longo dos capilares glomerulares, atingindo a arteríola eferente, se dirigindo posteriormente para a circulação sistêmica. (AIRES, 2012). Esse processo é fisiologicamente controlado, e mudanças na taxa de excreção urinária podem ocorrer por meio de mudanças na filtração glomerular, na reabsorção tubular ou na secreção tubular. (VAIDYA, 2018).

Algumas doenças ocasionam o aumento da espessura da membrana dos capilares glomerulares, o que diminui o coeficiente de filtração e, por consequência, a taxa de filtração glomerular; também podem trazer grave dano aos capilares e perda da área da superfície de filtração capilar. (VAIDYA, 2018; UBACK, 2016). Morfologicamente observa-se um espessamento uniforme e difuso da parede capilar glomerular, devido a depósitos densos e irregulares de substâncias entre a membrana basal e as células epiteliais subjacentes. Entre as doenças sistêmicas e agentes etiológicos associados à alteração da função renal, encontram-se os carcinomas de pulmão e de cólon e o melanoma. A possível influência do melanoma na função renal se daria ao depósito de melanina nas membranas, produzida em maior quantidade

devido ao grande número de melanócitos atípicos, característicos da neoplasia citada. (UBACK, 2016).

Durante o processo de lesão renal aguda, muitas alterações ocorrem em nível celular e molecular que, finalmente, levam a uma disfunção renal e lesão estrutural. Várias etiologias adquiridas na comunidade já foram identificadas induzindo a Insuficiência Renal Aguda, entre elas a isquemia, sepse e toxinas. (PERES, 2013).

A Insuficiência Renal Aguda necessita de avaliação clínica e laboratorial. Atualmente são utilizados para diagnóstico a Taxa de Filtração Glomerular (TFG) e a Creatinina Sérica (principais parâmetros laboratoriais utilizados), além da ureia, excreção fracionada de sódio e a proteinúria; como avaliação clínica, são avaliados os sinais e sintomas de uremia e a diminuição do débito urinário, tendo estes últimos pouca especificidade em detectar alterações no início de uma lesão renal. (PERES, 2013).

6 INSUFICIÊNCIA RENAL EM MELANOMA

O Melanoma, apesar de possuir características do melanócito diferenciado como a secreção de melanina, é um tumor com alto grau de anaplasia. Essa diferenciação celular traz uma particularidade incomum a essa massa neoplásica, a secreção contínua de diversas substâncias como catecolaminas, lipoproteínas, em alguns relatos chegando a produção de elementos comuns aos hepatócitos.

Essa atuação endócrina e de abundante secreção de melanina, promove uma quebra na homeostase e os rins comumente são os primeiros afetados. Em um relato de caso, clínicos descreveram uma paciente que apresentou Insuficiência Renal devido a depósito de imuno-complexos sem causa aparente, após seis meses o diagnóstico de melanoma metastático foi descrito, sendo a primeira manifestação a nefropatia. (FARIA, 2010).

Em modelos experimentais de melanoma em camundongos e em pacientes é comum a observação na cavidade abdominal de depósitos de melanina. Camundongos com esse tipo de melanose difusa é descrito desde os inícios da utilização desse modelos.

Apesar do conhecimento prático-clínico de que o Melanoma era capaz de secretar abundantemente a melanina e promover toxicidade relativa a isso, o primeiro relato publicado de Melanúria nesse tipo de enfermo só ocorreu em 2008, onde observou-se injúria tubular difusa, acúmulo de melanina nas células epiteliais tubulares, melanose difusa em um paciente com metástases generalizadas. (GAMBICHLER, 2008).

A melanina é uma proteína com peso molecular de 318,283 g/mol com a fórmula química básica $C_{18}H_{10}N_2O_4$. A sua presença na circulação é extremamente rara, sendo presente, descrita até o momento, em pacientes com Melanoma, geralmente associados a melanose difusa. O tamanho da proteína e a sua característica química apresenta características nefrotóxicas. Atualmente, devido à pouca discussão sobre a relevância dos depósitos de melanina, a presença deste composto na urina só é relatado quando a alteração na coloração dessa excreção.

7 OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar as funções hepáticas e, principalmente, renal de camundongos portadores de melanoma experimental, verificando a relação entre estas condições e a progressão da doença.

7.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a existência de perda de função renal em camundongos portadores de melanoma experimental.
- Avaliar a sobrecarga de melanina e outros fatores derivados do sobrenadante de melanoma na função renal dos camundongos submetidos a dose diárias de sobrenadante de cultura de melanoma B16F10.
- Avaliar a função hepática através das enzimas TGO e TGP após 10 e 20 dias de experimentação.

8 METODOLOGIA

Trata-se de uma pesquisa aplicada, descritiva e experimental, a qual é pautada nos preceitos éticos no uso de animais e teve seu projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Estudos e Pesquisas em Animais, sob o Processo CEUA n.º 048/2017 (ANEXO I).

8.1 CULTURA DE MELANOMA

As células de melanoma, da linhagem tumoral B16F10, foram gentilmente doadas pela pesquisadora do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) Dra. Andréia Hanada Otake. As condições de cultivo foram: meio RPMI 1680 suplementado com Soro Fetal Bovino a 10%. As células foram mantidas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C em frascos-garrafa de cultura de 125 cm².

8.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E CONTAGEM DE CÉLULAS PARA ESTIMATIVA DE MELANINA PELO MÉTODO DO AZUL TRIPAN

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de Azul de Tripán. A linhagem foi mantida, em condições de cultura. Sempre que necessário, ou quando foram realizadas as determinações estimativas de melanina, as células foram destacadas da placa por ação enzimática (Trypsina), coradas com azul de Tripán, e contadas em hemocítômetro.

8.3 DETERMINAÇÃO DA ESTIMATIVA DE MELANINA EM SOBRENADANTE DE CÉLULAS B16F10

As células B6F10 naturalmente secretam melanina, com uma variação cíclica pouco definida. Apenas como controle estimativo de melanina foi realizada uma avaliação de turbidimetria associada ao montante celular, para que houvesse um padrão de injeções nos camundongos. Em resumo, células B16F10 (1×10^6 / garrafa) foram semeadas e incubadas por 48h. No final desse período, o sobrenadante foi retirado e filtrado para a separação de possíveis células ou debris celulares presentes no meio. Em seguida foi realizada a contagem relativa de células. A densidade óptica do sobrenadante foi então medida a 490 nm. Essa etapa foi realizada na quantificação indireta de melanina e manutenção do padrão de aplicação nos animais desse grupo experimental.

8.4 MODELO ANIMAL

Foram utilizados 60 camundongos (*mus musculus*) procedentes do Biotério da UEPG, sem alteração genética.

A linhagem utilizada foi a C57BL/6, com idade de 60 dias e peso aproximado de 22g. A alimentação e o suporte hídrico dos animais seguiu os critérios de manutenção do Biotério, assim como a exaustão do ar. Os animais foram lotados em um número de 4 por gaiola.

8.5 IMPLANTE DAS CÉLULAS TUMORAIS

As células B16F10 (melanoma murino) foram cultivadas até confluência.

Para o implante das células, os camundongos C57BL/6 tiveram a região posterior do dorso tricotomizada. As células B16F10 (5×10^4) foram injetadas na parte posterior direita dos camundongos. Para este procedimento não há a necessidade de uso de anestésicos, pois não é um processo doloroso para o animal. Este tipo de tumor possui crescimento acelerado, sendo visível em menos de 10 dias após o implante.

Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais:

1. Grupo controle – *naive*.
2. Grupo de animais sem tumor, porém com injeções diárias de sobrenadante de cultura de melanoma contendo melanina.
3. Grupo de animais com tumor, implante de 5×10^4 de células B16F10.

8.6 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL

Dois períodos foram avaliados, após 10 dias e 20 dias de implante tumoral ou tratamento com o sobrenadante da cultura de melanoma. Findado esses períodos foi realizada a punção para coleta de sangue, punção cardíaca dos animais. O sangue foi centrifugação e então realizados os procedimentos de rotina para a quantificação de Creatinina Sérica, Nitrogênio Ureico Sanguíneo, enzimas hepáticas e Interleucina-18.

8.7 DETERMINAÇÃO DE ENZIMAS HEPÁTICAS

A alteração do metabolismo sistêmico devido a presença do melanoma, que é capaz de secretar inúmeras substâncias como um órgão endócrino e a abundante secreção de melanina, e, sendo o fígado produtor de inúmeras proteínas capazes de alterar as características sanguíneas, avaliamos duas enzimas associadas à agressão hepática, a transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), a transaminase glutâmico pirúvica (TGP).

O método para avaliação da atividade das enzimas hepáticas TGO e TGP consiste no consumo de NADH pelo produto formado a adição de cetoglutarato as enzimas.

As mensurações bioquímicas foram realizadas no Laboratório Escola da UEPG, com participação do Prof. Dr. Bruno Ribeiro Cruz.

8.8 AVALIAÇÃO DE IL-18 PELO MÉTODO DE ELISA

Princípios do Teste:

Anticorpo de IL-18 anti-rato esta é adsorvido nos 96 micropoços. A IL-18 presente na amostra ou padrão liga-se a anticorpos adsorvidos nos micropoços. Adiciona-se um anticorpo anti-IL18 conjugado com biotina e liga-se a IL18 capturada pelo primeiro anticorpo.

Após incubação, o anticorpo anti-IL-18 conjugado com biotina não ligado é removido durante a lavagem. A estreptavidina é adicionada e liga-se ao anticorpo IL-18 conjugado com biotina.

Após a incubação, a Streptavidin-HRP não ligada é removida durante uma etapa de lavagem e a solução de substrato reativa com HRP é adicionada aos poços

A cor formada é proporcional à quantidade de IL-18 presente na amostra ou padrão. A reação é terminada com a adição de ácido e a absorvância foi medida a 450 nm. Foi preparada uma curva padrão a partir de 7 diluições padrão de IL18 e determinada a concentração da amostra de IL-18.

Em nosso experimento, o soro dos animais após 20 dias do implante tumoral ou tratamento peritoneal com sobrenadante de cultura de melanoma foram utilizados.

O exame seguiu as descrições do kit: Mouse IL-18 Platinum ELISA BMS618/3 / BMS618/3TEN da eBioscience.

8.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

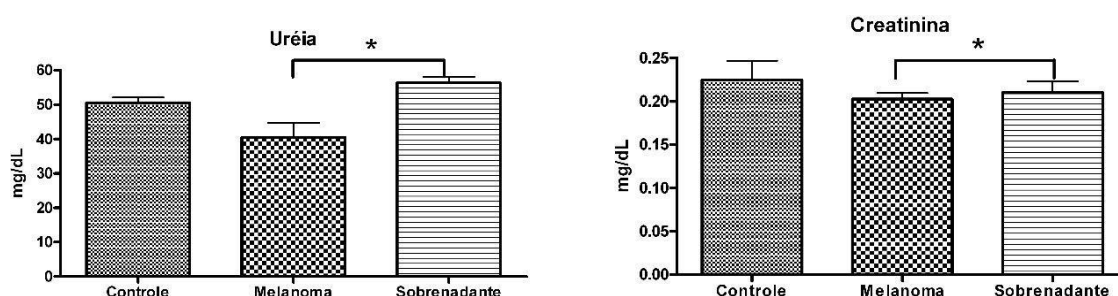
Para os ensaios celulares com os diferentes tratamentos será utilizado o teste ANOVA. Ambas as análises estatísticas serão desenvolvidas no software GraphPad (Prism 4.0), serão considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

9 RESULTADOS

Após o implante tumoral e o tratamento diário com sobrenadante de cultura de melanoma, tivemos dois períodos experimentais, após 10 dias e 20 dias.

A figura 1 mostra os resultados encontrados na avaliação sérica de Uréia e Creatinina. Levando em consideração o valor de referência como o grupo controle e uma avaliação comparativa entre os dois grupos experimentais, podemos constatar que houve diferença estatística entre os grupos Melanoma e sobrenadante após 10 dias do experimento.

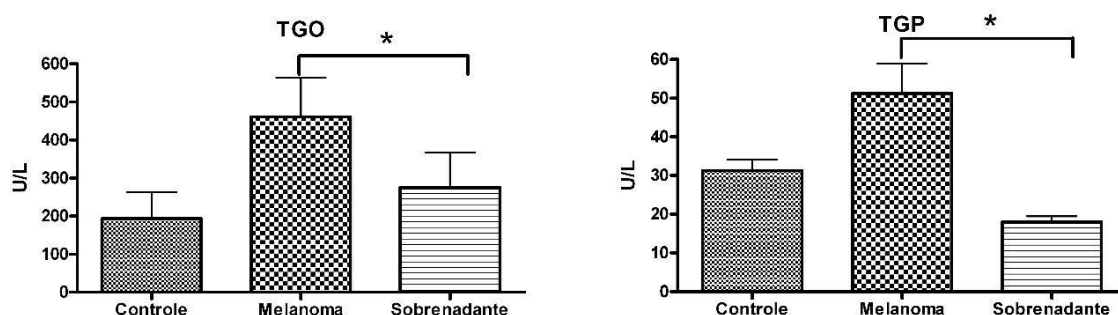
FIGURA 1 - Avaliação bioquímica de Uréia (A) e Creatinina (B) de camundongos C57BL/6 submetidos a implante de melanoma B16F10 ou dose diárias de sobrenadante de cultura de melanoma B16F10, após 10 dias de experimentação. * $p < 0,05$.



Fonte: o Autor

As enzimas hepáticas TGO e TGP também foram avaliadas após 10 dias do implante tumoral ou doses diárias do sobrenadante. A figura 2 mostra os resultados da avaliação bioquímica dessas enzimas.

FIGURA 2 - Avaliação bioquímica de TGO (A) e TGP (B) de camundongos C57BL/6 submetidos a implante de melanoma B16F10 ou dose diárias de sobrenadante de cultura de melanoma B16F10, após 10 dias de experimentação. * $p < 0,05$.

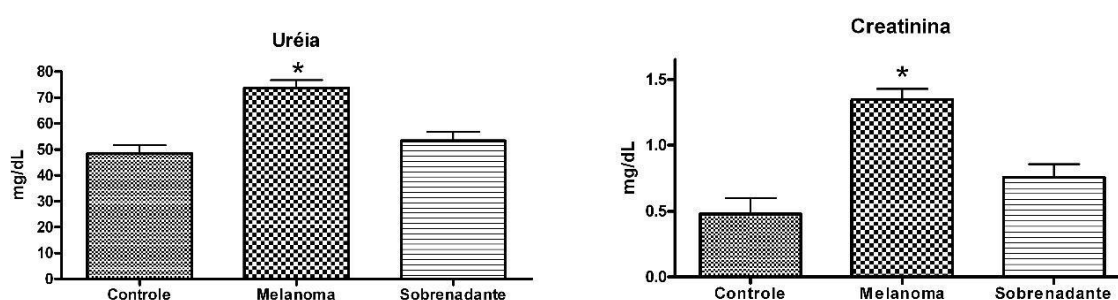


Fonte: o Autor

Pode-se observar que após dez dias o tumor alterou significativamente os valores de TGO e TGP dos animais quando comparado ao grupo que recebeu injeções diárias de sobrenadante por 10 dia.

O segundo período avaliado foi após vinte dias de experimentação. A figura 3 mostra os valores séricos de Uréia e Creatinina desses animais. Nota-se uma maior presença desses marcadores nos animais portadores de melanoma.

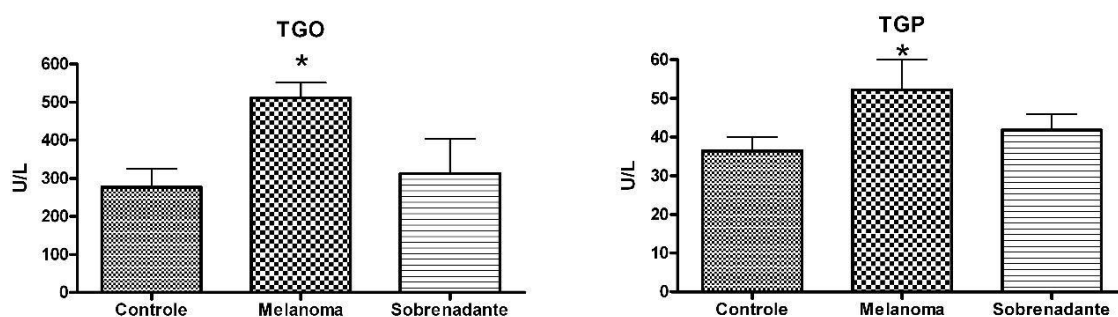
FIGURA 3 - Avaliação bioquímica de Uréia (A) e Creatinina (B) de camundongos C57BL/6 submetidos a implante de melanoma B16F10 ou dose diárias de sobrenadante de cultura de melanoma B16F10, após 20 dias de experimentação. * $p < 0,05$



Fonte: o Autor.

A figura 4 expressa os resultados bioquímicos das enzimas hepáticas TGO e TGP dos camundongos após vinte dias de implante do melanoma ou injeções diárias de sobrenadante de cultura de melanoma. O tumor induziu um aumento nessas enzimas configurando uma maior atividade hepática.

FIGURA 4 - Avaliação bioquímica de TGO (A) e TGP (B) de camundongos C57BL/6 submetidos a implante de melanoma B16F10 ou dose diárias de sobrenadante de cultura de melanoma B16F10, após 20 dias de experimentação. * $p < 0,05$.

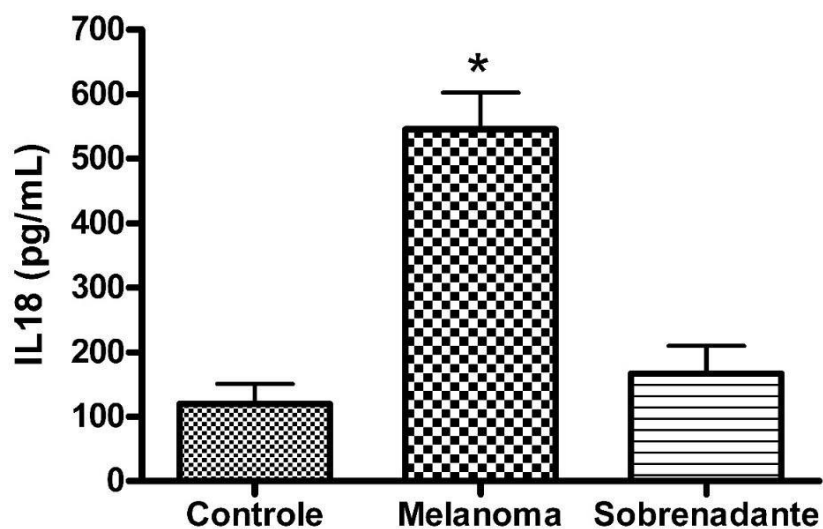


Fonte: o Autor.

Recentemente a Interleucina-18 vem sendo utilizada como possível marcador de Insuficiência renal aguda. A figura 5 mostra os valores de IL-18 dos camundongos

após 20 dias de experimento. Os animais portadores do Melanoma, após 20 dias apresentaram um valor significativamente maior dessa substância em relação aos demais grupos.

FIGURA 5 - Quantificação sérica de Interleucina-18 em camundongos sem tratamento, portadores de melanoma (20 dias após a injeção de células 5×10^4 células B16F10) e tratados com sobrenadante de cultura de B16F10 por vinte dias. * $p < 0,05$



Fonte: o Autor.

10 DISCUSSÃO

O aumento da concentração de IL-18 circulante, na maioria dos tumores é de ordem natural, pois trata-se de uma citocina pró-inflamatória, porém o seu aumento também está associado a Insuficiência Renal e Necrose Glomerular Aguda, sendo um possível marcador do início dessas complicações. (HUTTON, 2018).

Em nosso estudo observamos um aumento significativo da IL-18 circulante nos animais portadores de Melanoma, após 20 dias da injeção das células precursoras desse tumor. A complexidade e a interação da massa neoplásica foi superior, em efeito, quando comparada com o tratamento diário do sobrenadante de cultura de melanoma, o que leva a hipótese de que as células quando incorporadas ao organismo possuem uma atividade sistêmica maior.

A quantificação da creatinina sérica é um importante marcador da atividade renal e sua relação a sua função. A creatinina é filtrada no glomérulo e não é reabsorvida ou metabolizada pelo túbulo, sendo assim um marcador importante da taxa de filtração glomerular. No entanto, secreção tubular significativa de creatinina ocorre no túbulo proximal. A proporção de depuração de creatinina tubular é de aproximadamente 20 a 30%, mas varia inter-individualmente. (LEVEY, 1990). Como a depuração da creatinina é igual à taxa de filtração glomerular mais a secreção tubular, um aumento agudo da creatinina sérica pode refletir um declínio da taxa de filtração glomerular e / ou uma inibição da secreção tubular.

Nessa experimentação observamos que após dez dias do início dos ensaios, houve diferença significativa entre os grupos melanoma e sobrenadante, sendo o grupo sem tumor tratado com um valor maior desse marcador. Essa diferença pode estar relacionada a quantidade de metabólitos celulares provenientes no meio e o pH ácido, que é capaz de aumentar a atividade renal. (HUBBER, 1990) Porém quando os grupos foram comparados em relação ao controle não houve diferença significativa.

A mesma avaliação foi realizada vinte dias após o início do estudo. Após esse período, os animais acometidos pelo tumor apresentaram um valor aumentado de creatinina sérica em relação aos outros grupos. A explicação mais provável é que, após vinte dias o tumor já está bem consolidado, com um tamanho bem aparente, com o seu tecido distribuído com o do hospedeiro, assim a ampliação da secreção

metabólitos, a acidificação do pH e outros eventos bioquímicos associados alteram a produção e secreção desse marcador.

Paralelamente a avaliação da creatinina sérica, a uréia circulante, que é um exame complementar a creatinina, também foi avaliada. No primeiro período avaliado o tratamento com o sobrenadante de cultura de melanoma, assim como a dosagem de creatinina, apresentaram um maior valor em relação ao grupo portador de melanoma. O aumento pode ser justificado pela presença de proteínas em abundância no sobrenadante, e, as injeções diárias no peritônio, foram, captadas pela circulação linfática e posteriormente filtradas nos rins. Novamente, assim como a avaliação da creatinina nesse mesmo período, não houve significância em relação ao grupo controle.

Passados os vinte dias e, com a nítida e visual progressão tumoral, os valores da ureia estavam maiores nesse grupo experimental. Valores altos de ureia são relacionados a infecções, alterações hepáticas, excesso de proteína na dieta e, nesse caso, câncer. (DALTON, 2011).

O metabolismo dos roedores, e, em especial do camundongo é extremamente acelerado quando comparado com o ser humano. Assim, o fígado, sendo o principal órgão metabólico, tem um papel fundamental na manutenção da homeostasia. Tumores anaplásicos com crescimento rápido despejam continuamente na circulação substâncias diversas e, subprodutos da fragmentação celular originada da progressão desordenada. Os rins e o fígado são os principais atingidos com o excesso de metabólitos tumorais. A avaliação da funcionalidade hepática é um fator preditivo da gravidade de qualquer doença grave e as consequências de uma lesão nesse órgão altera o funcionamento homeostático generalizado. (VAN BEZOOIJEN, 1984).

Em nosso modelo experimental, podemos observar que nos dois períodos avaliados, a sobrecarga de sobrenadante de cultura de células de melanoma não foram capazes de alterar as enzimas hepáticas estudadas. Os animais que receberam a injeção de células de melanoma no dorso, apresentaram alteração do metabolismo hepático já nos primeiros dez dias, persistindo após 20 dias. Em estudos anteriores, esse perfil metabólico aparentemente mais ativo também foi observado. (FAVERO, 2010).

O acompanhamento de pacientes portadores de melanoma e outros tipos de tumores, geralmente, focam especificamente na massa neoplásica. Esse estudo aborda a importância da avaliação sistêmica e um olhar diferenciado tanto ao fígado,

como aos rins dos portadores desses tipos de malignidade. Com o avanço das tecnologias de quantificações bioquímicas, e de terapêutica órgão á órgão, acredita-se que o cuidado diferenciado com os diversos tipos de clínicos pode melhorar e ampliar a sobrevida desses enfermos.

11 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a presença do tumor e o seu crescimento influenciam diretamente nas funções hepáticas e renais dos camundongos portadores de melanoma.

Especificamente observou-se: a) há uma perda da função renal nos camundongos portadores de melanoma experimental avaliados pelos marcadores urinários; b) a sobrecarga de melanina e outros fatores derivados do sobrenadante de melanoma não alterou a função renal dos camundongos submetidos à dose diárias de sobrenadante de cultura de melanoma B16F10; c) as enzimas hepáticas, TGO e TGP, estão aumentadas após 10 e 20 dias de experimentação apenas nos animais portadores de melanoma.

REFERÊNCIAS

- AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- ALMEIDA, B. B.; LOPES, M. G. Recidiva tardia de melanoma cutâneo: relato de caso. **Revista Portuguesa de Medicina Geral e Família**, v. 3, p. 410-414, 2016.
- BASTOS, M. G.; KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce, encaminhamento imediato e abordagem interdisciplinar estruturada para melhoria do desfecho em pacientes ainda não submetidos à diálise. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 33, n. 1, p. 93-108, 2011.
- BOTTON, R. C. P. **Medicamentos utilizados no tratamento do câncer de tipo melanoma: uma revisão de literatura**. 2015. 27f. Tese (especialização em Oncologia) – curso de pós-graduação em Oncologia, Universidade Regional do Noroeste do Rio Grande do Sul, Ijuí, 2015.
- INCA. **A situação do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2016.
- _____. **Fisiopatologia do Câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2002.
- _____. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro, INCA, 2011.
- CASTILHO, I. G. Fotoexposição e fatores de risco para câncer de pele: uma avaliação de hábitos e conhecimentos entre estudantes universitários. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 2, p. 173-178, 2010.
- CANNAVÒ, S. P. et al. The role of oxidative stress in the biology of melanoma: A systematic review. **Pathology - Research and Practice**, s/l, v. 215, ed. 1, p. 21-28, 2019. DOI 10.1016 / j.prp.2018.11.020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S034403381831392X?via%3Di> hub. Acesso em: 6 mar. 2019.
- DALTON, R. N. **Creatinina sérica e taxa de filtração glomerular: percepção e realidade**. Bras Patol Med Lab, v.47, n. 1, fev. 2011.
- FAVERO, G. M.; OLIVEIRA, K. A.; BOHATCH, M. S.; BORELLI, P.; BARROS, F. E.; MARIA, D. A. ; BYDLOWSKI, S. P. **Simvastatin impairs murine melanoma growth**. Lipids in health and disease. v. 9, p. 142, 2010.
- FEITOSA, T. V. **Câncer de pele: análise dos fatores fisiopatológicos, psíquicos e ambientais, com enfoque assistencial**. 2015. 18f. Tese (graduação em Enfermagem) – curso de Bacharelado em Enfermagem, Instituto de Ensino Superior do Maranhão, Imperatriz, 2015.
- FERNANDES, N. C. et al . Melanoma cutâneo: estudo prospectivo de 65 casos. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro , v. 80, n. 1, p. 25-34, fev. 2005 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962005000100004&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 03 mar. 2019. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962005000100004>
- FERREIRA, F. R. Fatores de risco para o câncer de pele não melanoma em Taubaté, SP: um estudo caso controle. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 4, p. 431-457, 2011.
- FIGUEIREDO, L. C. Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares

no melanoma cutâneo. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 3, p. 179-183, 2003.

FREITAS, J. et al. Antioxidant role on the protection of melanocytes against visible light-induced photodamage. **Free Radical Biology and Medicine**, s/l, ano 2019, v. 131, p. 399-407, 1 fev. 2019. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.028. Epub 2018 24 de dezembro. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584918310682?via%3Di> hub. Acesso em: 6 mar. 2019.

GATO, M. I. R.; Manejo de pacientes com melanoma avançado em uso de ipilimumabe. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v. 9, p. 19-31, 2013.

GAMBICHLER, T. et al. Acute Kidney Injury in a Patient with Melanuria, Diffuse Melanosis, and Metastatic Malignant Melanoma. **American Journal of Clinical Dermatology**, s/l, v. 9, 10 set. 2008. DOI <https://doi.org/10.2165/00128071-200809040-00007>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.2165%2F00128071-200809040-00007#citeas>. Acesso em: 6 mar. 2019.

GUERRA, M. R. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

HALL, J. E.; VAIDYA, A. C. **Fundamentos de fisiologia**. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

HUBER, K.; BREVES, G. Influence of dietary phosphorus depletion on central pathways of intermediary metabolism in rats. **Archives of Animal Nutrition**, [s. l.], v. 52, ed. 4, 30 mar. 1999. DOI <https://doi.org/10.1080/17450399909386169>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17450399909386169>. Acesso em: 6 mar. 2019.

HUTTON, H. L.; ALIKHAN, M. A.; KITCHING, A. R. Inflammasomes in the Kidney. **Inflammasomes: Clinical and Therapeutic Implications**, s/l, p. 177-210, 5 set. 2018. DOI doi: 10.1007 / 978-3-319-89390-7_8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30536172/#affiliation-2>. Acesso em: 6 mar. 2019.

KUMAY, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Patologia Básica**: Robbins. 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

LEVEY, A. S. Measurement of renal function in chronic renal disease. **Kidney International**, s/l, v. 38, p. 167-184, 1990. DOI <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0085253815349449>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0085253815349449>. Acesso em: 6 mar. 2019.

MATHEUS, L. G. M.; VERRI, B. H. M. A. Aspectos epidemiológicos do melanoma cutâneo. **Revista Ciência & Estudos Acadêmicos de Medicina**, s/l, n. 3, p. 10-24, 2015.

OLIVEIRA, M. M. Estimativa de pessoas com diagnóstico de câncer no Brasil: dados da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 2, p. 146-157, 2015.

PEREIRA, S. Neoplasias múltiplas de pele em indivíduos com menos de 40 anos em

Goiânia, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, p. 1-8, 2015.

PERES, L. A. B. Biomarcadores da injúria renal aguda. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, s/l, v. 35, n. 3, p. 229-236, 2013.

POPIM, R. C. Câncer de pele: uso de medidas preventivas e perfil demográfico de um grupo de risco na cidade de Botucatu. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 4, p. 1331-1336, 2008.

RIBEIRO, R. Invaginação intestinal por metástases de melanoma – a propósito de um caso clínico. **Revista Portuguesa de Cirurgia**, v. 23, p. 57-60, 2012.

SÁNCHEZ, C. Conociendo e comprendiendo a célula cancerosa: fisiopatología del câncer. **Revista Médica Universidade de Condes**, v. 24, n.4, p. 553-562, 2013.

SONDA, L. C. **Fatores de risco para melanoma: uma revisão integrativa**. 2011. 17f. Tese (graduação em Enfermagem) – curso de Enfermagem, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, 2011.

SOUZA, R. J. S. P. Estimativa do custo do tratamento do câncer de pele tipo não-melanoma no estado de São Paulo/Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 237-243, 2009.

UBACK, L. et al. Trato urinário e rim. **Patologia Sistêmica | Atlas Virtual de Patologia**, [s/l], 2012. Disponível em: www.disciplinas.famerp.br/patologia. Acesso em: 6 mar. 2019.

VAIDYA, S. R.; AEDDULA, N. R. Chronic Renal Failure. **StatPearls [Internet]**, [s/l], 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535404/>. Acesso em: 6 mar. 2019.

VAN BEZOOIJEN, C. F. A. Influence of age-related changes in rodent liver morphology and physiology on drug metabolism: A review. **Mechanisms of Ageing and Development**, [s/l], v. 25, p. 1-22, 1984. DOI [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(84\)90126-X](https://doi.org/10.1016/0047-6374(84)90126-X). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/004763748490126X>. Acesso em: 6 mar. 2019.

WAINSTEIN, A. J. A.; BELFORT, F. A. Conduta para o melanoma cutâneo. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia**, v. 31, n. 3, p. 204-214, 2014.

ZINK, B. S. Câncer de pele: a importância de seu diagnóstico, tratamento e prevenção. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v.13, n. 5, p. 76-83, 2014.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL****CARTA DE APROVAÇÃO****Processo CEUA – 048/2017****Protocolo UEPG – 12469/2017****Título –** “Projeto de pesquisa Avaliação da função renal de camundongos portadores de melanoma experimental”**Interessado:** Bruno Campos Fontoura (drfontoura@hotmail.com) e Giovani Marino Fávero (gmfavero@yahoo.com.br)**Data de Entrada – 18/07/2017****Resultado:** Aprovado**Data/Prazo – 17/11/2017 a 17/11/2019****Considerações**

Prezado Mestrando Bruno Campos Fontoura e Professor Giovani (PPG C. Farmacêuticas):

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela aprovação da autorizada a utilização de 60 camundongos isogênicos Wistar isogênicos, Linhagem C57BL/6, Idade de 60 dias e com 22 gramas.

Ponta Grossa, 17 de novembro de 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
CEUA - Comissão de Estudos e Pesquisas em Animais
Dra. Dionízia Xavier Scomparin
Coordenadora

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROPEP
Fone: (042) 3220-3264