

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Amanda Mota Lacerda

Efeitos do resveratrol na progressão do modelo tumoral murino singênico de melanoma cutâneo em camundongos C57BL/6

Montes Claros
2020

Amanda Mota Lacerda

Efeitos do resveratrol na progressão do modelo tumoral murino singênico de melanoma cutâneo em camundongos C57BL/6

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros- Unimontes, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Mecanismos e aspectos clínicos das doenças.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Maurício Batista de Paula

Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Bozzi

Montes Claros
2020

L131e Lacerda, Amanda Mota.
Efeitos do resveratrol na progressão do modelo tumoral murino singênico de melanoma cutâneo em camundongos C57BL/6 [manuscrito] / Amanda Mota Lacerda. – Montes Claros, 2020.
55 f. : il.

Inclui Bibliografia.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/PPGCS, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Maurício Batista de Paula.
Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Bozzi.

1. Resveratrol. 2. Melanoma cutâneo. 3. Modelo tumoral murino singênico. 4. Terapêutica anti-câncer. I. Paula, Alfredo Maurício Batista de. II. Bozzi, Adriana. III. Universidade Estadual de Montes Claros. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS-UNIMONTES

Reitor: Antônio Alvimar Souza

Vice-reitor: Ilva Ruas Abreu

Pró-reitora de Pesquisa: Clarice Diniz Alvarenga Corsato

Coordenadoria de Acompanhamento de Projetos: Virgílio Mesquita Gomes

Coordenadoria de Iniciação Científica: Sônia Ribeiro Arrudas

Coordenadoria de Inovação Tecnológica: Dario Alves de Oliveira

Pró-reitor de Pós-graduação: André Luiz Sena Guimarães

Coordenadoria de Pós-graduação Lato-sensu: Marcos Flávio Silveira Vasconcelos D' Angelo

Coordenadoria de Pós-graduação Stricto-sensu: Marcelo Perim Baldo

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenador: Alfredo Maurício Batista de Paula

Coordenadora Adjunta: Marise Fagundes Silveira



MESTRANDO(A): AMANDA MOTA LACERDA

TÍTULO DO TRABALHO: "Efeito do resveratrol sobre a progressão do modelo tumoral murino singênico de Melanoma cutâneo em camundongos C57BL/6"

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças

LINHA DE PESQUISA: Etiopatologia e Fisiologia das Doenças

BANCA (TITULARES)

PROF. DR. ALFREDO MAURÍCIO BATISTA DE PAULA / ORIENTADOR

PROFª. DRª. ADRIANA BOZZI

PROF. DR. JOÃO MARCUS OLIVEIRA ANDRADE

PROF. DR. OTÁVIO CARDOSO FILHO

ASSINATURAS

BANCA (SUPLENTES)

PROFª. DRª. LUCYANA CONCEIÇÃO FARIAS

PROFª. DRª. LUDMILLA REGINA DE SOUZA DAVID

ASSINATURAS

APROVADA

REPROVADA

Hospital Universitário Clemente Farias – HUCF

<http://www.unimontes.br> / ppgcs@unimontes.br

Telefone: (0xx38) 3224-8372 / Fax: (0xx38) 3224-8372

Av. Cula Mangabeira, 562, Santo Expedito, Montes Claros – MG, Brasil – Cep: 39401-001

Dedico este trabalho aos pilares da minha vida: a Deus e Nossa Senhora, por sempre me iluminarem e me manterem firme para conseguir contornar os obstáculos da jornada. Aos meus pais, por serem fonte de sabedoria e por me proporcionarem o apoio incondicional de sempre. Aos meus irmãos, pela amizade, alegrias e descontrações diárias da vida.

Amo todos vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora, onipresentes em minha vida, pelo dom da persistência para lidar com todos os desafios desse processo, e por me abençoarem com momentos de conquistas.

Aos meus pais, Cezar e Luciene, meus maiores exemplos, de vida e empenho. Por não medirem esforços para que eu pudesse concluir mais esse ciclo, obrigada pela dedicação de sempre, sou e serei eternamente grata!

Aos meus irmãos, Rodrigo e Fernanda, pelo companheirismo ao longo desses anos.

Agradeço a toda minha família, pelo amor, convívio e por sempre vibrarem comigo em minhas conquistas!

Ao professor Alfredo, meu orientador, pela oportunidade, confiança, e por ter me possibilitado a conclusão de mais uma etapa. Obrigada pelo encorajamento diário; ensinando que só faz-se pesquisa quando há persistência e superação. Minha gratidão!

Agradeço à Adriana Bozzi, minha coorientadora, pela colaboração, gentileza, e por ter me proporcionado vivenciar ótimas experiências no laboratório do René Rachou. Também a Vitor, meus agradecimentos, pelos ensinamentos nos experimentos, por toda prestatividade e pelas incontáveis consultorias EAD.

À Ludmilla (Flor), pela amizade, generosidade, paciência, e principalmente, por ter contribuído para o meu crescimento científico e pessoal, você é especial para mim.

A todos integrantes do grupo NUPEMOC que colaboraram de maneira direta ou indiretamente para execução deste projeto. Pesquisa faz-se em equipe! Obrigada pela amizade e cooperação.

Em especial, agradeço a Amanda Rodrigues e Valéria, que primeiro me acolheram no laboratório, pela disposição em me ensinarem e ajudarem nos experimentos de bancada. Obrigada também, pela amizade e pelos diversos momentos que compartilhamos juntas, sejam eles difíceis e/ou alegres, afinal, somos as meninas superpoderosas!

E a João Lucas, carinhosamente, Big! Agradeço pelo convívio, ajuda mútua, por dividir comigo tantos experimentos. Este último ano, realmente, foi marcado por momentos difíceis, de vitória e acima de tudo, de superação, juntos pudemos dividir o fardo durante esta jornada.

A todos os colegas do laboratório de pesquisa em saúde-Lab, agradeço pelas risadas, momentos de descontrações, e por termos compartilhado tantos conhecimentos de experiência científica. Em especial, agradeço a Victor, pelo apoio, pelos estudos, por dividir comigo sua inteligência e por me socorrer em tantas dúvidas, você é sucesso, amigo! Agradeço também à Mari e Sara, pela disposição em nos auxiliar sempre.

Às funcionárias do programa de pós-graduação, Du Carmo e Tereza pela presteza, colaboração e auxílio com todas as documentações necessárias durante esses anos.

A todos os professores membros da banca, pela disponibilidade, solicitude e atenção!

Agradeço aos auxílios financeiros recebidos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Muito Obrigada a todos!

RESUMO

Câncer é um processo patológico marcado pela autonomia da proliferação celular, aquisição de fenótipos indiferenciados, capacidade de invadir tecidos locais e à distância (metástases) e resistência à ativação de mecanismos de morte celular. O melanoma cutâneo (MC) representa um câncer originado em melanócitos da pele, sendo muito agressivo devido à sua precoce capacidade metastática. Clinicamente, o MC exhibe poucas alternativas terapêuticas, especialmente naqueles casos onde a doença se encontra em estágios avançados, resultando em elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Os polifenóis encontrados na dieta podem afetar e modular numerosos processos e diversas vias bioquímicas compreendidas na carcinogênese, sendo o Resveratrol (Resv) uma fitoalexina natural com grande potencial e perspectivas significativas. O presente estudo avaliou os efeitos da administração oral de Resv na progressão do modelo tumoral murino singênico de melanoma cutâneo (MTMSMC) e na sobrevida relacionada ao câncer em camundongos C57BL/6. O desenho do estudo *in vivo* foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação e Bem-estar Animal (CEEBEA/Unimontes/Nº: 131/2017). A pesquisa compreendeu em duas etapas distintas, na primeira, avaliou a progressão tumoral e na segunda, a sobrevida dos camundongos. A fim de estabelecer o MTMSMC, camundongos fêmeas C57BL/6 (n=60) foram inoculados na região subcutânea dorsal com 5×10^5 da linhagem celular de MC murino, B16-F10. Para análise da progressão tumoral, os animais foram divididos em três grupos de estudo: Controle; Resv200 e Resv400. Após o surgimento do tumor clinicamente palpável, os camundongos foram acompanhados diariamente para mensuração do volume tumoral com auxílio do paquímetro digital (mm^3). A fim de robustecer estes dados, empregou-se também, a avaliação do volume tumoral (mL), por meio de um aparelho de ecografia Doppler nos dias 5, 8 e 11 do período experimental. Os animais foram tratados por um período de 11 dias, e a eutanásia ocorreu no décimo segundo dia de acompanhamento. Para análise da sobrevida relacionada ao câncer, os animais também foram submetidos ao MTMSMC, sendo a divisão dos grupos, idêntica a utilizada para avaliação do efeito na progressão do tumor. Os camundongos foram tratados e acompanhados quanto ao registro de óbitos diariamente, até ocorrer o último óbito de cada grupo. Os resultados mostraram que animais tratados com Resv 200mg/Kg e 400mg/Kg exibiram redução significativa do volume ($p < 0.001$) e do peso (g) tumoral ($p < 0.05$ e $p < 0.01$ respectivamente) de forma dose-dependente. Adicionalmente, observou-se um benefício do Resv na sobrevida relacionada ao câncer dos animais tratados comparado ao grupo

controle sem tratamento ($p = 0.038$ e $p = 0.040$, respectivamente). Portanto, os resultados deste estudo permitiram concluir que a administração de Resv reduziu o volume e peso tumoral, com ocorrência no aumento das taxas de sobrevida dos animais C56BL/6 que foram induzidos ao MTMSMC. Além disso, nossos dados apoiam o uso da substância Resv como terapia adjuvante no manejo do câncer.

Palavras-chave: Resveratrol. melanoma cutâneo. modelo tumoral murino singênico. terapêutica anti-cancer.

ABSTRACT

Cancer is a pathological process marked by autonomy of cell proliferation, acquisition of undifferentiated phenotypes, ability to invade local and distant tissues (metastases) and resistance to the activation of mechanisms of cell death. Cutaneous melanoma (CM) represents a cancer originated in skin melanocytes, being very aggressive due to its early metastatic capacity. Clinically, CM exhibits few therapeutic alternatives, especially in cases where the disease is in advanced stages, resulting in high rates of morbidity and mortality. The polyphenols found in the diet can affect and modulate numerous processes and several biochemical pathways included in carcinogenesis, with Resveratrol (Resv) being a natural phytoalexin with great potential and significant perspectives. The present study evaluated the effects of oral administration of Resv on the progression of the cutaneous murine tumor model of cutaneous melanoma (SMCMTM) and on cancer-related survival in C57BL/6 mice. The design of the in vivo study was approved by the Ethics Committee on Experimentation and Animal Welfare (CEEBEA/Unimontes/N^o:131/2017). The research comprised two distinct stages, in the first, it evaluated the tumor progression and in the second, the survival of the mice. In order to establish the SMCMTM, female C57BL/6 mice (n=60) were inoculated in the dorsal subcutaneous region with 5×10^5 of the murine MC cell line, B16-F10. For analysis of tumor progression, the animals were divided into three study groups: Control; Resv200 and Resv400. After the appearance of a clinically palpable tumor, the mice were monitored daily to measure the tumor volume with the aid of a digital caliper (mm^3). In order to strengthen these data, it was also used to evaluate the tumor volume (mL), using a Doppler ultrasound device on days 5, 8 and 11 of the experimental period. The animals were treated for a period of 11 days, and euthanasia occurred on the twelfth day of follow-up. For the analysis of cancer-related survival, the animals were also submitted to SMCMTM, the division of the groups being identical to that used to assess the effect on tumor progression. The mice were treated and monitored for the daily death record, until the last death of each group occurred. The results showed that animals treated with Resv 200mg/Kg and 400mg/Kg exhibited a significant reduction in tumor volume ($p < 0.001$) and weight (g) ($p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively). In addition, there was a benefit of Resv in cancer-related survival of treated animals compared to the control group without treatment ($p = 0.038$ and $p = 0.040$, respectively). Therefore, the results of this study allowed us to conclude that the administration of Resv reduced the tumor volume and weight, occurring in the increased

survival rates of the C56BL/6 animals that were induced to SMCMTM. In addition, our data support the use of the substance Resv as an adjunct therapy in cancer management.

Keywords: Resveratrol. cutaneous melanoma. murine tumor model. anti-cancer therapy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 Melanoma cutâneo.....	16
2.2 Resveratrol.....	20
3 OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo Geral	22
3.2 Objetivos Específicos	22
4 PRODUTO CIENTÍFICO	23
4.1 Artigo científico: <i>Resveratrol reduces tumor growth and improves survival in C57BL/6 mice submitted to the syngeneic murine cutaneous melanoma tumor model</i>	23
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
REFERÊNCIAS	48
ANEXOS.....	54
ANEXO A- Normas do periódico Phytomedicine	54
ANEXO B- Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa.....	55

1 INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo (MC) é uma doença multifatorial e origina-se da transformação maligna dos melanócitos – células que sintetizam o pigmento endógeno conhecido como melanina (1). Apesar de constituir 4% dos tipos de cânceres, é o mais agressivo, com poucas alternativas terapêuticas nos estágios avançados da doença e elevadas taxas de mortalidade (2-4). A incidência dessa neoplasia tem aumentado consideravelmente, representando um problema substancial de saúde pública. No Brasil, o número de casos novos de câncer de pele melanoma esperados, para cada ano do triênio 2020-2022, será de 4.200 em homens e de 4.250 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 4,03 casos novos a cada 100 mil homens e 3,94 para cada 100 mil mulheres (5). No entanto, a identificação e prevenção de fatores de risco são necessárias para minimizar essa tendência crescente (6-8).

Dentre os fatores que podem contribuir para a ocorrência do MC, destacam-se predisposição constitucional (características genéticas e epigenéticas), cor da pele (leocodérmico), presença de um grande número de nevos melanocíticos, aumento da idade, exposição a fatores ambientais, exposição intensa de radiação solar sem proteção (raios UV) e alterações genéticas do hospedeiro- história familiar de melanoma (9-13). Após confirmação diagnóstica do MC, sua avaliação posterior é necessária no processo de estadiamento, visto que o MC pode comprometer locais à distância da lesão primária, as chamadas metástases. O estadiamento representa grande impacto no prognóstico da doença e no planejamento da conduta terapêutica, propiciando aumento na sobrevida e qualidade de vida dos pacientes (14,15), podendo ser realizado segundo os protocolos do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), que segue a classificação: T - tumor primário, N – comprometimento de linfonodo regional e M - metástases à distância – TNM (16-19).

Em relação ao tratamento, as principais opções para pacientes com MC inclui a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia, terapia alvo e a imunoterapia, podendo haver uma combinação desses tratamentos (20). Quando diagnosticado em fase precoce da doença, o MC apresenta bom prognóstico e pode ser tratado com sucesso por meio de excisão cirúrgica. Os estágios mais avançados, diagnosticados tardiamente, são frequentemente refratários aos tratamentos disponíveis (21). O fator prognóstico isolado de maior importância é a espessura do tumor. Pacientes com tumores com menos de 1 mm tem sobrevida de 92% em 10 anos e com mais de

4 mm esse valor cai para 50%. No Brasil, a mortalidade é maior do que a média mundial, com sobrevida de 67,5% em 5 anos. O MC metastático avançado é praticamente incurável, com sobrevida de 6 a 9 meses (22). Os resultados insatisfatórios obtidos com as tradicionais modalidades terapêuticas do MC têm estimulado a realização de estudos experimentais com novos métodos na busca de modificar os prognósticos atuais (23- 25). Diante disso, substâncias conhecidas como fitofármacos (compostos derivados de plantas) têm chamado atenção nas pesquisas de terapias anticâncer. Dentre esses compostos uma fitoalexina natural com grande potencial e perspectivas significativas é o Resveratrol (Resv), um polifenol da classe dos estilbenos presente em uma ampla variedade de espécies de plantas, incluindo amora, amendoim, a casca da uva e em seus produtos processados (26). Este composto é sintetizado em consequência a uma agressão externa da planta, que pode ser decorrente de ataque por um patógeno, infecções fúngicas e irradiação por luz ultravioleta (27,28). Os benefícios do Resv para a saúde têm sido elucidados de modo crescente, apontando efeitos positivos dessa substância como a ação antioxidante, atividades anti-inflamatórias, cardioprotetoras e efeito antitumoral (29).

Pesquisas atuais têm demonstrado que o Resv possui altas taxas de atividades biológicas, relatando exibir excelentes efeitos antitumorais em uma variedade de tumores como de ovário, cólon e leucemia (30-33). O Resv demonstrou capacidade de suprimir, *in vitro*, a proliferação de linhagens tumorais e da carcinogênese, *in vivo*, inibindo o crescimento do tumor por meio da ativação da apoptose, devido ao aumento da atividade da p53 e diminuição dos produtos antiapoptóticos, inibição da angiogênese, sincronização das células em determinada fase do ciclo celular e alteração dos principais estágios relacionados à carcinogênese: iniciação, promoção e progressão do tumor (34- 36).

Nessa perspectiva, em virtude do aumento considerável da incidência de MC, de suas propriedades altamente agressivas e resultados insatisfatórios com as tradicionais modalidades terapêuticas, estudos utilizando modelos experimentais são imprescindíveis para o melhor entendimento da fisiopatologia dessa neoplasia (27). Devido a sua genética bem conhecida e bastante similar ao MC que ocorre em humanos, o transplante singênico de melanócitos neoplásicos de pele, da linhagem celular B16-F10, em camundongos C57BL/6, representa um modelo tumoral murino *in vivo* bastante promissor para o teste de grande número de drogas antineoplásicas, com o propósito de se selecionar compostos específicos para esse tipo de

câncer (37,38). Portanto, sugere-se que o Resv seja uma substância com grande potencialidade considerando o MC.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Melanoma cutâneo (MC)

O câncer é uma doença de grande relevância para a saúde pública por ser responsável pela morte de milhares de pessoas todos os anos. Para o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (5). Entende-se por câncer, um processo patológico marcado pela autonomia da proliferação celular, aquisição de fenótipos indiferenciados, capacidade de invadir tecidos locais e à distância (metástases) e resistência à ativação de mecanismos de morte celular (6,7). Entre os tumores malignos pouco diferenciados, com crescimento rápido, infiltrativo e altamente nocivo tem-se o MC (39).

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo composta por diversos tecidos, tipos celulares e estruturas especializadas, tornando-se assim um órgão extremamente complexo. O padrão histológico da pele pode ser definido a partir das três camadas, uma porção epitelial mais externa de origem ectodérmica, a epiderme (*epi* = em cima; *dermis* pele), uma porção conjuntiva intermediária de origem mesodérmica, a derme, composta por vasos sanguíneos, vasos linfáticos, folículos pilosos e glândulas. Abaixo da derme reside um tecido conjuntivo frouxo, a hipoderme, compõe-se de tecido adiposo (40). A camada epiderme é composta principalmente por células planas semelhantes à escama de peixe, denominadas células escamosas. Células arredondadas chamadas células basais repousam abaixo das células escamosas na epiderme. A porção mais inferior da epiderme contém melanócitos (41).

A pele é um órgão exposto ao ambiente que, apesar de muito resistente, pode sofrer danos e, até mesmo, desenvolver cânceres. São três as principais neoplasias malignas da pele: o carcinoma de células basais, o carcinoma de células escamosas e o melanoma maligno. A primeira consiste na mais comum neoplasia maligna, ocorrendo em virtude da radiação ultravioleta e se desenvolve no estrato basal, sendo as áreas cronicamente expostas da pele como a face, as mais acometidas. O carcinoma de células escamosas ou carcinoma

epidermóide está relacionado a fatores ambientais, tais como radiação ultravioleta e os raios X, além de carcinógenos químicos. Esta neoplasia origina-se nas células do estrato espinhoso e aparece clinicamente como uma placa escamosa hiperqueratótica, com invasão profunda dos tecidos subjacentes, frequentemente acompanhada por sangramento. O MC, foco central deste estudo, é uma neoplasia maligna que se desenvolve a partir dos melanócitos, células produtoras de melanina que determina a cor da pele que são derivadas da crista neural, que residem na camada basal da epiderme. (Figura 1) (42,7).

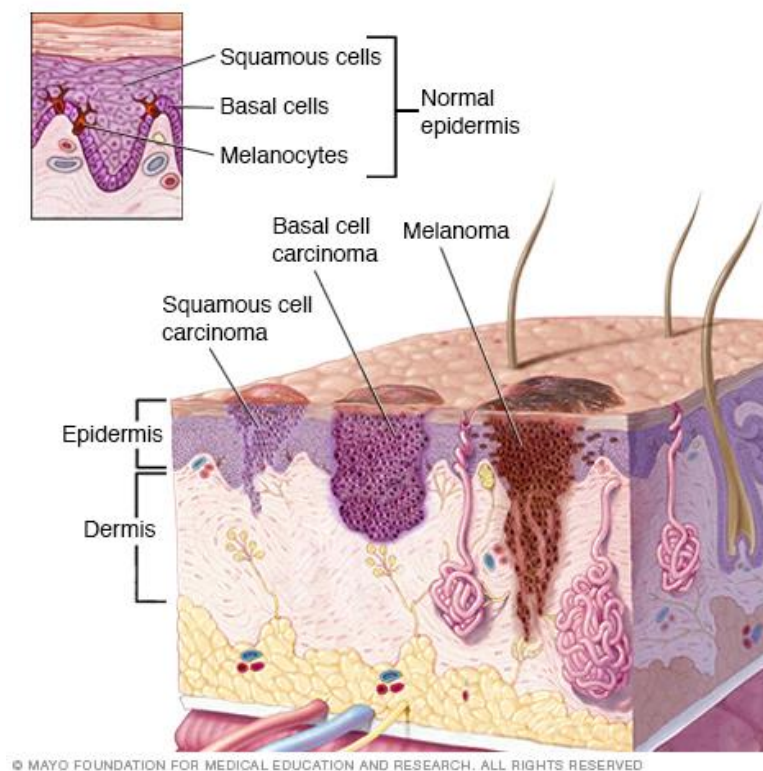


Figura 1: Padrão histológico da pele, definido a partir de duas camadas, porção mais externa, epiderme e porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. O câncer de pele inicia nas células normais que compõem a camada externa da pele, células escamosas, células basais e melanócitos. Os cânceres originados nestas células são respectivamente: o carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular e o melanoma.

Apesar de sua baixa incidência (4% dos tipos de cânceres), o MC é visto como uma neoplasia grave e que tem aumentado significativamente, com elevado índice de letalidade em estágios avançados, gerando baixa chance de sobrevivência aos pacientes (2-4). Considerado uma doença multifatorial em que alterações epigenéticas, exposição a agentes ambientais e predisposição genética são fatores de risco para o seu desenvolvimento. Como exemplo, citamos os

indivíduos leucodérmicos de exposição excessiva, à radiação solar (raios UV), presença de nevos melanocíticos e história familiar (9-13).

O diagnóstico precoce e o manejo adequado da lesão inicial certamente são as melhores e mais adequadas formas de se abordar o portador de melanoma, propiciando aumento na sobrevida e qualidade de vida (43). Em relação ao desenvolvimento do MC, a aquisição do fenótipo maligno pelos melanócitos deve-se a uma proliferação celular anômala relacionada a modificações do aparato coordenador do ciclo celular (44). Células de cânceres proliferam de maneira desordenada, além de perderem a dependência de estímulos externos para proliferarem (45). Moléculas que regulam este evento encontram-se alteradas, ora em níveis aumentados, ou constitutivamente ativadas, ora em níveis diminuídos, no caso de moléculas inibitórias do ciclo celular. Elementos que controlam a transição entre as fases G₁ e S do ciclo celular estão frequentemente desregulados em MC (46,47). Elementos-chave para o controle do ciclo celular de melanócitos são os produtos do gene *CDKN2a*. Este gene codifica duas proteínas distintas, ambas com funções no controle do ciclo celular. A primeira corresponde à proteína p16, um inibidor de quinases dependentes de ciclina da transição entre a fase G₁ e S; a segunda é p19^{ARF}, associada à via de p53, produto de um gene supressor de tumor que controla parada ao longo das fases do ciclo e o processo de morte celular (48,49). Inúmeros eventos e diversas moléculas encontram-se envolvidos no processo de morte celular, no qual é complexo e regulado por diferentes vias de sinalização. No MC há um desequilíbrio entre esses eventos, gerando uma baixa atividade apoptótica. Portanto, numerosos estímulos induzem os processos de proliferação e de morte celular, existindo um equilíbrio coordenado entre esses eventos. Falhas desses processos podem acarretar em um acúmulo de células e uma ocasional desorganização tecidual, estabelecendo os processos neoplásicos, como o MC, cujas células perdem sua capacidade de diferenciação, função e possuem alto poder de invasão e metástases (50).

Após confirmação diagnóstica do MC, deve-se proceder à classificação da doença quanto a sua extensão no organismo, o estadiamento (14,15,51). Este procedimento é feito conforme preconizado pelos protocolos da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), no qual analisa-se a espessura da lesão primária, a presença de ulceração, satelitose (metástase em trânsito), acometimento linfonodal e presença de metástases viscerais ou à distância, seguindo a classificação: T - tumor primário, N – comprometimento de linfonodo regional e M - metástases à distância – TNM. Sendo assim, tem-se papel primordial em proporcionar

importantes informações acerca do prognóstico do paciente e possibilitar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas (16-19).

Em relação ao tratamento, as principais opções para pacientes diagnosticados com MC são a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia, terapia alvo e a imunoterapia, podendo até haver uma combinação desses tratamentos (20). Para os casos identificados em fases “*in situ*”, a alternativa terapêutica de escolha, é a excisão cirúrgica com margens apropriadas, uma vez que é a abordagem com maiores taxas de sucesso, podendo levar a remissão completa da lesão (35,36,52,53). Quando diagnosticado tardiamente em estágios avançados da doença, as terapias empregadas para o câncer como quimioterapia e radioterapia, atuam de maneira paliativa com o intuito de aliviar os sintomas e melhorar a qualidade de vida, uma vez que a perspectiva de cura após o tratamento não é elevada, o que implica num prognóstico negativo com reduzido impacto na sobrevivência do indivíduo (54,55).

Diante dessa perspectiva, os resultados insatisfatórios obtidos com as modalidades de tratamento do melanoma cutâneo metastático têm estimulado a realização de estudos experimentais com novos métodos, assim como a busca de fármacos alternativos ou complementares para o tratamento do MC, principalmente nos estágios avançados da doença (25). Pesquisas *in vitro* e *in vivo* são imprescindíveis para melhor compreensão do comportamento biológico dessa neoplasia e para o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos. A utilização de animais de experimentação são modelos favoráveis para testar um grande número de drogas e selecionar compostos específicos contra esse tumor (36,37).

2.2 Resveratrol

O descobrimento de uma substância fenólica conhecida como Resveratrol (Resv)- 3,5,4'-trihidroxi-droxiestilbeno ocorreu em 1940 (56). Entretanto, em 1992 o Resv ganhou maior destaque e surgiu o real interesse em estudá-lo, quando foi postulado para explicar algumas implicações protetoras do vinho tinto (57). Desde então, relações com diversas doenças e supostos mecanismos de ação foram atribuídos ao Resv ao longo dos anos.

O Resv caracteriza-se por ser um polifenol de ocorrência natural em muitas plantas e em seus produtos processados. Este composto é encontrado principalmente em uvas, frutas vermelhas, vinho tinto e amendoim (26). Nas plantas, o Resv é sintetizado em resposta ao stress ambiental, tal como mecanismo de defesa contra fungos, radiações ultravioletas, e variações de temperatura (27). As concentrações de resveratrol obtidas nos vinhos e sucos de uvas variam de acordo com a origem e o tipo da uva, o processo de vinificação ou extração do suco e a infecção fúngica ocorrente na videira (58,59).

O Resv é um dos estilbenos naturais mais importantes, apresenta inúmeros benefícios à saúde e tem sido amplamente estudado. Diversas propriedades biológicas têm sido apontadas para esta substância incluindo ações antioxidantes, anti-inflamatórias, cardioprotetoras, antidiabetes, anti-câncer, quimiopreventivas e neuroprotetoras (35,36,52,53). Contudo, seus efeitos quimiopreventivos e terapêuticos estão em maior evidência em diferentes cânceres, incluindo, leucemia, pulmão, pele, dentre outros (60,61,33).

Há uma necessidade crescente da descoberta de terapias anticâncer que sejam inovadoras e que promovam, além da cura, qualidade de vida para os indivíduos acometidos e/ou prevenção para os indivíduos saudáveis (62). Diante disso, substâncias conhecidas como fitofármacos (compostos derivados de plantas) têm chamado atenção nas pesquisas de terapias anticâncer, assim como, o composto da presente pesquisa (63).

Devido à extrema heterogeneidade das células cancerosas, é difícil encontrar um alvo molecular específico para a prevenção ou o tratamento do mesmo. Assim, um agente preventivo ou terapêutico do câncer deve visar às diversas vias bioquímicas envolvidas no processo que conduziu à malignidade, limitando, ao mesmo tempo, uma toxicidade indesejada

ou efeitos colaterais em tecidos saudáveis. Em meio à lista dos compostos naturais com propriedades anticancerígenas, o Resv tem sido bastante investigado (64).

Em 1997 um estudo conduzido por Jang e colaboradores, demonstrou as propriedades quimiopreventivas do Resv (65), no qual relataram sua capacidade de inibir o desenvolvimento do tumor nos três principais estágios da carcinogênese, isto é, atividades anti-iniciação, anti-promoção e anti-progressão, sendo um potente inibidor do crescimento de várias linhagens tumorais *in vitro* e da carcinogênese *in vivo* (66). Além disso, os efeitos do Resv estão associados à inibição da proliferação celular (67), indução da apoptose (68), inibição da angiogênese (69), redução do crescimento tumoral (70), parada do ciclo celular (71), bem como, inibição da atividade da ciclooxygenase II, que é conhecida por desempenhar um papel na tumorigênese, convertendo o ácido araquidônico em prostaglandinas, compostos inflamatórios que promovem a proliferação de células tumorais (72).

A ação desempenhada pelo Resv no evento patológico da carcinogênese é decorrente de numerosas alterações em vias moleculares inerentes a cada tipo de câncer, especialmente devido ao perfil genético-epigenético de cada célula cancerosa, o que torna mais complexo o processo de elucidação destes mecanismos alterados frente a uma determinada linhagem específica (73,74). Todavia, tal fato não atenua a necessidade de fundamentação/reconhecimento de métodos de análise dessa substância.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar os efeitos da administração oral de Resveratrol (Resv) na progressão do modelo tumoral murino singênico de melanoma cutâneo (MTMSMC) e na sobrevida relacionada ao câncer em camundongos C57BL/6.

3.2 Objetivos específicos

- Induzir modelo tumoral murino singênico por meio da inoculação de células cancerosas murinas B16-F10 de melanoma cutâneo em camundongos C57BL/6.
- Investigar o efeito de diferentes doses de Resv (200mg/kg e 400mg/kg) sobre o volume e o peso tumoral em camundongos C57BL/6 submetidos ao MTMSMC.
- Analisar o efeito do Resv na sobrevida relacionada ao câncer de camundongos C57BL/6 submetidos ao MTMSMC.

4 PRODUTO CIENTÍFICO

4.1 Produto Científico: *Resveratrol reduces tumor growth and improves survival in C57BL/6 mice submitted to the syngeneic murine cutaneous melanoma tumor model*, formatado segundo as normas para publicação do periódico Revista Phytomedicine.

Resveratrol reduces tumor growth and improves survival in C57BL/6 mice submitted syngeneic murine cutaneous melanoma tumor model

Running-title: Effects of resveratrol in syngeneic, murine cutaneous melanoma model.

Amanda Mota Lacerda^a; João Lucas Rodrigues dos Santos^a; Otávio Cardoso-Filho^a; Magda Mendes Vieira^a, Andréia de Souza Brito^a; Amanda Rodrigues Santos^a; Valéria Couto Quintão^a, Lorrane Katherine Martins Pereira^a, Maria Isabela Alves Bernardo^a, Erivelton Pereira dos Santos^a, Amanda Souto Machado^a; Vinicius Dias Rodrigues^{a,b}, Gefer Thiago Batista Corrêa^c; Sérgio Henrique Sousa Santos^{a,d}, Lucyana Conceição Farias^{a,e}, André Luiz Sena Guimarães^{a,e}, Ludmilla Regina de Souza David^a, Adriana Bozzi^f, Alfredo Mauricio Batista De- Paula^{*a,e}

^a Nucleus of Epidemiologic and Molecular Research Catrumano (Nupemoc). Health Research Laboratory. Post-graduate Programme in Health Sciences. Universidade Estadual de Montes Claros, 39401-001, Montes Claros, Minas Geras, Brazil.

^b Department of Physical Education. Universidade Estadual de Montes Claros, Unimontes, 39401-001, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

^c Department of Dentistry. Faculdades Independentes do Nordeste, 45055-030, Vitória a Conquista, Bahia, Brazil.

^d Institute of Agricultural Sciences. Food Engineering College. Universidade Federal de Minas Gerais, 39404-547, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

^e Department of Dentistry. Universidade Estadual de Montes Claros, Unimontes, 39401-001, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

^f René Rachou Institute, FIOCRUZ, Belo Horizonte and Santa Cruz State University, Ilheus, 45662-900 Bahia, Brazil.

Address correspondence to:

*Alfredo Maurício Batista De-Paula.

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Hospital Universitário Clemente de Faria - Universidade Estadual de Montes Claros. Avenida Cula Mangabeira, 562. Bairro Santo Expedito, Montes Claros. Minas Gerais, Brazil. CEP: 39401-001.

Phone: 55-21-38 32248380 - e-mail: alfredo.paula@unimontes.br

ABSTRACT

Background. Cutaneous melanoma (CM) represents a cancer originated in melanocytes, has an increasing incidence and high lethality. Therefore, substances known as phytopharmaceuticals have attracted attention in research on anticancer therapies, due to their ability to modulate the activity of multiple targets involved in carcinogenesis. A natural phytoalexin with great potential and significant prospects is resveratrol (Resv) in which they have demonstrated anti-initiation, anti-promotion and anti-progression activities for cancers.

Aim To evaluate the effects of oral administration of Resveratrol at the progression of the syngeneic murine cutaneous melanoma tumor model (SMCMTM) and on the related survival of C57BL/6 mice.

Methods This study was approved by the Ethics Committee on Experimentation and Animal Welfare (CEEBEA/Unimontes N^o: 131/2017). The research comprised two distinct stages: evaluation of tumor progression and survival of mice. In order to establish SMCMTM, female C57BL/6 mice (n=60) were inoculated in the dorsal subcutaneous region with 5×10^5 of the murine MC cell line, B16-F10. For analysis of tumor progression, the animals were divided into three study groups: Control; Resv200 and Resv400. After the appearance of a clinically palpable tumor, they were monitored daily to measure the tumor volume with the aid of a digital caliper (mm^3). In order to strengthen these data, it was also used to evaluate the tumor volume (mL), using the Doppler ultrasound device on days 5, 8 and 11 of the experimental period. The animals were treated for 11 days, and euthanasia occurred on the 12th day of follow-up. For analysis of cancer-related survival, the animals were submitted to SMCMTM, the division of the groups being identical to that used for the first analysis. The mice were treated and monitored for the daily death record, until the last death of each group occurred.

Results Animals treated with Resv 200mg/Kg and 400mg/ Kg showed a significant reduction in volume ($p < 0.001$) and tumor weight (g) ($p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively) in a dose-dependent manner. Additionally, a benefit of Resv was also perceived in increasing cancer-related survival in experimental animals compared with controls ($p = 0.038$ and $p = 0.040$, respectively).

Conclusion The administration of Resv promoted a relevant anti-tumor action in the *in vivo* treatment of C57BL/6 mice submitted to SMCMTM, leading to a reduction in tumor volume and weight, with an increase in the survival rates of the animals.

Key-words: Resveratrol, tumor progression, cutaneous melanoma, murine B16F10 cells, mouse tumor model.

Introduction

Resveratrol (Resv) - 3,5,4'-trihydroxy-droxiestilbene, is characterized by being a naturally occurring polyphenol in many plants and its processed products, this compound is found mainly in grapes, red fruits, red wine and peanuts (1), this substance is synthesized in response to an external aggression, which can be due to attack by a pathogen, fungal infections and irradiation by ultraviolet light (2). The health benefits of Resv have been increasingly elucidated, pointing out positive effects of this substance such as antioxidant, anti-inflammatory, cardioprotective and anti-tumor effects (3,4).

Among the list of natural compounds with anti-cancer properties, Resv has been quite investigated. This compound demonstrated the ability to suppress *in vitro*, the proliferation of tumor lineage, of ovaries, leukemia, colon, among others (5-7) and *in vivo* carcinogenesis, inhibiting tumor growth through the activation of apoptosis, due to increased activity of the p53 protein and reduction of anti-apoptotic products, inhibition of angiogenesis, synchronization of cells at a certain stage of the cell cycle and alteration of the main stages related to carcinogenesis: tumor initiation, promotion and progression (8,9). Therefore, it is suggested that Resv is a substance with great potential considering cutaneous melanoma (CM). This neoplasm represents a cancer originated in melanocytes, a skin cell that synthesizes a pigment called melanin, constitutes 4% of cutaneous tumors, however, they present an increasing incidence and a high lethality rate, with few therapeutic alternatives in the advanced stages of the disease (10,11). Considered to be a multifactorial disease, in which epigenetic changes, exposure to environmental agents and genetic predisposition are risk factors for its development (12,13).

Early diagnosis and an adequate therapeutic management of primary malignancy are the most appropriate ways to approach the patient with CM once they improve the prognosis

factors associated to this type of cancer, such as, decreasing morbidity-related to malignancy and increasing the cancer-related survival (14). The unsatisfactory results obtained with the traditional therapeutic modalities from CM has stimulated the performance of experimental studies with new methods, in an attempt to modify the current prognosis of the disease (15,16).

That said, substances known as phytopharmaceuticals (compounds derived from plants) have attracted attention in research on anticancer therapies, as the compound in this research (1). In this perspective, studies using experimental animal models are essential for a better understanding of the pathophysiology of this neoplasm, as well as a better understanding of its biological behavior and the development of new therapeutic methods. The use of experimental animals are favorable models for testing a large number of drugs and selecting specific compounds against this tumor (17).

This present study evaluated the effects of oral administration of Resv on the progression of syngeneic mouse cutaneous melanoma model (SMCMTM) and on cancer-related survival of C57BL/6 mice.

Material and methods

Reagents and Cell lineage

Cell lineage B16-F10 (CM) (ATCC® CRL-6475™) was obtained at the Laboratory of Antitumor Substances, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil. Resveratrol, was obtained of Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EUA). Trypsine–EDTA was acquired from Life Technologies. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium. Fetal bovine serum, and penicillin-streptomycin mixture were obtained of Gibco (EUA).

Cell culture

The murine cutaneous melanoma (CM) cell lineage, B16-F10, was cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% SFB, 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. The culture medium was filtered in a laminar flow chapel, with a 0.22 µm filter and stored at 2°C to 8°C. The pH of this culture medium was adjusted to 7.4. In use, the culture medium was preheated in a water bath at 37°C. The cultures were monitored daily, observing color, turbidity of the medium, confluence and cell morphology in an optical microscope. Maintained in an oven with an atmosphere of 5% CO₂ and at 37°C. The culture medium was changed every two or three days. After reaching about 90% of the cell confluence in the culture flasks, the adhered cells were released from the plate after treatment with trypsin/EDTA for 5 minutes, in an oven at 37°C and 5% CO₂. Soon after, trypsin was inactivated with RPMI 1640 medium supplemented with 10% SFB. The removed cells were centrifuged (1000 rpm) for 5 minutes, the supernatant was discarded and the cell pellet was resuspended in RPMI 1640 culture medium supplemented and the cell concentration measured with the mirrored Neubauer chamber (Grid Optics, OG-200, Hong Kong, CHI).

Ethical aspects

The *in vivo* study design addressed in this research project was analyzed and approved by the Ethics Committee in *Animal Well-being and Experimentation* of the State University of Montes Claros (protocol number: 131/2017), which follows the recommendations of the *Brazilian Code for Use of Laboratory Animals* (18).

Animals, model of murine cutaneous melanoma for tumor progression and survival analysis

The study comprised two distinct stages, in the first, the effects of Resv on tumor progression and, in the second, the cancer-related survival of the mice.

For the study, female C57BL/6 mice were used, aged 6 to 8 weeks, with n=60 in which 30 animals were used to assess tumor progression and 30 to assess survival. The mice were initially obtained from the Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil, for experimental use in this study. They were kept under controlled temperature ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), light (12h light/12h dark), relative humidity ($60 \pm 5\%$), housed in plastic boxes (ten mice/box) where they received commercial feed (Purina-Labina®, São Paulo, BRA) and water. Daily water and feed intake was calculated and monitored manually three times a week by the difference between the weight of the food received in your domestic cage hopper and the weight of the remaining food 24 hours later. The animals were monitored daily for the development of tumors.

The mice were housed in the same bioterium during the entire period of acclimatization and experimentation under conditions free of specific pathogens. After the 10-day acclimatization period, experimental activities began. 24 hours before inoculation with subcutaneous injection of cancer cells, from the murine cutaneous melanoma (CM) cell line, B16-F10, trichotomy was performed on the dorsal region of the animals, where the cells were inoculated, to induce the murine tumor model of cutaneous melanoma. B16-

F10 cells were removed from the culture flasks by adding trypsin/EDTA solution, centrifuged and resuspended in sterile PBS. C57BL/6 mice were inoculated subcutaneously with 5×10^5 cells/animal (0.05 ml) in the flank using a 1 ml tuberculin syringe (Hamilton Co., Reno, NV, USA) with a 27 gauge hypodermic needle (19,20).

Subsequently, for analysis of tumor progression, the animals were randomly divided into three study groups, as follows: i: tumor induction, placebo, saline solution (PBS) (Control) (n=10); ii. tumor induction, Resv 200 mg/kg of body weight (Resv200) (n=10); iii: tumor induction, Resv 400 mg/kg of body weight (Resv400) (n=10). The mice in the respective groups received oral treatment administered by gavage for 11 days. The evaluation of tumor progression was performed daily for a period of 12 days, and euthanasia occurred on the twelfth day of follow-up (Figure 1).

For the analysis of overall cancer-related survival, the animals were also inoculated, submitted to the murine syngenic tumor model of cutaneous melanoma, and randomly divided into three study groups, as follows: i: tumor induction, placebo (PBS) (Control) (n=10); ii. tumor induction, Resv 200 mg/kg body weight (Resv200) (n=10); iii: tumor induction, Resv 400 mg/kg of body weight (Resv400) (n=10), the form of administration being identical to that used to assess the effect on tumor progression. For this analysis, the animals were treated and followed up on the daily death record, until the last death of each group occurred. However, mice belonging to a single group with living representatives and who presented apparent conditions of suffering, exhibiting severe impairment of bodily functions or behaviors due to extensive necrosis, ulceration and growth of the tumor mass were sacrificed (Figure 2).

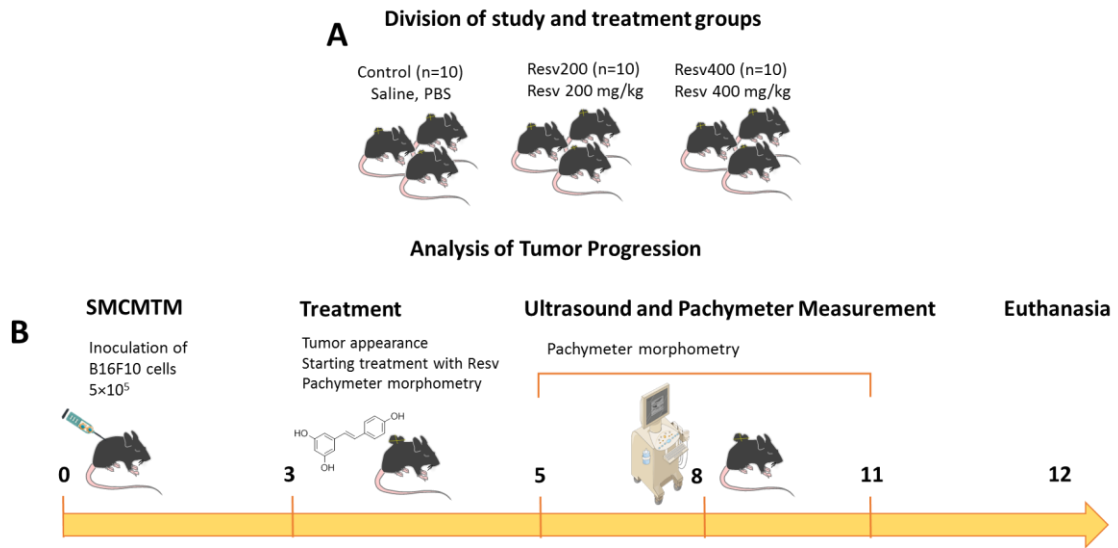


Figure 1: Study outline. In A, division of study groups, treatment and n. In B, moments of the experimental period for analysis of tumor progression in mice submitted syngeneic murine cutaneous melanoma tumor model.

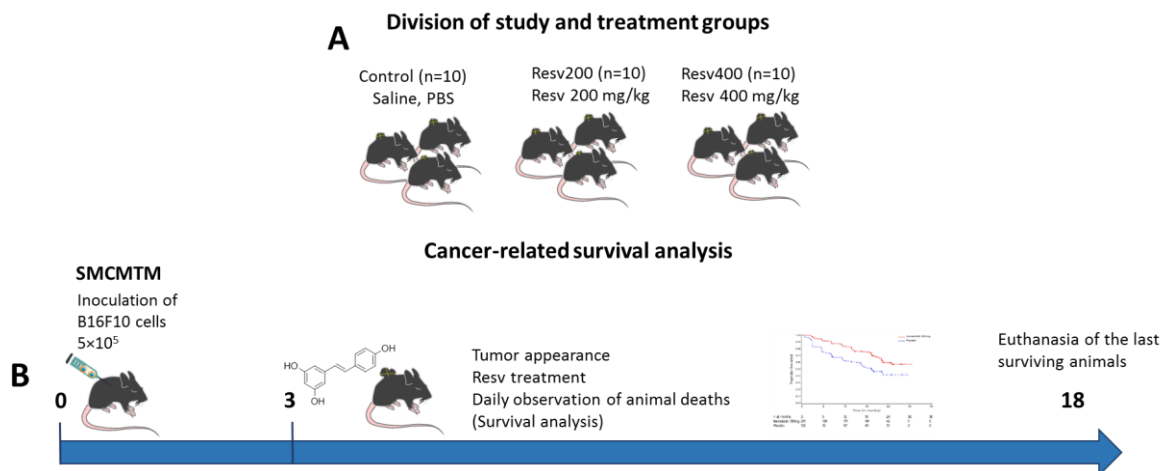


Figure 2: Study outline. In A, division of study groups, treatment and n. In B, moments of the experimental period for analysis cancer-related survival in mice submitted syngeneic murine cutaneous melanoma tumor model.

Analysis of tumor volume and weight

To determine the effect of Resv administration on the tumor progression of C57BL/6 animals submitted to the syngeneic murine cutaneous melanoma tumor model, after the appearance of the clinically palpable tumor (third day after inoculation), the mice were followed up daily for their measurement and analysis macroscopic. A trained examiner, blinded to the animal group, was responsible for the daily recording of tumor dimension measurements using a digital caliper, with a resolution of 0.01 mm (Mitutoyo CSX-B, São Paulo, BRA) (21). This measurement was determined in the head-caudal, left-right and height dimensions. Subsequently, the standard prolate ellipsoid formula was used to calculate tumor volume. Tumor volume (mm^3) = $(\pi/6 \times \text{length} \times \text{width} \times \text{height})$ (22,23). In order to strengthen the data using the digital pachymeter, tumor volume (mL) was also used, using a Doppler ultrasound device (LOGIQ® and Pro, GE HealthCare Medical Systems, Inc. Wauwatosa, WI, USA) with electronic linear probe (L8-18i-RS), on days 5, 8 and 11 after the beginning of oral administration of resv. The gain, frequency, focus position and depth parameters were adjusted accordingly to ensure that the tumor was clearly displayed on the screen. The tumor volume was scanned transversely, longitudinally and by depth and the tumor image aspects, such as maximum diameter, margin and shape, were stored on the device's internal hard disk for further analysis (24). In order to analyze the tumor progression, the C57BL/6 mice in the study groups for this verification, were euthanized on the twelfth day of follow-up, and the tumors of the three different groups were excised, evaluated macroscopically and then weighed on an analytical balance, for further analysis.

Statistical analysis

All the data collected were scanned in an electronic database. Subsequently, the data were analyzed statistically in the PASW® software (Predictive Analytics Software). Results

were expressed as mean \pm S.D. To analyze the progression of the tumor volume, the Two-way ANOVA statistical test was performed, followed by the Bonferroni post-test. For tumor weight, Kruskal-Wallis analysis of variance was performed. Kaplan-Meier survival curves were estimated for each event and the curves of the different groups were compared using the log-rank test. The confidence level adopted in all analyzes was established in 95% ($p < 0.05$)

Results

Resveratrol promoted a reduction in tumor volume and weight of C57BL/6 mice.

Figure 3A shows the macroscopic image of the animals in the control group inoculated with a tumor (Control) and treated with Resv200mg/Kg (R200) and Resv400mg/Kg (R400). After euthanasia, the tumor of the control and treated mice were excised and evaluated macroscopically as shown in figure 3B. Subsequently, they were weighed on an analytical balance and significant differences were identified between the groups. Our results showed that in both groups of C57BL/6 mice treated with Resv200mg/Kg and Resv400mg/Kg, the tumor weight was significantly lower, compared to control mice ($p < 0.05$ e $p < 0.01$, respectively) (Figure 3D).

According to the data presented in Figure 3C, it can be seen that resveratrol showed a tendency to inhibit tumor development from the third day of treatment, especially on animals treated with 400mg/kg. However, significant differences in tumor volume (mm^3) between the Control, R200 and R400 groups, occurred from the tenth day of follow-up, and the animals treated with Resv400mg/Kg had a significant reduction in tumor volume ($p < 0.01$), compared to the control group of untreated tumor-bearing animals. Considering the eleventh and twelfth days of follow-up, it was observed that the two Resv concentrations (Resv200mg/Kg and Resv400mg/Kg) significantly reduced the tumor volume when compared to the control group ($p < 0.001$). According to our findings, it is suggested that Resv acted in tumor progression, demonstrating its anticarcinogenic potential. In addition, we observed that most of the results promoted by Resv were dose-dependent.

To assess tumor volume (mL), images taken using high-frequency Doppler ultrasound were acquired two days after the start of treatment and later at intervals every three days, after model induction, based on the tumor progression of the SMCMTM and on days of treatment

with Resv. The measurement by means of Doppler ultrasound, did not occur daily, considering the clinical conditions of the animals, since to perform this type of measurement, special handling of the animal is necessary, such as sedation.

On the fifth day after tumor induction (two days of treatment), the following averages were found: Control group = 0.18mL, group R200 = 0.02mL and group R400 = 0.01mL. On the eighth day of oral administration of resv, we observed the values Control = 0.31mL, R200 = 0.05mL, R400 = 0.07mL. Finally, on the eleventh day of treatment, we observed averages: Control = 0.62mL, R200 = 0.21mL, R400 = 0.13mL. Therefore, our findings showed that the tumor-bearing mice treated with Resv (Resv200mg/Kg and Resv400mg/Kg), showed a significant reduction in tumor volume (mL) compared to the control group of animals inoculated with untreated tumor, justifying once again , the anti-tumor property of this polyphenol (Figure 3E).

Resv administration improved cancer-related survival of C57BL/6 mice

After analysis of cancer-related survival of animals submitted to SMCMTM, it was found that mice in the Control group had the last death on the fifteenth day of follow-up, showing a lower survival compared to the groups treated with Resv (Resv200mg/Kg and Resv400mg/Kg) (p=0.038 and p=0.040, respectively). The animals in the groups treated with Resv exhibited better cancer-related survival compared to mice in the Control group (Figure 4).

Discussion

The results of this study demonstrated that the oral administration of Resv, at concentrations of 200 and 400 mg/kg, in C57BL/6 mice submitted to SMCMTM promoted antineoplastic effects in reducing tumor volume and weight, as well as improving survival related to cancer. The polyphenols found in foods can affect and modulate numerous processes and diverse biochemical pathways understood in carcinogenesis, a natural phytoalexin with great potential and significant perspectives, which exhibited excellent antitumor effects in a variety of tumors (25,26).

Resv has undergone *in vitro* and *in vivo* carcinogenesis assays in a variety of cancer cell lineage, including, ovaries, leukemia, colon, among others (5-7). An research has shown that the administration of Resv was able to modulate the phenomenon of tumor progression from the action on molecular pathways that act on growth, cell division, inflammation, apoptosis, metastasis and angiogenesis. The anticancer peculiarity of Resv has been quite explored, due to its ability to inhibit the proliferation of a wide variety of tumor cells *in vitro*. These culture reports triggered considerable preclinical *in vivo* studies to investigate the potential of this drug in chemoprevention and cancer chemotherapy (27).

Jang et al. (1997) were the pioneers to describe the anti-tumor effect of Resv in a mouse skin cancer model. In this study, the administration of Resv inhibited tumorogenesis, decreasing the number and percentage of animals with skin tumors, with no evident signs of toxicity induced by this compound (28). The therapeutic potential of Resv was also evaluated in the treatment of rats inoculated with a rapidly developing tumor (ascites hepatoma Yoshida AH-130), in which it demonstrated a significant reduction (25%) in the content of tumor cells (29). In another study, researchers used the 4T1 breast cancer cell lineage, evaluating the effect of Resv *in vitro* and *in vivo*. The authors suggest that this substance is a potent inhibitor

of cells in cultured breast cancer; it is not toxic for mice from 1 to 5 mg/kg; and has no inhibitory effect on development in 4T1 breast cancer *in vivo*. They also emphasized that Resv inhibited cell growth in a dose and time dependent manner (30).

The effectiveness of Resv was also investigated in animals with highly metastatic tumors of Lewis lung carcinoma (LLC), in which they evidenced that Resv significantly reduced the tumor volume (42%), the tumor weight (44%) and lung metastases (56%) at doses of 2.5 and 10 mg/kg, but not at 0.6 mg/kg (31). There are few reports *in vivo* about the effect of Resv on MC, however, some researchers have addressed and evaluated the action of this compound, considering this neoplasm in animals, using different types of cell lineages. Results similar to those addressed in this study corroborate the findings of a survey, which two murine cell lineages from MC (B16BL6 and B16F10) were used, in this model Resv reduced the volume of the primary tumor by 60% ($p = 0.001$), in addition to inhibiting the migratory and invasive properties of these highly malignant cells, this compound also inactivated Akt (key protein in cell proliferation routes) in the MC model in mice, indicating a potential for treatment (32).

The use of Rsv was also explored in a doxorubicin-resistant B16 melanoma cell lineage (B16/DOX), this study points to a positive effect of Resv when administered in mice, reducing the growth of the established tumor and prolonging the survival of the animals (32%). This data is consistent with our findings, in which it was found that mice treated with Resv exhibited an improvement in overall cancer-related survival, compared to the control group. Immunohistochemical studies have shown that caspase-3 has its expression reduced in several primary tumors, this reduction being associated with an increase in the malignant potential of the tumor and, consequently, with a reduction in overall survival (33). However, the compound Resv acts in these parameters, because its action interferes in molecular

pathways acting in a beneficial way, and consequently improving the quality of life. These data support the potential use of Resv in the treatment of chemoresistant tumors (34).

In a study involving a human melanoma xenograft model (lineage A375), researchers reported that treatment with Resv did not get a statistically significant effect on melanoma growth and at higher dose levels (0.006% in food or 100 mg in granules of slow release) tended to promote tumor growth (35). The anticancer potential of Resv was also evaluated in a study involving Wistar rats in which skin carcinogenesis was induced by DMBA (7,12-dimethylbenz (α) anthracene) and TPA (12-O-tetradecanoylforbol-13-acetate). The results demonstrated that treatment with Resv caused a significant reduction in the occurrence of tumor volume and weight, compared to the control group (36).

In consonance with the literature, the effectiveness of Resv in *in vitro* experiments was promising in almost all cancer cell lines tested, studies have shown that treatment with Resv halted the progression of the cell cycle, apoptosis induced, suppressed proliferation, inhibited migration and reduced cell viability, therefore, these findings reinforce the antitumor role of this compound (37). Similar to *in vitro* tests, the administration of Resv in animal models provided convincing evidence that this substance has an antineoplastic effect in the management of carcinogenesis, and may act as an adjuvant therapy in cancer.

Regarding the findings of the present study, it was demonstrated that Resveratrol (200mg/Kg and 400mg/Kg) exhibited excellent antitumor effects, promoting positive action in the *in vivo* treatment of murine melanoma leading to a significant reduction in tumor volume and weight in a dose-dependent manner, with an increase in survival rates of C56BL/6 animals that were induced to SMCMTM.

Conflict of interest

None to declare.

Acknowledgements

We would like to thank the Foundation for Research Support of the Minas Gerais State (FAPEMIG, N^o PPM-00029-17 and DEG-00010-16); National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, N^o: 437311/2016-3 and 430759/2016-9); and the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the support to carry out this study.

References

1. Bertelli AA, Das DK. Grapes, wines, resveratrol, and heart health. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2009;54(6):468-76.
2. Nakata R, Takahashi S, Inoue H. Recent advances in the study on resveratrol. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2012;35(3):273-9.
3. Goswami SK, Das DK. Resveratrol and chemoprevention. *Cancer letters*. 2009;284(1):1-
4. Kundu JK, Surh Y-J. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives. *Cancer letters*. 2008;269(2):243-61.
5. Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer research*. 2004;24(5A):2783-840.
6. Mazué F, Delmas D, Murillo G, Saleiro D, Limagne E, Latruffe N. Differential protective effects of red wine polyphenol extracts (RWEs) on colon carcinogenesis. *Food & function*. 2014;5(4):663-70.
7. Lin C, Crawford DR, Lin S, Hwang J, Sebuyira A, Meng R, et al. Inducible COX-2-dependent apoptosis in human ovarian cancer cells. *Carcinogenesis*. 2011;32(1):19-26.
8. Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell cycle*. 2008;7(8):1020-35.
9. Kondratyuk TP, Park EJ, Marler LE, Ahn S, Yuan Y, Choi Y, et al. Resveratrol derivatives as promising chemopreventive agents with improved potency and selectivity. *Molecular nutrition & food research*. 2011;55(8):1249-65.
10. Schatton T, Frank MH. Cancer stem cells and human malignant melanoma. *Pigment cell & melanoma research*. 2008;21(1):39-55
11. Nikolaou V, Stratigos A. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. *British journal of dermatology*. 2014;170(1):11-9.
12. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer of the Breast: From Cancer: Principles & Practice of Oncology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2016.
13. Whiteman DC, Pavan WJ, Bastian BC. The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. *Pigment cell & melanoma research*. 2011;24(5):879-97.
14. Bordeaux JS, Lu KQ, Cooper KD, editors. *Melanoma: prevention and early detection*. *Seminars in oncology*; 2007: Elsevier.

15. Rubin KM, editor Management of primary cutaneous and metastatic melanoma. Seminars in oncology nursing; 2013: Elsevier.
16. Apalla Z, Nashan D, Weller RB, Castellsague X. Skin cancer: epidemiology, disease burden, pathophysiology, diagnosis, and therapeutic approaches. *Dermatology and therapy*. 2017;7(1):5-19.
17. Beattie C, Tissot R, Amoss M, editors. Experimental models in human melanoma research: a logical perspective. Seminars in oncology; 1988.
18. Marques RG, Morales MM, Petroianu A. Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2009;24(1):69-74.
19. Molina M, Mendoza-Gamboa E, Zapata-Benavides P, Sierra-Rivera C, Coronado-Cerda E, et al. Expression of Foxp3, CD25 and IL-2 in the B16F10 cancer cell line and melanoma is correlated with tumor growth in mice. *Oncology letters*. 2013;6(5):1195-200.
20. Sahu RP, Turner MJ, DaSilva SC, Rashid BM, Ocana JA, Perkins SM, et al. The environmental stressor ultraviolet B radiation inhibits murine antitumor immunity through its ability to generate platelet-activating factor agonists. *Carcinogenesis*. 2012;33(7):1360-7.
21. Goh J, Enns L, Fatemie S, Hopkins H, Morton J, Pettan-Brewer C, et al. Mitochondrial targeted catalase suppresses invasive breast cancer in mice. *BMC cancer*. 2011;11(1):191.
22. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 1989;24(3):148-
23. Pettan-Brewer C, Morton J, Coil R, Hopkins H, Fatemie S, Ladiges W. B16 melanoma tumor growth is delayed in mice in an age-dependent manner. *Pathobiology of Aging & Age-related Diseases*. 2012;2(1):19182.
24. Liao A-H, Ma W-C, Wu M-F. Evaluation of ultrasound combined with chitosan for the control of weight and local fat in mice. *Ultrasound in medicine & biology*. 2013;39(10):1794-803.
25. Surh Y-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(10):768-80.
26. Kelloff GJ, Sigman CC, Johnson KM, Boone CW, Greenwald P, Crowell JA, et al. Perspectives on surrogate end points in the development of drugs that reduce the risk of cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2000;9(2):127-37.
27. Bishayee A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. *Cancer prevention research*. 2009;2(5):409-18.

28. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 1997;275(5297):218-20.
29. Carbó N, Costelli P, Baccino FM, López-Soriano FJ, Argilés JM. Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumour growth in a rat tumour model. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;254(3):739-43.
30. Bove K, Lincoln DW, Tsan M-F. Effect of resveratrol on growth of 4T1 breast cancer cells in vitro and in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;291(4):1001-5.
31. Kimura Y, Okuda H. Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *The Journal of nutrition*. 2001;131(6):1844-9.
32. Bhattacharya S, Darjatmoko SR, Polans AS. Resveratrol modulates the malignant properties of cutaneous melanoma via changes in the activation and attenuation of the anti-apoptotic proto-oncogenic protein Akt/PKB. *Melanoma research*. 2011;21(3):180.
33. Wang X-S, Luo K-J, Bella AE, Bu S-S, Wen J, Zhang S-S, et al. Caspase-3 expression in metastatic lymph nodes of esophageal squamous cell carcinoma is prognostic of survival. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2014;20(15):4414.
34. Gatouillat G, Balasse E, Joseph-Pietras D, Morjani H, Madoulet C. Resveratrol induces cell-cycle disruption and apoptosis in chemoresistant B16 melanoma. *Journal of cellular biochemistry*. 2010;110(4):893-902.
35. Niles RM, Cook CP, Meadows GG, Fu Y-M, McLaughlin JL, Rankin GO. Resveratrol is rapidly metabolized in athymic (nu/nu) mice and does not inhibit human melanoma xenograft tumor growth. *The Journal of nutrition*. 2006;136(10):2542-6.
36. Hu Y, Wang J, Wu J. Administration of resveratrol enhances cell-cycle arrest followed by apoptosis in DMBA-induced skin carcinogenesis in male Wistar rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(13):2935-46.
37. Nivellet L, Hubert J, Courot E, Jeandet P, Aziz A, Nuzillard J-M, et al. Anti-cancer activity of resveratrol and derivatives produced by grapevine cell suspensions in a 14 L stirred bioreactor. *Molecules*. 2017;22(3):474.

Legends

Figure 3. Effect of Resv administration on tumor growth and size in C57BL/6 mice submitted to the murine syngeneic tumor model of cutaneous Melanoma. Macroscopic appearance of Control and mice treated with Resv200mg/Kg and 400mg/Kg (A). Macroscopic appearance of excised tumor from control and treated mice (B). Evolution of tumor volume (mm³) in control and treated mice (C). The mice treated with Resv200mg/Kg and Resv400mg/Kg exhibited a significantly lower tumor volume gain compared to the control mice after 12 days of follow-up. Resv-treated mice exhibited less tumor weight (g) compared to control mice (D). The tumor weight was measured immediately after the animals were euthanized (D). Ultrasound images of the tumor volume performed on days 5, 8 and 11 of the experimental period (E). The data were normalized to the tumor volume presented by animal on the first day. The level of significance was set at 95% ($p < 0.05$).

Figure 4. Effect of Resv administration on overall cancer-related survival in C57BL/6 mice with syngeneic tumor model. Regarding survival, significant differences were observed between Control vs Resv200 ($p = 0.038$) and Control vs Resv400 ($p = 0.040$), analysis performed by the Log-rank and Kaplan-Meier test.

Figures

Figure 3.

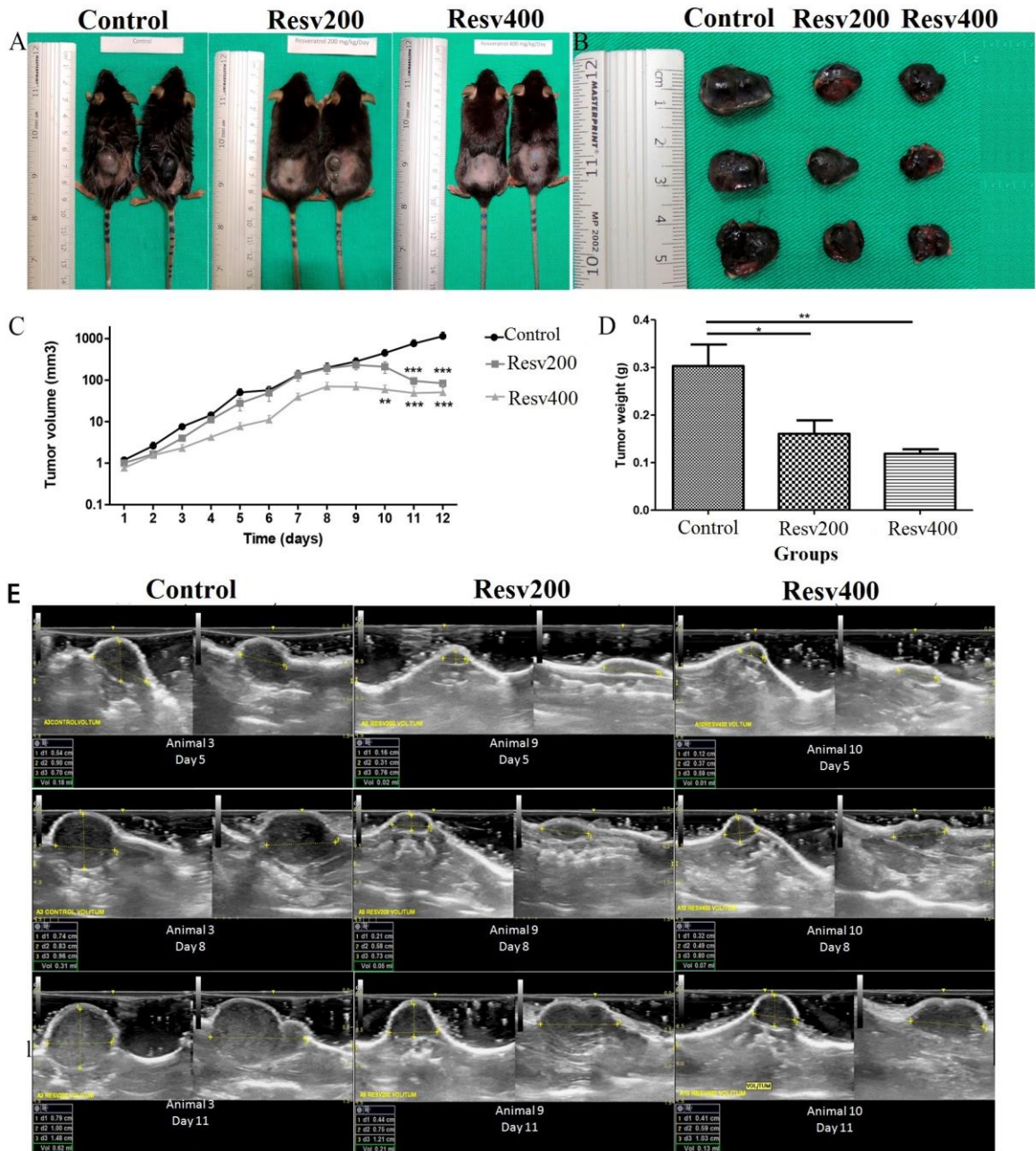
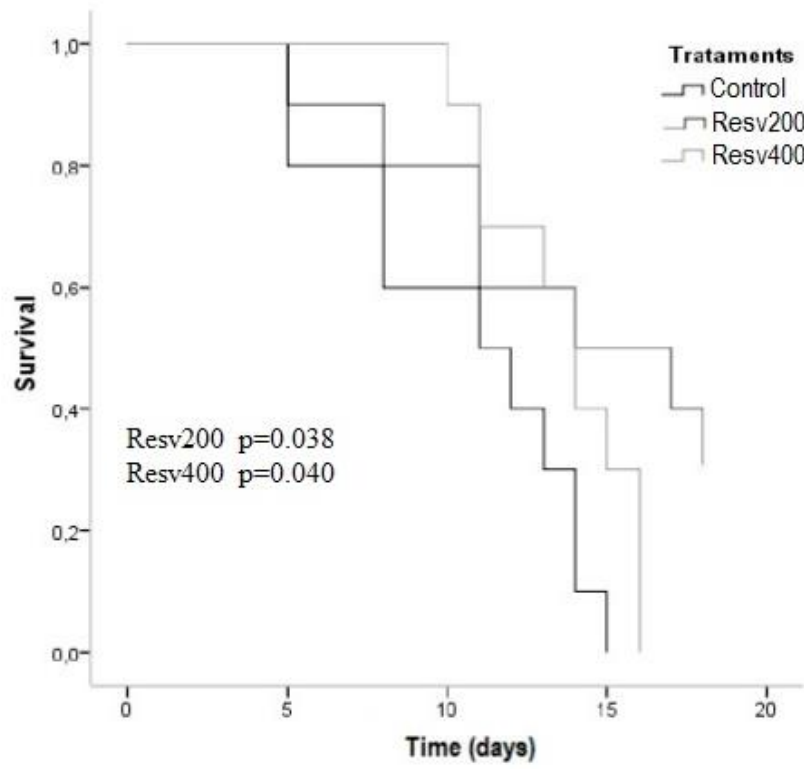


Figure 4.



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Finalizo esse ciclo, com uma reflexão no qual resume este processo vivenciado. De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estamos começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar. Façamos da interrupção um novo caminho. Da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro! (Fernando Sabino). Esse trecho do livro: “O encontro marcado” do escritor Fernando Sabino, reflete bem, estes dois anos em que estive como dedicação exclusiva ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, no curso de Mestrado acadêmico. Graduei-me em Odontologia; durante os meus cinco anos na graduação, a área da docência me chamou muita atenção, após formar-me, tive a convicção de que realizar um mestrado seria meu próximo passo, assim eu fiz. Logo, quando abriu o edital do processo seletivo em 2018, inscrevi-me, prestei as etapas e fui aprovada. O professor Alfredo me acolheu de forma ímpar, como sua orientanda, oportunizando iniciar essa jornada na pesquisa científica. O início desse processo foi marcado pelas disciplinas, no qual pude absorver tamanho conhecimento. Os experimentos da pesquisa científica trouxeram muitos aprendizados, percalços, êxito e superações. Pude participar, colaborar, e aprender com diversos projetos da nossa equipe de pesquisa (NUPEMOC), em que envolviam desde experimentos com cultura de células imortalizadas, até o cuidado e eutanásia dos animais do biotério da Unimontes. Durante essa jornada, pude também, com um colega, conhecer e realizar experimentos relevantes, em outro centro de pesquisa (Instituto de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ em Belo Horizonte). Neste centro, tivemos a oportunidade de aprender a trabalhar com Células-Tronco Mesenquimais (CTM), no qual tem apresentado um peso científico singular na literatura. Essas células, especialmente a do tecido adiposo, são promissoras, com potencial de aplicações terapêuticas em diversas patologias. Trouxemos

uma bagagem de conhecimentos que foram desenvolvidos e aplicados em nosso Laboratório de Pesquisa, obtivemos êxito, mas também, algumas adversidades. Todo esse processo resultou na aquisição de mais aprendizados, persistência e crescimento pessoal. Registro aqui, meu agradecimento a todos envolvidos durante essa trajetória, e encerro fazendo das palavras de Marthin Luther King as minhas: “Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

Com relação aos achados do presente estudo, foi demonstrado que o Resveratrol (200mg/Kg e 400mg/Kg) exibiu efeitos antitumorais, promovendo ação positiva no tratamento *in vivo* do melanoma murino levando a redução significativa do volume e peso tumoral de maneira dose-dependente, com ocorrência no aumento das taxas de sobrevivência dos animais C56BL/6 que foram induzidos ao MTMSMC.

REFERÊNCIAS

1. Schatton T, Frank MH. Cancer stem cells and human malignant melanoma. *Pigment cell & melanoma research*. 2008;21(1):39-55.
2. Nikolaou V, Stratigos A. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. *British journal of dermatology*. 2014;170(1):11-9.
3. Demierre M-F. Epidemiology and prevention of cutaneous melanoma. *Current treatment options in oncology*. 2006;7(3):181-6.
4. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *The Lancet*. 2005;365(9460):687-701.
5. DA SILVA-INCA JAG. Ministério da saúde instituto nacional de câncer José Alencar Gomes da Silva-Inca. Acessado em. 2020;20.
6. Wagner JD, Bergman D. Primary cutaneous melanoma: surgical management and other treatment options. *Current treatment options in oncology*. 2003;4(3):177-85.
7. Koh HK. Melanoma screening: focusing the public health journey. *Archives of dermatology*. 2007;143(1):101-3.
8. Gloster Jr HM, Brodland DG. The epidemiology of skin cancer. *Dermatologic Surgery*. 1996;22(3):217-26.
9. Read J. Recent advances in cutaneous melanoma: towards a molecular model and targeted treatment. *Australasian Journal of Dermatology*. 2013;54(3):163-72.
10. Haass NK, Smalley KS, Li L, Herlyn M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment cell research*. 2005;18(3):150-9.
11. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer of the Breast: From Cancer: Principles & Practice of Oncology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2016.
12. Whiteman DC, Pavan WJ, Bastian BC. The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. *Pigment cell & melanoma research*. 2011;24(5):879-97.
13. Brandner JM, Haass NK. Melanoma's connections to the tumour microenvironment. *Pathology*. 2013;45(5):443-52.
14. Swetter SM, Tsao H, Bichakjian CK, Curiel-Lewandrowski C, Elder DE, Gershenwald JE, et al. Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2019;80(1):208-50.
15. Wainstein AJ, Belfort FA. Conduta para o melanoma cutâneo. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 2004;31(3):204-14.
16. Edge SB, Byrd DR, Carducci MA, Compton CC, Fritz A, Greene F. *AJCC cancer staging manual*: Springer New York; 2010.

17. Balch CM, Gershenwald JE, Soong S-j, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of clinical oncology*. 2009;27(36):6199.
18. Gershenwald JE, Scolyer RA. Melanoma staging: American joint committee on Cancer (AJCC) and beyond. *Annals of surgical oncology*. 2018;25(8):2105-10.
19. Dummer R, Hauschild A, Lindenblatt N, Pentheroudakis G, Keilholz U. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2015;26(suppl_5):v126-v32
20. Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park, NY)*. 2009;23(6):488.
21. Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(4):813-24.
22. no SUS–CONITEC IdT. Ministério da Saúde Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. 2018.
23. Rubin KM, editor *Management of primary cutaneous and metastatic melanoma. Seminars in oncology nursing*; 2013: Elsevier.
24. Apalla Z, Nashed D, Weller RB, Castellsague X. Skin cancer: epidemiology, disease burden, pathophysiology, diagnosis, and therapeutic approaches. *Dermatology and therapy*. 2017;7(1):5-19.
25. Garbe C, editor *Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma-2005. 6th World Congress on Melanoma-Book of abstracts Vancouver; 2005*
26. Bertelli AA, Das DK. Grapes, wines, resveratrol, and heart health. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2009;54(6):468-76.
27. Wu JM, Wang Z-R, Hsieh T-C, Bruder JL, Zou J-G, Huang Y-Z. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine. *International journal of molecular medicine*. 2001;8(1):3-17.
28. Nakata R, Takahashi S, Inoue H. Recent advances in the study on resveratrol. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2012;35(3):273-9.
29. Goswami SK, Das DK. Resveratrol and chemoprevention. *Cancer letters*. 2009;284(1):1-
30. Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer research*. 2004;24(5A):2783-840.
31. Mazué F, Delmas D, Murillo G, Saleiro D, Limagne E, Latruffe N. Differential protective effects of red wine polyphenol extracts (RWEs) on colon carcinogenesis. *Food & function*. 2014;5(4):663-70.

32. Lin C, Crawford DR, Lin S, Hwang J, Sebuyira A, Meng R, et al. Inducible COX-2-dependent apoptosis in human ovarian cancer cells. *Carcinogenesis*. 2011;32(1):19-26.
33. Tsan M-f, White JE, Maheshwari JG, Chikkappa G. Anti-leukemia effect of resveratrol. *Leukemia & lymphoma*. 2002;43(5):983-7.
34. Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell cycle*. 2008;7(8):1020-35.
35. Kondratyuk TP, Park EJ, Marler LE, Ahn S, Yuan Y, Choi Y, et al. Resveratrol derivatives as promising chemopreventive agents with improved potency and selectivity. *Molecular nutrition & food research*. 2011;55(8):1249-65.
36. Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer NK. Resveratrol: French paradox revisited. *Frontiers in pharmacology*. 2012;3:141.
37. Beattie C, Tissot R, Amoss M, editors. Experimental models in human melanoma research: a logical perspective. *Seminars in oncology*; 1988.
38. Kreutz F. O laboratório de biologia tumoral-a cultura de células e os xenotransplantes. Fleck J Câncer: integração clínico-biológica Rio de Janeiro: MEDSI. 1992:337-52.
39. Wade TR, White JC. The histology of malignant melanoma. *The Medical clinics of North America*. 1986;70(1):57-70.
40. Junqueira LCU, Carneiro J, Abrahamsohn PA, Zorn TMT, Santos MFd, Gama P, et al. *Histologia básica*. 2008.
41. Liberato JD. *Tratado de anatomia aplicada: Poluss*; 1998.
42. Gartner LP, Hiatt JL. *Atlas colorido de histologia: Grupo Gen-Guanabara Koogan*; 2000.
43. Bordeaux JS, Lu KQ, Cooper KD, editors. *Melanoma: prevention and early detection. Seminars in oncology*; 2007: Elsevier.
44. Li W, Sanki A, Karim RZ, Thompson JF, Soon Lee C, Zhuang L et al. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Pathology*. 2006 Aug;38(4):287-301
45. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *cell*. 2000;100(1):57-70.
46. Halaban R, Miglarese M, Smicun Y, Puig S. Melanomas, from the cell cycle point of view. *International journal of molecular medicine*. 1998;1(2):419-44.
47. Chammas R, Duarte APM, Otake AH, Costa Md. *Genética e biologia molecular do melanoma e de sua progressão. Melanoma cutâneo localizado e linfonodo sentinela*. 2003.

48. Mangini J, Li N, Bhawan J. Immunohistochemical markers of melanocytic lesions: a review of their diagnostic usefulness. *The American journal of dermatopathology*. 2002;24(3):270-81.
49. Straume O, Smeds J, Kumar R, Hemminki K, Akslen LA. Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C> T polymorphism of CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase. *The American journal of pathology*. 2002;161(1):229-37.
50. Pecorino L. *Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics*: Oxford university press; 2012.
51. Mills JK, White I, Diggs B, Fortino J, Vetto JT. Effect of biopsy type on outcomes in the treatment of primary cutaneous melanoma. *The American Journal of Surgery*. 2013;205(5):585-90.
52. Kumar A, Dhar S, Rimando AM, Lage JM, Lewin JR, Zhang X, et al. Epigenetic potential of resveratrol and analogs in preclinical models of prostate cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2015;1348(1):1-9.
53. Tan L, Wang W, He G, Kuick RD, Gossner G, Kueck AS, et al. Resveratrol inhibits ovarian tumor growth in an in vivo mouse model. *Cancer*. 2016;122(5):722-9.
54. Howell RC, Revskaya E, Pazo V, Nosanchuk JD, Casadevall A, Dadachova E. Phage display library derived peptides that bind to human tumor melanin as potential vehicles for targeted radionuclide therapy of metastatic melanoma. *Bioconjugate chemistry*. 2007;18(6):1739-48.
55. Eggermont AM, Kirkwood JM. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years? *European journal of cancer*. 2004;40(12):1825-3
56. Takaoka M. Of the phenolic substrate of hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). *J Fac Sci Hokkaido Imper Univ*. 1940;3:1-16.
57. Renaud Sd, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*. 1992;339(8808):1523-6.
58. Freitas AAd, Detoni AM, Clemente E, Oliveira CCd. Determinação de resveratrol e características químicas em sucos de uvas produzidas em sistemas orgânico e convencional. *Revista Ceres*. 2010;57(1):1-5.
59. Sautter CK, Denardin S, Alves AO, Mallmann CA, Penna NG, Hecktheuer LH. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. *Food Science and Technology*. 2005;25(3):437-42.
60. Malhotra A, Nair P, Dhawan DK. Study to evaluate molecular mechanics behind synergistic chemo-preventive effects of curcumin and resveratrol during lung carcinogenesis. *PLoS One*. 2014;9(4).

61. Back JH, Zhu Y, Calabro A, Queenan C, Kim AS, Arbesman J, et al. Resveratrol-mediated downregulation of Rictor attenuates autophagic process and suppresses UV-induced skin carcinogenesis. *Photochemistry and photobiology*. 2012;88(5):1165-72.
62. Shakibaei M, Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol addiction: to die or not to die. *Molecular nutrition & food research*. 2009;53(1):115-28.
63. Athar M, Back JH, Tang X, Kim KH, Kopelovich L, Bickers DR, et al. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and applied pharmacology*. 2007;224(3):274-83.
64. Kundu JK, Surh Y-J. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives. *Cancer letters*. 2008;269(2):243-61
65. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 1997;275(5297):218-20.
66. Benayahoum A, Amira-Guebailia H, Houache O. A DFT method for the study of the antioxidant action mechanism of resveratrol derivatives. *Journal of molecular modeling*. 2013;19(6):2285-98.
67. Lee S-R, Jin H, Kim W-T, Kim W-J, Kim SZ, Leem S-H, et al. Tristetraprolin activation by resveratrol inhibits the proliferation and metastasis of colorectal cancer cells. *International journal of oncology*. 2018;53(3):1269-78.
68. Kim TH, Park JH, Woo JS. Resveratrol induces cell death through ROS-dependent downregulation of Notch1/PTEN/Akt signaling in ovarian cancer cells. *Molecular medicine reports*. 2019;19(4):3353-60
69. Garvin S, Öllinger K, Dabrosin C. Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts in vivo. *Cancer letters*. 2006;231(1):113-22.
70. Han Y, Jo H, Cho JH, Dhanasekaran DN, Song YS. Resveratrol as a tumor-suppressive nutraceutical modulating tumor microenvironment and malignant behaviors of cancer. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(4):925.
71. Del Follo-Martinez A, Banerjee N, Li X, Safe S, Mertens-Talcott S. Resveratrol and quercetin in combination have anticancer activity in colon cancer cells and repress oncogenic microRNA-27a. *Nutrition and cancer*. 2013;65(3):494-504.
72. Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, Telang N, Tanabe T, Inoue H, et al. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(34):21875-82.

73. Bishayee A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. *Cancer prevention research*. 2009;2(5):409-18. Francy-Guilford J, Pezzuto JM.
74. Mechanisms of cancer chemopreventive agents: a perspective. *Planta medica*. 2008;74(13):1644-50.

ANEXOS

ANEXO A – Normas do periódico *Phytotherapy*.



PHYTOMEDICINE

International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology



AUTHOR IN

ISSN: 0944-7113

PHYTOMEDICINE

International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology

Scope

Phytotherapy is primarily a therapy-oriented Journal, which publishes innovative studies on efficacy, safety, quality and mechanisms of action of specified plant extracts, phytopharmaceuticals and their purified constituents. This includes clinical and preclinical studies of properly standardized herbal medicinal products, herbal preparations and isolated compounds, which have reproducible pharmacological activity.

The journal covers the following sections:

- Trends in Phytopharmacology: innovative technologies and emerging concepts - Reviews
- Clinical pharmacology and toxicology
- Pre-clinical pharmacology and toxicology
- Mechanisms of action of herbal medicines and their active constituents
- Neuropharmacology
- Endocrine pharmacology
- Cancer
- Inflammation
- Infectious diseases
- Cardiovascular diseases
- Ageing associated disorders
- Quality of Herbal preparations/botanicals: adulteration, standardization, analysis
- Legislation of Herbal preparations/botanicals
- Current issues in Phytotherapy research (various topics which are not covered in all other volumes).

ANEXO B – Parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa e Bem-estar Animal da Universidade Estadual de Montes Claros para o projeto de pesquisa desenvolvido.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO E BEM-ESTAR ANIMAL



PARECER CONSUBSTANCIADO

Montes Claros, 20 de fevereiro de 2017.

Processo N.º 131

Titulo do Projeto: EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO, DO RESVERATROL NO SISTEMA UBIQUINA-PROTEASSOMA, NO CRESCIMENTO TUMORAL, NA OCORRÊNCIA DE METÁSTASE E NA CAQUEXIA ASSOCIADA AO MODELO SINGÊNICO DE MELANOMA CUTÂNEO EM CAMUNDONGOS C57Bl/6.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Maurício Batista de Paula

Histórico

O melanoma humano representa um tipo de câncer que ocorre a partir de alterações moleculares genéticas e epigenética em melanócitos localizados nos revestimentos mucoso e cutâneo e em órgãos internos. O melanoma cutâneo (MC) apresenta altas taxas de prevalência e de incidência em várias populações em todo o mundo sendo, portanto, um importante problema de saúde pública mundial. Frequentemente, o MC apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade devido à sua usual precocidade de disseminação metastática. Uma parcela importante dos pacientes com MC manifesta uma síndrome paraneoplásica conhecida como caquexia, caracterizada como uma progressiva consumação física decorrente principalmente de alterações do metabolismo proteico em fibras musculares esqueléticas. A caquexia promove um impacto significativamente negativo sobre a resposta terapêutica antineoplásica, a qualidade de vida e o tempo de sobrevida de indivíduos com câncer. Embora há muito reconhecida clinicamente, a caquexia associada ao câncer não responde às terapias atuais devido à complexidade dos distúrbios moleculares associadas a essa condição clínica.


Mérito

Avaliar os efeitos do exercício físico, do resveratrol no sistema ubiquinaproteassoma, no crescimento tumoral, na ocorrência de metástase e na caquexia associada ao modelo singênico de melanoma cutâneo em camundongos C57Bl/6.

Baseada nas Informações contidas no projeto e no Protocolo para uso de animais em Pesquisa o Projeto tem Mérito.

Parecer

A Comissão de Ética em Experimentação e Bem-Estar Animal da Unimontes analisou o processo 131 e entende que o mesmo está dentro das normas da Comissão Sendo assim, somos pela **APROVAÇÃO** do projeto de pesquisa.


Prof. Orlando Raphael Lopes Júnior
 Presidente da Comissão de Ética em Experimentação
 e Bem-Estar Animal da UNIMONTES