



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS



Bruna Nathália Santos

Efeitos inibitórios do Resveratrol na atividade migratória de células de Melanoma cutâneo murino e na formação de metástases pulmonares: avaliações *in vitro* e *in vivo*

Montes Claros
2020

Bruna Nathália Santos

Efeitos inibitórios do Resveratrol na atividade migratória de células de Melanoma cutâneo murino e na formação de metástases pulmonares: avaliação *in vitro* e *in vivo*

Dissertação de Mestrado 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 Mauricio Batista de Paula

Coorientadora: Profa. Dra. Ludmilla Regina de Souza David

Montes Claros
2020

S237e

Santos, Bruna Nathália.

Efeitos inibitórios do Resveratrol na atividade migratória de células de melanoma cutâneo murinho e na formação de metástases pulmonares [manuscrito] : avaliações *in vitro* e *in vivo* / Bruna Nathália Santos. – Montes Claros, 2020.

50 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. Ludmilla Regina de Souza David.

1. Melanoma cutâneo. 2. Metástase. 3. Ensaio de migração celular. 4. Modelo Murino de Metástase Pulmonar. I. Paula, Alfredo Maurício Batista de. II. David, Ludmilla Regina de Souza. III. Universidade Estadual de Montes Claros. IV. Título. V. Título: Avaliações *in vitro* e *in vivo*.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS-UNIMONTES

Reitor: Prof. Antonio Alvimar Souza

Vice-reitora: Profa. Ilva Ruas de Abreu

Pró-reitora de Pesquisa: Profa. Clarice Diniz Alvarenga Corsato

Coordenadoria de Controle e Acompanhamento de Projetos: Prof. Virgílio Mesquita Gomes

Coordenadoria de Iniciação Científica: Profa. Sônia Ribeiro Arrudas

Coordenadoria de Inovação Tecnológica: Profa. Sara Gonçalves Antunes de Souza

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

Coordenadoria de Pós-graduação Lato-sensu: Prof. Luís Ricardo Fernandes da Costa

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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenador: Alfredo Maurício Batista de Paula

Coordenadora Adjunta: Marise Fagundes Silveira



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



MESTRANDA: BRUNA NATHALIA SANTOS

TÍTULO DO TRABALHO: "EFEITOS INIBITÓRIOS DO RESVERATROL NA ATIVIDADE MIGRATORIA DE CÉLULAS DE MELANOMA CUTÂNEO MURINO E NA FORMAÇÃO DE METÁSTASES PULMONARES: AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO*".

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MECANISMOS E ASPECTOS CLINICOS DA DOENÇA

LINHA DE PESQUISA: ETIOPATOGENIA E FISIOPATOLOGIA DAS DOENÇAS

BANCA EXAMINADORA (MEMBROS TITULARES)

PROF. DR. ALFREDO MAURÍCIO BATISTA DE PAULA - ORIENTADOR

PROF.ª DR.ª LUDMILA REGINA DE SOUZA DAVID- COORIENTADORA

PROF DR. VINÍCIUS DIAS RODRIGUES

PROF. DR. JOÃO MARCUS OLIVEIRA ANDRADE

BANCA EXAMINADORA (MEMBROS SUPLENTE)

PROF. DR. OTÁVIO CARDOSO FILHO

PROF.ª DR.ª LUCYANA CONCEIÇÃO FARIAS

ASSINATURAS

Vinicius Dias Rodrigues
João MO Andrade

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 a todos aqueles que me apoiaram e incentivaram durante a minha trajetória acadêmica e profissional, e que com carinho ajudaram na concretização dessa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus porque sem a força que vem dEle nada disso seria possível e eu não teria chegado tão longe.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Alfredo, pelo seu conhecimento passado e por ter me auxiliado em tantas dúvidas que surgiram nessa caminhada.

A minha coorientadora, Ludmilla, por todos os momentos de trabalho contínuo, de estabelecimento de metodologias e protocolos, e pela paciência.

Agradeço aos membros da minha banca de avaliação, que tão prontamente estiveram disponíveis em se fazer presente e garantir as suas contribuições para o melhor fechamento do meu trabalho.

Agradeço à CAPES por conceder a bolsa de estudos que permitiu a minha completa dedicação a pesquisa.

Agradeço a todos os professores, aqui do Programa PPGCS e também aqueles que me acompanharam durante a graduação de uma forma mais próxima, que transmitiram os seus conhecimentos de uma forma muito gentil e que me auxiliaram nessa jornada. Em especial deixo o meu agradecimento ao prof. Marcos Macedo, que foi quem primeiro me apresentou a pesquisa e me incentivou a trilhar esse caminho.

O meu maior agradecimento vai aos meus pais, que em todos os momentos estiveram ao meu lado me apoiando para não desistir. Houveram muitos momentos em que a dúvida em mim mesma se apresentou no meu caminho, mas vocês se fizeram presentes em seu papel de pais e de amigos, com suas palavras de consolo, incentivo e fé, e graças a vocês eu posso hoje passar por mais essa etapa. Pedro, obrigada por acreditar em mim, muito do que eu faço é tentando ser um bom exemplo para você. Lucas, muito obrigada por me mostrar um caminho lindo e sempre deixar tão claro o quanto você se orgulhava de mim e sabia que eu ia longe, o seu incentivo sempre foi um dos maiores pilares. A minha família, no geral, muito obrigada.

Agradeço aos colegas das disciplinas que foram tão importantes no compartilhamento de diferentes experiências e fizeram o cumprimento dos créditos ser muito mais prazeroso ao lado de vocês, com nossos cafezinhos pós-aula. Principalmente agradeço de coração aos amigos que fiz durante esses dois anos, Nayra, Walter, Priscila e Vitória. A amizade que a gente criou vai muito além da pesquisa, e sou muito grata por passar todos os perrengues que a pesquisa (e a vida) trouxeram e irão trazer ao lado de vocês. Em especial deixo o meu muito obrigada a Walter, que com todo o seu otimismo sempre viu o melhor em mim e mesmo assim sempre me incentivou a ser o melhor que eu poderia ser. Obrigada por essa amizade que se iniciou na graduação, e que tem trilhado com tanta força e carinho tanto no âmbito profissional e principalmente o pessoal.

As minhas amigas da vida, obrigada por estarem comigo em mais esse momento. Me orgulho muito de todos esses anos que percorremos juntas e o quanto assistimos de camarote e torcemos

tanto pelas vitórias de cada uma de nós. Jadson, nossos caminhos se distanciaram, mas eu agradeço muito por cada palavra de apoio e incentivo que veio de você durante todo esse tempo, foram muito importantes para eu estar aqui hoje.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa, agradeço por cada conhecimento compartilhado e risadas nos nossos momentos de descontração. Agradeço em especial a Magda, Vinícius e Otávio por terem me ensinado tanto enquanto eu ainda os acompanhava como aluna de Iniciação Científica. Agradeço com muito carinho aos alunos de Iniciação Científica que me auxiliaram, Lorrane, Gabriel, Bruna e Isabella. Vocês foram um pilar de extrema importância para esse trabalho ter criado forma e ter sido realizado. Espero que vocês possam ter aprendido algo comigo, assim como aprendi com vocês.

Diversas pessoas passaram por minha vida e me auxiliaram a chegar e aqui, e a todos que direta ou indiretamente me apoiaram, me incentivaram e estiveram comigo, muito obrigada.

“A felicidade só é real quando compartilhada”

Christopher J. McCandles

RESUMO

A metástase é um processo patológico caracterizado pelo desprendimento das células do tumor primário para a corrente sanguínea ou vasos linfáticos, até atingir órgãos alvos distante, e é responsável pelo baixo prognóstico e aumento da morbidade associada ao câncer. O melanoma é um tipo de câncer de pele com grande potencial metastático, devido a características intrínsecas dos melanócitos. Além disso, apresenta grande resistência aos tratamentos existentes, e por este motivo novas abordagens terapêuticas para o melanoma metastático têm sido buscadas. Resveratrol (Resv) é um composto naturalmente encontrado em alguns alimentos, como a uva, e apresenta uma grande gama de efeitos benéficos para a saúde humana, agindo em diversas vias de sinalização. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do Resv sobre a migração de células de melanoma cutâneo murino *in vitro*, e na formação de metástases pulmonares a partir de um modelo de melanoma metastático singênico. Células da linhagem B16F10 de melanoma cutâneo murino, foram utilizadas nos ensaios *in vivo* e *in vitro*. Para o ensaio de migração celular 4×10^5 células B16F10 foram plaqueadas e após 24 horas de incubação foram tratadas com Resv nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ e uma fissura foi feita na placa. As células foram incubadas por mais 48 horas e posteriormente foram analisadas. Para estabelecer o modelo *in vivo* de metástase pulmonar singênico, 5×10^5 células B16F10 foram inoculadas intravenosamente pela veia caudal de camundongos C57BL/6. Os camundongos receberam Resv 400 mg/Kg ou PBS (grupo controle), diariamente por meio de gavagem, por 23 dias antes da inoculação das células e por mais 20 dias após a inoculação. Os animais foram eutanasiados, os pulmões foram retirados e análises histopatológicas e histomorfométricas foram realizadas. O Resv significativamente ($p < 0,05$) diminuiu a atividade migratória das células B16F10 *in vitro*, de forma dose-dependente. No modelo de metástase pulmonar, a administração do Resv400 reduziu o desenvolvimento de metástases pulmonares em camundongos C57BL/6. Os pulmões dos camundongos tratados com Resv apresentaram menor quantidade e área de nódulos metastáticos, quando comparado com o grupo controle, com alto tamanho de efeito. O Resv possui atividade anti-migratória nas células B16F10 e apresenta um potencial anti-metastático nos pulmões de camundongos C57BL/6.

Palavras-chave: 3,4',5-trihidroxestilbeno. Melanoma cutâneo. Metástase. Ensaio de migração celular. Modelo Murino de Metástase Pulmonar.

ABSTRACT

The metastasis is a pathological process characterized by the detachment of cells from the primary tumor into the bloodstream or lymphatic vessels, until reaches distant target organs, and is responsible for the low prognosis and increased morbidity associated with cancer. Melanoma is a skin cancer type with a great metastatic potential, due intrinsic characteristics of melanocytes. Besides that, melanoma shows resistance to existents treatments, and for this reason new therapeutic approaches have been sought. Resveratrol (Resv) is a compound naturally found in some foods, such as grapes, and has a wide range of beneficial effects on human health, acting in several signaling pathways. The aim of this study was to investigate the effect of Resv in the migration of B16F10 murine cutaneous melanoma cells *in vitro*, and in the formation of lung metastases in a model of syngeneic metastatic melanoma. B16F10 murine cutaneous melanoma cells were used in *in vivo* and *in vitro* assays. To the migration assay, 4×10^5 B16F10 cells were seeded, and after 24 hours of incubation they were treated with Resv at concentrations 25, 50, and 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and a wound was made in the plate. The cells were incubated for further 48 hours and were analysed. To establish the syngenic model of lungs metastasis *in vivo*, 5×10^5 B16F10 cells were inoculated intravenously through the tail vein of C57BL/6 mice. The mice received Resv 400 mg/Kg or PBS (control group), daily by gavage, for 23 days before inoculation and for further 20 days after inoculation. The mice were euthanized, the lungs were removed and histopathological and histomorphometric analyzes were performed. Resv significantly ($p < 0,05$) decreased the migratory activity of B16F10 cells *in vitro*, in a dose-dependent manner. In the lung metastasis model, the Resv400 administration reduced the development of lung metastases in C57BL/6 mice. The lungs of mice treated with Resv400 showed less amount and area of metastatic nodules, when compared with control ones, with a high size effect. Resv has an anti-migratory activity on B16F10 cells and showed an anti-metastatic potential on the lungs of C57BL/6 mice.

Keywords: 3,4',5-trihydroxystilben. Cutaneous Melanoma. Metastasis. Migration Assay. Murine Modelo of Lungs Metastasis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Metástases	12
2.2 Melanoma Cutâneo	15
2.3 O fenômeno metastático do Melanoma cutâneo	18
2.4 Resveratrol	21
2.4.1 Potencial terapêutico antineoplásico adjuvante do resveratrol no melanoma cutâneo	23
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivos Específicos	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Reagentes	26
4.2 Teste de Piloto	26
4.3 Cultivo Celular	28
4.4 Ensaio de Migração das Células B16F10	28
4.5 Modelo Animal de Melanoma Metastático Pulmonar	29
4.6 Análises histopatológicas e histomorfométricas do tecido pulmonar	30
4.7 Análise Estatística	31
5 PRODUTO	32
5.1 Produto 1: Inhibitory Effects of Resveratrol on Migration of B16f10 Mouse Cutaneous Melanoma Cells and Lungs Metastasis: In Vitro and In Vivo Assays.....	33
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXOS.....	48

1 INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo (MC) é um tipo de câncer de pele que possui grande potencial metastático devido a características intrínsecas das suas células de origem, e por este motivo é responsável pelas maiores taxas de morbimortalidade entre os tipos de câncer de pele existentes, apesar de possuir uma menor taxa de incidência. Quando ainda em localização *in situ* primária, o MC costuma ser tratável por excisão cirúrgica, mas mesmo nessa fase ele já apresenta alguma resistência a quimioterápicos e a radioterapia. Quando o processo de metástases ocorre, o nível de resistência ao tratamento é elevado, gerando um baixo prognóstico e uma taxa de sobrevida menor que 5% em 5 anos (Mendenhall et al., 2017; Quail & Joyce, 2013).

A metástase é parte do processo de progressão do câncer, definido pela liberação de células malignas do tumor primário para a corrente sanguínea e subsequente desenvolvimento de novas colônias tumorais em órgãos distantes. Diversos mecanismos biológicos são necessários para a mudança no microambiente tumoral e no desenvolvimento do nicho pré-metastático, que são induzidas por diversos fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e vias de sinalização relacionadas (Valastyan & Weinberg, 2011; Yeung & Yang, 2017).

O processo metastático é o principal responsável pelas altas taxas de morbimortalidade relacionadas aos mais diversos tipos de câncer, devido ao seu caráter sistêmico e a resistência aos tratamentos quimioterápicos e radioterápicos padrões já existentes. Além disso, os tratamentos existentes possuem uma variedade de efeitos colaterais que auxiliam na diminuição da qualidade de vida do paciente. Por este motivo, novas abordagens terapêuticas tem sido buscadas, e compostos naturais tem sido uma importante aposta (Mendenhall et al., 2017).

O Resveratrol (Resv) é um composto naturalmente encontrado em diversas plantas, principalmente na casca e sementes da uva, e apresenta uma grande variedade de efeitos na saúde, como atividade anti-inflamatória, anti-oxidante, anti-angiogênica e anti-tumoral. Suas mais diversas atividades em alguns tipos de câncer têm sido discutidas e o seu potencial como opção adjuvante no tratamento de diversas malignidades, inclusive o melanoma, tem ganhado atenção (Ko et al., 2017).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Metástases

O processo patológico metastático é definido pela disseminação de células malignas presentes no tumor primário, a partir de vias hematogênicas, linfáticas e neurais, para órgãos distantes onde há a formação de novos tumores, formando as metástases propriamente ditas. Apesar da metástase ser um processo ineficiente, em que apenas 0,01% das células tumorais que intravasam na corrente sanguínea são capazes de se estabelecer e formar microcolônias em órgãos distantes, 90% da mortalidade do câncer é atribuído a este processo e não ao tumor primário em si, devido a sua natureza sistêmica e a resistência intrínseca aos agentes terapêuticos já existentes (Quail & Joyce, 2013; Valastyan & Weinberg, 2011).

A invasão local é definida quando as células tumorais atingem o parênquima normal que circunda o tumor, processo que ocorre através da membrana basal. Em células normais, a membrana basal possui um importante papel, porém ela apresenta em sua composição fatores de crescimento que são liberados por proteases do tumor primário, que favorecem a iniciação de diversas vias celulares que alteram a polaridade das células tumorais e permite uma maior taxa de proliferação, invasão e sobrevivência celular, fazendo assim com que as células tumorais atinjam a circulação e se disseminem para órgãos distantes (Valastyan & Weinberg, 2011).

O principal mecanismo de espalhamento metastático das células tumorais é pela entrada das mesmas na corrente sanguínea ou vasos linfáticos, processo chamado de intravasamento. Este processo é mediado por alterações moleculares que promovem a passagem das células tumorais através da barreira de células endoteliais da corrente sanguínea, como por exemplo a liberação do fator de transformação de crescimento- β (TGF β), que aumenta a passagem das células tumorais através das paredes dos vasos sanguíneos (Valastyan & Weinberg, 2011). As células tumorais circulantes presentes na corrente sanguínea passam por uma variedade de estresses até atingirem o seu sítio metastático, causados por exemplo pela perda de adesão às integrinas – essenciais para a sobrevivência celular - e pelo sistema imune do hospedeiro. Neste processo, as plaquetas interagem com as células tumorais, formando um agregado protetor que impede o reconhecimento das mesmas por células do sistema imunológico, aumentando a taxa de sobrevivência dessas células e favorecendo a progressão tumoral. Ao atingirem o sítio metastático no órgão distante, as células passam pelo processo de extravasamento, onde saem do vaso condutor para dar entrada ao parênquima do órgão. Esse processo pode ser facilitado pelas plaquetas, que auxiliam na permeabilidade para a entrada das células (Quail & Joyce, 2013).

O processo de hipóxia nas áreas mais centrais do tumor primário, faz com que fatores, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) sejam liberados. O VEGF tem a função de formar novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, permitindo maior nutrição e oxigenação as áreas centrais do tumor primário. Além disso, o tumor primário é capaz de liberar outros fatores como EREG, COX-2 e MMP-2 que são capazes de perturbar o microambiente do órgão distante, auxiliando na preparação do ambiente pré-metastático. No parênquima do órgão distante, as células tumorais formam micrometástases que precisam se proliferar para formar as metástases propriamente ditas, porém, esse microambiente do órgão distante pode oferecer resistência a proliferação destas células, principalmente causadas pelo sistema imune (Valastyan & Weinberg, 2011). Sendo assim, as micrometástases formadas podem persistir no organismo por vários anos sem serem detectadas devido a dormência nessas células, causadas pelos mecanismos de equilíbrio entre a taxa de apoptose e de proliferação, parada das células na fase G0 do ciclo celular a da ação das células imunes do hospedeiro (Quail & Joyce, 2013).

É conhecido que as células tumorais têm preferência ao órgão secundário no qual irá desenvolver as metástases, ou seja, apesar de que as células se desprendam do tumor primário e circulem pelos vasos sanguíneos, as metástases só se desenvolverão em um órgão específico onde essas células poderão se adaptar para sobrevivência e proliferação. Assim o processo de desenvolvimento das metástases ocorre conjuntamente com diversos mecanismos, que permitem que o tumor primário secrete diversos fatores de crescimento, citocinas, exossomos e enzimas que alteram sistemicamente o órgão alvo, produzindo assim o nicho pré-metastático, que será o microambiente receptivo para as células tumorais circulantes (Quail & Joyce, 2013).

As células derivadas da medula óssea são cruciais na formação de um microambiente adequado para o tumor primário e para o desenvolvimento do nicho pré-metastático. O aumento da expressão da fibronectina atrai essas células até o sítio metastático que por sua vez secretam moléculas que permitem que o microambiente se torne um local favorável para a sobrevivência e proliferação das células tumorais circulantes (Descot & Oskarsson, 2013; Peinado et al., 2012).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas proteolíticas frequentemente expressas, que modificam os componentes da matriz celular alterando a sua capacidade de adesão e induz a liberação de fatores de crescimento presentes na matriz, promovendo a invasão das células malignas. As principais no processo de metástase são a MMP-2 e MMP-9, que atuam na degradação da membrana basal por proteólise, permitindo a invasão direta das células

malignas para o estroma, e auxiliam na ativação de TGF- β latente, induzindo a formação do nicho metastático e a angiogênese. Além do papel das plaquetas na sobrevivência das células tumorais circulantes na corrente sanguínea, elas ainda liberam fatores de crescimento que são importantes para a formação de nichos pré-metastáticos, enquanto citocinas pró-inflamatórias ajudam na sobrevivência e proliferação das células cancerígenas (Descot & Oskarsson, 2013; Valastyan & Weinberg, 2011).

Os exossomos são microvesículas de membrana com um papel na comunicação entre o tumor primário, células do hospedeiro e o sitio pré-metastático. Diversos tipos celulares como fibroblastos, células endoteliais e células progenitoras da medula óssea são direcionadas ao nicho pré-metastático pela ação dos exossomos, sendo importante na angiogênese, invasão e formação das metástases. Estudos tem mostrado que, em linhas celulares de melanoma, os exossomos aumentam a disseminação metastática pela indução de células derivadas da medula óssea no nicho metastático, que passam a assumir um fenótipo angiogênico, além de ser associado com a imunossupressão (Peinado et al., 2012; Quail & Joyce, 2013).

Além da formação do nicho pré-metastático, as células tumorais ainda passam por um importante processo chamado de Transição Epitelial-Mesenquimal (TEM), processo no qual as células tumorais perdem suas características epiteliais, como adesão e polaridade, e adquirem características mesenquimais, que possuem uma maior capacidade migratória, de invasão, maior produção de componentes da matriz extracelular e resistência a apoptose. A TEM têm seu início pela ativação e aumento da expressão de fatores transcripcionais como Slug, Snail, Twist, ZEB e ZEB2, moléculas que induzem o fenótipo mesenquimal nas células, e que diminuem a expressão de marcadores epiteliais, como a E-caderina, que é um fator chave para a manutenção do fenótipo epitelial das células (Valastyan & Weinberg, 2011). No processo tardio da metástase, isto é, quando as células tumorais já atingiram o seu nicho pré-metastático, as células passam por um processo inverso, conhecido como Transição Mesenquimal-Epitelial (TME), onde as células voltam a adquirir o fenótipo epitelial e dão início a sua proliferação (Adler, Haydon, McLean, Kelly, & Mar, 2017; Quail & Joyce, 2013; Valastyan & Weinberg, 2011).

Os principais mecanismos para a formação do nicho pré-metastático e desenvolvimento das metástases é demonstrado na Figura 1.

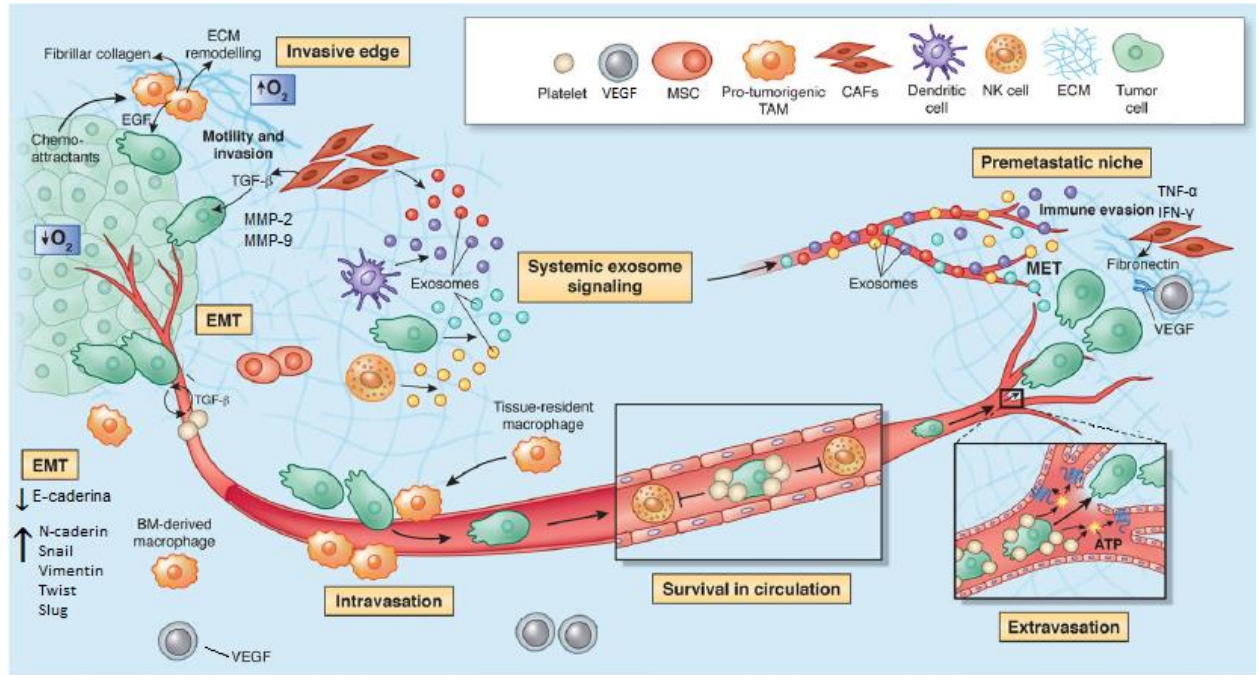


Figura 1: Representação esquemática sobre a formação do nicho pré-metastático e o desenvolvimento das metástases. Alterações no ambiente tumoral permitem que diversos fatores sejam liberados do mesmo e do estroma circundante que perturbam o órgão distante, formando o nicho pré-metastático, ambiente este adaptado para a proliferação e sobrevivência das células desprendidas do tumor primário e o desenvolvimento das micrometástases. EMT: transição epitelial-mesenquimal; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; MMP-2 e MMP-9: metaloproteinase de matriz 2 e 9, respectivamente; MET: transição mesenquimal-epitelial; BM-derived macrophage: macrófagos derivados da medula óssea; TNF- α : fator de necrose tumoral α ; INF- γ : interferon γ ; MSC: células tronco mesenquimais; TAM: macrófagos associados ao tumor; CAF: fibroblastos associados ao câncer; ECM: matriz extracelular. Imagem adaptada de Quail & Joyce, 2013.

2.2 Melanoma Cutâneo

O melanoma cutâneo (MC) é um tipo de câncer de pele que se origina a partir dos melanócitos, células que produzem o pigmento melanina. Dentre os cânceres de pele, o MC representa 1% dos casos, apresentando a menor taxa de incidência entre eles, porém, mais que 80% das mortes por câncer de pele são causadas pelo melanoma, devido ao seu grande potencial de sofrer metástases (NICE, 2015). Segundo a GLOBOCAN realizada em 2018, a estimativa de novos casos para o melanoma cutâneo, para o ano de 2019, foi de 287.700 e foi estimado 60.700 mortes no mundo todo por essa malignidade (Ferlay et al., 2019). No Brasil, segundo o

INCA, a estimativa é de 8.450 novos casos para o ano de 2020, sendo 4.200 homens e 4.250 mulheres (INCA, 2020).

Diferentemente de outros tumores sólidos, o melanoma costuma atingir indivíduos jovens e de meia idade, tendo como idade média de diagnóstico, 57 anos. Em relação ao sexo, a incidência varia em diferentes estudos, mas há uma concordância que durante as idades mais jovens a incidência é mais comum em mulheres, e em idades mais avançadas costuma acometer mais pessoas do sexo masculino. O local mais acometido pelas lesões também difere pelo sexo, sendo mais comum nas costas no sexo masculino e nos membros no sexo feminino (Leonardi et al., 2018; Rastrelli et al., 2014).

Os fatores de riscos relacionados ao desenvolvimento do MC estão associados ao ambiente externo e a fatores internos do hospedeiro. Dentre os do hospedeiro, pode-se destacar o número de nevos melanocíticos congênitos e adquiridos, susceptibilidade genética e história familiar, e fatores físicos como a cor clara dos olhos e da pele, presença de sardas e sensibilidade ao sol. Como fatores de risco externos, o principal a ser destacado é a exposição à luz solar, devido a radiação ultravioleta (UV), especialmente a banda UVB. Dessa forma, a exposição intensa e intermitente, geralmente relacionada com queimaduras solares, estão associadas com o maior risco de desenvolvimento do melanoma (Leonardi et al., 2018; Rastrelli et al., 2014).

Ainda hoje a detecção precoce do melanoma é um dos principais fatores relacionados a diminuição da mortalidade, e a realização de exames patológicos continuam sendo o padrão ouro para o diagnóstico de lesões do MC. Normalmente, a lesão apresenta características clínicas que auxiliam na suspeita da lesão, características estas distribuídas no acrônimo ABCDE, que significa Assimetria, Bordas Irregulares, Coloração distinta no mesmo nevo, Diâmetro maior que 6 mm e Evolução, que funcionam como critério de alerta para população leiga e para profissionais da saúde não-dermatológicos. (Rastrelli et al., 2014).

O MC é subdividido em quatro classificações clínicas devido as suas características. O mais comum entre os tipos é o MC extensivo superficial, correspondendo a 70% do total dos casos, e é relacionado com a exposição intermitente ao sol. A lesão se apresenta em forma de pápula palpável, com uma variedade de cores, se origina de nevos pré-existentes e apresenta crescimento radial e metástases tardias. O MC nodular, é o segundo mais comum, e é mais frequente em homens e entre a faixa etária dos 50 e 60 anos. A lesão é nodular, elevada, com a coloração marrom, preta ou azulada, podendo se apresentar ulcerada. Possui apenas a fase de crescimento vertical, o que se relaciona com uma maior taxa de metástases. O MC lentigo maligno é pouco frequente e acomete mais idosos, em regiões de exposição crônica ao sol, principalmente cabeça e pescoço. A lesão se apresenta em várias cores, com bordas irregulares

e costuma apresentar vários centímetros de diâmetro. O MC lentiginoso acral é o menos comum e ocorre em regiões palmoplantares, mucosas e submucosas, e é o tipo mais comum em pessoas negras (Bandarchi, Ma, Navab, Seth, & Rasty, 2010; Rastrelli, Tropea, Rossi, & Alaibac, 2014).

Diversos parâmetros são avaliados na análise patológica da lesão para assim fazer o correto diagnóstico do MC e subsequente estadiamento da doença, o que irá auxiliar na determinação do tratamento adequado. O índice de Breslow avalia a profundidade em milímetros da lesão, enquanto o nível de Clark avalia a invasão das células malignas em 5 distintos níveis, variando de tumor presente na epiderme (Nível I) a tumor na camada da hipoderme (Nível V). Alguns fatores também devem ser reportados nos exames patológicos, como a presença de ulceração na lesão, o índice de taxa mitótica das células malignas (número de mitose dermal por mm²), crescimento vertical e invasão angiolinfática, que estão relacionadas com pior prognóstico do paciente (Brasil, 2013; Swetter et al., 2019). A biópsia do linfonodo sentinela também é importante para o diagnóstico e principalmente tratamento do melanoma, pois auxilia no estadiamento da doença e ajuda a determinar a necessidade de terapias adjuvantes (Castro et al., 2016).

A dermatoscopia também é um método diagnóstico do MC, realizado com o auxílio de um instrumento capaz de avaliar as lesões de forma não-invasiva. A sensibilidade do diagnóstico do melanoma por características clínicas chega a 70%, porém, quando associado com o exame dermatoscópico a sensibilidade pode chegar a 90% (Castro et al., 2015). Além da avaliação anatomopatológica, tem surgido novas tecnologias que podem ajudar na detecção das lesões do melanoma de forma molecular, como a técnica FISH (hibridização de fluorescência *in situ*) que detecta sequências de DNA mutadas usando probes marcadas (sensibilidade de 86,7% e especificidade de 95,4%), e o myPath test que consegue mensurar a expressão de mRNA e assim detectar e diferenciar genes de lesões benignas de malignas, com uma alta sensibilidade e especificidade (90% e 91%, respectivamente). Porém, apesar de funcionais, estes testes ainda não são altamente recomendáveis para o diagnóstico de rotina do melanoma, até o melhor critério de uso ser estabelecido (Ankeny et al., 2018; Knackstedt, Knackstedt, Couto, & Gastman, 2018; Swetter et al., 2019).

O MC, em lesão primária, localizada *in situ*, costuma ser curável, porém, quando o processo metastático se inicia há uma diminuição no prognóstico. A retirada cirúrgica do tumor do melanoma é o principal tratamento dessa malignidade, realizado com excisão de margens de segurança definidas pela espessura tumoral, reduzindo o risco de reincidências locais. A radioterapia não é uma abordagem comumente utilizada, sendo mais indicada quando o paciente é idoso ou quando o tumor se localiza em regiões de difícil ressecção cirúrgica, como

da cabeça e pescoço. A radioterapia também pode ser utilizada como adjuvante ao tratamento cirúrgico e de forma paliativa (Mendenhall et al., 2017; Stevens & McKay, 2006; Testori et al., 2009). Em relação a quimioterapia, a dacarbazina é o tratamento padrão para os pacientes com metástases sistêmicas e tumores primários inoperáveis, apresentando resposta em cerca de 10-20% dos pacientes, com taxa de recorrência média de 3 a 6 meses (Nieweg & Gallegos-Hernández, 2015). O MC demonstra ser insensível a várias terapias sistêmicas e a radioterapia, e isso ocorre provavelmente devido a origem de suas células funcionarem como proteção do organismo a danos no DNA causados pela exposição a raios ultravioletas, por exemplo, permitindo-as ser resistentes quando expostas a drogas citotóxicas, com uma taxa de resposta geral ao tratamento de 10% (Nieweg & Gallegos-Hernández, 2015; Wu & Cui, 2017).

2.3 O fenômeno metastático do Melanoma cutâneo

O melanoma cutâneo tem altas taxas de mortalidade principalmente devido a sua característica metastática, facilitadas por características próprias das células tumorais do melanoma, mutações genéticas e por alterações que ocorrem no microambiente tumoral (Leonardi et al., 2018). A metástase do MC pode ocorrer tanto por vias linfáticas quanto hematogênicas, e costuma ser classificada em: satélite, quando os nódulos estão à 2 cm de distância do tumor primário; em trânsito, quando o tumor dérmico ou subdérmico encontra-se em direção a drenagem linfática regional; e a metástase distante, onde as células malignas estão presentes além dos gânglios linfáticos regionais e frequentemente envolvem locais viscerais. Há estudos que mostram que sexo, localização anatômica do tumor primário e espessura do tumor são importantes fatores de risco para o desenvolvimento de metástases, enquanto idade, nível de invasão e subtipo histológico não impactam nesses fatores (Adler et al., 2017; GBM, 2017).

A localização do melanoma primário gera diferentes padrões de metástase, por exemplo, casos de MC com localização primária no tronco e membros superiores comumente desenvolvem metástases distantes, enquanto melanomas com localização primária nos membros inferiores ou região de cabeça e pescoço desenvolvem metástases satélites ou em trânsito. O baixo risco de metástases a distância do melanoma primário nos membros inferiores é associado com a grande cadeia de vasos linfáticos e a quantidade de linfonodos existentes até as células tumorais atingirem a corrente sanguínea, o que gera um melhor prognóstico para pacientes com esta localização de tumor primário quando comparados com outras localizações no corpo. Em contrapartida, cabeça e pescoço como localização primária do melanoma se relaciona a piores prognósticos devido a sua alta predição de metástase e baixa taxa de

sobrevivência associada (Adler et al., 2017). O melanoma é propenso a se metastatizar para órgãos específicos, em especial linfonodos, pulmão, fígado, cérebro e ossos. O local mais típico para a metástase visceral do melanoma são os pulmões, correspondendo cerca de 12 a 36% dos casos metastáticos. A localização pulmonar das metástases normalmente é assintomática e estão associadas com uma sobrevida de 10 a 11 meses, que é relativamente maior do que a encontrada em outras metástases viscerais (Braeuer et al., 2014; Leung, Hari, & Morton, 2012).

Já foi descrito como o MC é um tipo de câncer que apresenta altas taxas de casos metastáticos, e isso ocorre devido a características intrínsecas da origem do melanoma. Os melanócitos são células derivadas da crista neural, ou seja, mesmo em seu estado normal não-maligno, apresenta expressão de marcadores mesenquimais como a Vimentina, e normalmente, nevos apresentam a expressão de fatores de transcrição como o Slug. Ou seja, mesmo em estados iniciais do tumor primário, o melanoma já apresenta marcadores mesenquimais e metastáticos, e a junção desses fatores fazem com que menos mudanças sejam necessárias para que a Transição Epitelial Mesenquimal ocorra no melanoma quando comparado com outros tumores sólidos (Braeuer et al., 2014).

A inflamação é considerada um dos mais importantes fatores para o desenvolvimento do tumor primário e do nicho pré-metastático, e esse processo no melanoma é bem regulado por moléculas pró-inflamatórias, como por exemplo a Interleucina-8 (IL-8). A IL-8 possui efeito direto na indução da angiogênese, na invasão e migração das células e na produção de MMP-2, além disso, a IL-8 contribui com a promoção da quimiotaxia das células para o ambiente tumoral e pré-metastático. Um modelo experimental *in vivo* com camundongo *knockout* para CXCR2 (receptor de interleucina-8) mostrou que a falta da ativação da IL-8 levou a redução tumoral e da angiogênese, além de diminuir a metástase pulmonar experimental (Singh, Varney, & Singh, 2009). O Fator Ativador de Plaquetas (PAF) é outro exemplo importante na disseminação do melanoma, pois ela pode produzir um ambiente favorável para crescimento e sobrevivência das células, induzir a angiogênese, e levar a ativação de diversas células como queratinócitos, células endoteliais, macrófagos e fibroblastos, e induz a expressão de COX-2, IL-6 e IL-8. (Braeuer et al., 2014).

Os exossomos tem mostrado grande importância no desenvolvimento do melanoma metastático, e alguns estudos relataram que os exossomos derivados do melanoma, no sítio primário, têm um papel na indução do crescimento de tumores, apoiando a matriz extracelular e também iniciando o ambiente dos linfonodos para um estado pró-angiogênico. Em um estudo experimental *in vivo* foi mostrado que os exossomos derivados do melanoma contribuíram

ativamente para a metástase através do carreamento de proteínas que ativavam as células derivadas da medula-óssea para o sítio pré-metastático (Braeuer et al., 2014; Peinado et al., 2016).

Células de melanoma primário e do microambiente formado secretam TGF- β , que além de auxiliar em vários processos da metástase como já descrito, ainda auxilia a suprimir a resposta imune do hospedeiro. Além do TGF- β , há o aumento da expressão de TNF- α e IL-10, que contribuem ativamente para a imunossupressão, e o IFN- γ que promove a resposta inflamatória e aumenta a evasão imune das células malignas, a sobrevivência, proliferação e migração celular, principalmente sob condições de estresse causadas por queimaduras solares (Braeuer et al., 2014).

A taxa de sobrevivência em 5 anos de pacientes com melanoma metastático é menor que 5%. O principal tratamento quimioterápico convencional do melanoma é a dacarbazina, porém as suas taxas de resposta são baixas, variando de 10-20%, com resposta completa visto apenas em 5% dos pacientes. Estudos clínicos com tratamento adjuvante da dacarbazina associada com Interferon ou Interleucina-2 tem mostrado uma melhor eficácia, mas a quantidade de efeitos colaterais é maior e não há aumento da sobrevida geral quando comparado com a dacarbazina sozinha. Outras abordagens quimioterápicas são o vemurafenib, inibidor do gene BRAF-V600E mutado, e o ipilimumabe, anticorpo contra CRLA-4 (proteína T-linfócito-associada citotóxico 4). O vemurafenib, apesar de apresentar rápida resposta, todos os pacientes sofrem recidiva após pouco tempo de tratamento, além de apresentar vários efeitos colaterais. O ipilimumabe induz uma resposta imune do hospedeiro mais rápida, porém a morbidade consequente é alta. A diferença no tempo de sobrevida entre os tratamentos não é muito grande, em um estudo clinico por exemplo, a sobrevida aumentou em 2 meses em pacientes tratados com dacarbazina + ipilimumabe comparado com aqueles tratados apenas com dacarbazina, porém os efeitos colaterais foram extensos (Braeuer et al., 2014; Nieweg & Gallegos-Hernández, 2015; Wu & Cui, 2017).

As altas taxas de mortalidade do MC, o seu grande potencial metastático e a resistência relacionada ao tratamento da lesão, principalmente quando se perde a característica de lesão *in situ* é uma grande problemática, e por isso novas abordagens terapêuticas tem sido constantemente buscadas.

2.4 Resveratrol

O Resveratrol (Resv) é uma molécula bioativa, com estrutura do tipo estilbeno que compreende dois anéis fenólicos conectados por uma ligação dupla de estireno para produzir 3,4',0,5-trihidroxiestilbeno e ocorre tanto na isoforma *cis*-resveratrol quanto *trans*-resveratrol, sendo essa última mais estável entre as duas. Ele é encontrado em plantas, como uvas, amendoins, pinhas e berries, e também pode ser encontrado em produtos processados derivados dessas plantas, como o vinho. A concentração do resveratrol varia nas diferentes espécies de plantas e ele normalmente é produzido como forma de proteção a danos causados, como lesões mecânicas, infecção fúngica e exposição à radiação UV e ao ozônio. (Carter, D'Orazio, & Pearson, 2014; de la Lastra & Villegas, 2007; Ko et al., 2017).

Apesar de ser encontrado em compostos alimentares, a concentração do Resv encontrada nos alimentos não é suficiente para os efeitos encontrados nos estudos *in vivo*. Em uma dieta normal a ingestão de Resv é mínima, sendo muitas vezes necessário uma suplementação com o composto ativo. Além disso, o Resv é metabolizado muito rapidamente e consequentemente possui uma baixa bioviabilidade plasmática, mas em contrapartida, os níveis dos seus metabólitos como resveratrol-3-O-sulfato, resveratrol-4'-O-glucuronídeo e resveratrol-3-O-glucuronídeo costumam apresentar uma concentração média considerável, e é de conhecimento que essas moléculas podem exercer atividades semelhantes a molécula parental. Algumas abordagens para o aumento da bioviabilidade do Resv em humanos têm sido estudadas, como a combinação com outros fitoquímicos e a nanoformulação, que aumenta a estabilidade e a bioviabilidade da molécula (Ko et al., 2017; Pezzuto, 2019).

O Resv tem ganhado grande atenção científica devido a sua gama variada de benefícios a saúde, como efeito anti-idade, anti-inflamatório, anti-tumoral, cardioprotetor e neuroprotetor. Além disso atua modulando diversas vias celulares relacionadas a inflamação, estresse oxidativo, apoptose e angiogênese, e auxilia na inibição do crescimento e quimiosensibilização das células cancerígenas, apresentando além de tudo, baixa ou nenhuma toxicidade as células normais (Rauf et al., 2017).

O Resveratrol é um composto multialvos, ou seja, ele pode atuar em diversas vias moleculares distintas regulando vários mecanismos que podem alterar o processo de doença. Dessa forma, há uma grande variedade de efeitos que o Resv pode oferecer, e em um complexo sistema biológico ele pode agir em diversos mecanismos de forma simultânea, gerando uma maior gama de efeitos benéficos a saúde, que estudos *in vitro* não conseguem avaliar como um todo. Sendo assim, o efeito anti-tumoral do Resv pode estar relacionado a diversos mecanismos biológicos, como a parada do ciclo celular, angiogênese, indução da apoptose, diminuição da expressão de enzimas proteolíticas, entre outros, agindo assim em todos os estágios do câncer,

desde a sua iniciação até a promoção e progressão tumoral (Pannu & Bhatnagar, 2019; Pezzuto, 2019).

Diversos estudos de abordagem *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado os efeitos do Resv em diferentes vias de sinalização e mecanismos de ação que contribuem para o seu potencial anti-tumoral (Ko et al., 2017). Por exemplo, o efeito anti-proliferativo do Resv está associado a indução de apoptose, com o aumento de proteínas pró-apoptóticas e redução de anti-apoptóticas, como a Bcl-2 e Bcl-xl, e também associado a parada do ciclo celular envolvendo a expressão de ciclina D1 e CDK4, como mostrado em um estudo *in vitro* com células T24 de câncer de bexiga humano (Bai et al., 2010). Esse efeito também foi visto em modelo tumoral *in vivo* de câncer de pele em camundongos, induzido por DMBA e TPA, onde o Resv induziu a apoptose com um aumento da expressão de Bax e redução de Bcl-2, além de aumentar a expressão da proteína supressora tumoral p53 (Aziz, Reagan-Shaw, Wu, Longley, & Ahmad, 2005). Sua atividade também já foi avaliada em células câncer de ovário, onde a expressão de VEGF e HIF-1 α foram diminuídas, reduzindo a angiogênese tumoral (Cao, Fang, Xia, Shi, & Jiang, 2004), e o seu efeito foi também associado a redução da expressão de MMP-9 e aumento da expressão do seu inibidor TIMP-1, em células HepG2 de câncer de fígado (Weng et al., 2010), ambos mecanismos associados com a progressão tumoral e desenvolvimento do nicho pré-metastático. Em células A549 de câncer de pulmão, foi demonstrado que, após o tratamento com Resv, a expressão de E-caderina foi aumentada enquanto a expressão de marcadores associados a TEM, como Vimentina, Fibronectina, Snail e Slug foram reduzidas (Wang et al., 2013). Além disso, o efeito do Resv em associação com outras drogas também tem sido realizado, como por exemplo, em um estudo com células B16 de melanoma, o Resv em associação com 5-fluoracil demonstrou um efeito anti-angiogênico, inibição da proliferação celular, e alterou a expressão de COX-2, AMPK e VEGF, em um efeito sinérgico e potencializado quando comparado com qualquer um dos tratamentos sozinho (Lee, Koo, Park, & Kim, 2015).

Terapias convencionais para o câncer, como a quimioterapia, radioterapia, cirurgia e imunossupressão, possuem algumas limitações que estão relacionadas a geração de efeitos colaterais, que podem contribuir para o mau prognóstico do indivíduo, e ao desenvolvimento de resistência das células malignas contra a terapia utilizada (Ko et al., 2017). Sendo assim, é muito importante encontrar outras saídas para auxiliar no tratamento do câncer, e a aposta para produtos naturais é extensa devido aos seus diversos compostos biologicamente ativos e seus diversos mecanismos de ação no organismo (Pezzuto, 2019).

2.4.1 Potencial terapêutico antineoplásico adjuvante do resveratrol no melanoma cutâneo

Como descrito no tópico anterior, o resveratrol apresenta diversos mecanismos de ação dentro de um complexo sistema biológico, fazendo que o seu efeito anti-tumoral ocorra por diferentes mecanismos e vias de sinalização, dependendo do tipo de câncer. Por atuar de maneira variada, muitos estudos mostram diferentes formas que o Resv pode agir no melanoma cutâneo.

Em um estudo realizado em células de diferentes linhagens de melanoma, SbCl₂, HaCaT, A375, MV3, WM35, SK-MEL-3 and SK-MEL-5, foi visto que *in vitro* o Resv pode diminuir a proliferação dessas células. Para avaliação *in vivo* foi utilizada a linhagem A375 de melanoma humano, inoculada em camundongos imunodeficientes (SCID) pelos flancos, tratados com Resv ou DMSO (como veículo controle) em dose única, via injeção peritoneal, e o Resv significativamente reduziu o tamanho do tumor comparando os grupos. Além disso, os autores buscaram avaliar por qual via o Resv provavelmente agiu para inibir a proliferação do melanoma, tanto das células *in vitro* quanto do tumor *in vivo*. A expressão de miR-221, já identificado anteriormente como um microRNA super-expresso no melanoma, foi avaliada e demonstraram que o Resv inibiu a sua expressão em ambos os ensaios. Foi avaliado também por qual via este processo ocorria, e demonstraram que a via de sinalização NF- κ B, responsável por regular diversos genes envolvidos na morte, proliferação e diferenciação celular, além de contribuir para resistência a terapias, também foi inibida pelo Resv, sugerindo que o mesmo atue na inibição da proliferação de células de melanoma pela inibição da via NF- κ B/miR-221 (Wu & Cui, 2017).

O efeito pró-apoptótico do Resv nas células de melanoma também já foram estudadas, e em dois diferentes estudos foi encontrado uma similaridade na via de sinalização pela qual este processo ocorre. No primeiro destes estudos, utilizando linhas celulares de melanoma humano SK-MEL-28 e A375 foi visto um grande potencial apoptótico dessas células após tratamento com Resv. Para avaliar a associação da via de sinalização MAPK neste processo, foi avaliada a expressão de Erk1/2, p38 e SAPK/JNK, nas células tratadas com Resv ou DMSO, e foi encontrado que o tratamento com Resv aumentou a expressão de Erk1/2 fosforilada, sugerindo a sua ativação para o processo de apoptose ter acontecido (Niles et al., 2003). Em um estudo mais recente, utilizando as linhagens de melanoma humano MV3 e A375, foi visto que o tratamento com Resv diminui a proliferação e sobrevivência destas células. Foi também avaliada um aumento da degradação do DNA, a partir do acúmulo de γ H2AX nas

células e um aumento da degradação da proteína anti-apoptótica Bcl-2, regulados pelo aumento da expressão da via Erk1/2 (Zhao et al., 2018).

Outras vias de sinalização também já foram avaliadas com o tratamento com o resveratrol, como é o caso da via PI3K/AKT/mTOR. Essa via é importante na contribuição da regulação da autofagia, morte celular e proliferação, e já foi relatado em outros estudos que a sua ativação anormal contribui para manifestações patológicas do melanoma. Com isso, em um estudo utilizando células de melanoma murino B16F10 e células de melanoma humano A375 tratadas com Resv, foi visto que há um aumento do processo apoptótico, migratório e invasivo em ambas linhagens celulares. A partir da análise da expressão das moléculas da via PI3K/AKT/mTOR, foi visto que o tratamento com Resv inibiu a mesma, induzindo o processo de autofagia nas células de melanoma, retardando a proliferação tumoral (Gong & Xia, 2020).

A via Akt, uma das vias indutoras do processo de TEM, também foi avaliada em um estudo *in vivo* utilizando células B16BL6 inoculadas nos flancos de camundongos C57BL6 e outro ensaio com células B16F10 inoculadas via intravascular pela veia caudal de camundongos da mesma espécie, para modelo de metástase pulmonar. Em ambos experimentos, os animais tratados com Resv apresentaram menor volume tumoral e menor tamanho médio dos nódulos pulmonares encontrados. Também foi realizado ensaio *in vitro* com as células B16F10, e aquelas tratadas com Resv apresentaram inibição da atividade migratória e invasiva quando comparada com controle. A expressão de Akt foi avaliado tanto nas células quanto no tecido tumoral dos camundongos, e em ambos a sua expressão foi diminuída pelo tratamento com o Resv (Bhattacharya, Darjatmoko, & Polans, 2011).

Com estes resultados de diferentes estudos é possível visualizar alguns das diferentes vias celulares que o Resv pode agir para inibir o desenvolvimento do melanoma cutâneo e do seu processo metastático.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do resveratrol sobre a migração de células murinas de melanoma cutâneo B16F10 em ensaio *in vitro* e no desenvolvimento de metástases em modelo de metástase pulmonar em camundongos C57BL/6.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar a capacidade migratória de células B16F10 tratadas com resveratrol em ensaios *in vitro*.
- Estabelecer modelo singênico de metástase pulmonar com células de melanoma cutâneo murino em camundongos C57BL/6.
- Avaliar o efeito do resveratrol na ocorrência de focos metastáticos no pulmão de animais C57BL/6 em modelo de melanoma cutâneo murino metastático.
- Analisar aspectos morfométricos e morfológicos macroscópicos e microscópicos dos nódulos metastáticos pulmonares em camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo metastático pulmonar tratados com resveratrol e controles;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Todos os reagentes foram comprados pela Sigma-Aldrich (Poole, UK), exceto os citados aqui. O Resveratrol (SKU: HRES005), na isoforma *trans*-resveratrol, foi adquirido pela VitaJoy (Suzhou, CHI), o meio de cultura RPMI 1640 pela Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA USA), soro fetal bovino pela Euroclone (Milão, ITA). Os anestésicos quetamina e xilasina foram adquiridos pelo Bayer Laboratory (GER). A linhagem de células de melanoma cutâneo murino B16F10 foram gentilmente fornecidas pelo Dr Lope, M. T. P (Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais).

4.2 Testes Piloto

Para o estabelecimento do modelo de metástase pulmonar, foi realizado anteriormente ao experimento e resultados apresentados nesta dissertação, dois projetos-piloto. Ambos os testes foram feitos utilizando camundongos C57BL/6, com faixa etária de 6-8 semanas, com células B16F10 de melanoma cutâneo murino e por indução intravenosa via veia caudal, como no experimento final.

O primeiro piloto, realizado em Março/2018, foi feito com o objetivo de avaliar a quantidade células que seriam utilizadas para indução do modelo metastático pulmonar, determinar se a quantidade referida seria suficiente para o desenvolvimento dos nódulos dos pulmões e estabelecer qual seria o melhor protocolo de indução pela veia caudal, visto que camundongos são animais muito pequenos, a veia apresenta um pequeno calibre e, além disso, os camundongos C57BL/6 possuem a região caudal escura, devido a coloração da pelagem. O experimento foi realizado com 10 animais, onde todos foram inoculados sem divisão de grupos, e após anestesiados com solução de quetamina e xilasina, foram inoculados com 5×10^5 células B16F10, ressuspensas em 0,05 mL de PBS, pela veia caudal. A quantidade de células utilizadas foi a mesma determinada por estudos anteriores desse grupo de pesquisa, em experimentos de modelo de melanoma cutâneo singênico, com inoculação dorsal, nos camundongos de mesma espécie. Após 21 dias de inoculação, os animais foram eutanasiados e os pulmões foram retirados para avaliação do desenvolvimento de nódulos de forma macroscópica. A taxa de sucesso do desenvolvimento de nódulos pulmonares foi de 50%.

O segundo piloto, realizado em Maio/2018, foi feito com o intuito de simular o mesmo procedimento que seria realizado posteriormente no experimento. Para tentativa de maior quantidade de células atingirem corretamente a corrente sanguínea e os pulmões, e conseqüentemente aumentar a taxa de sucesso no desenvolvimento dos nódulos pulmonares, dois pesquisadores realizaram diversas simulações da indução pela veia caudal em camundongos C57BL/6 com solução salina. A partir dessas simulações, foi determinado que para melhor visualização das veias dos camundongos, uma compressa de água morna seria utilizada na cauda para dilatação das mesmas e posteriormente a solução seria inoculada. Além disso, foi utilizada uma luminária de bancada logo acima dos animais, para melhor visualização.

Neste segundo piloto, além de buscar uma melhor taxa de sucesso na indução, também buscamos avaliar se a dosagem de resveratrol seria suficiente para a diminuição de desenvolvimento dos nódulos, determinar quanto tempo de administração do resveratrol e PBS seria feito antes da indução e avaliar por quanto tempo após a indução os camundongos sobreviveriam. Com esses objetivos, foram utilizados 28 camundongos, divididos em dois grupos: um com administração de resveratrol em concentração de 400 miligramas por quilograma de peso corporal individual do camundongo, e um grupo com administração de solução tampão PBS, como controle. A dose de 400 mg/kg foi determinada em um estudo anterior deste mesmo grupo de pesquisa, com um modelo de melanoma cutâneo nodular singênico, inoculado com células B16F10 pelo dorso de camundongos C57BL/6. Neste estudo, as doses que apresentaram efeito anti-tumoral foram a de 200 mg/kg e 400 mg/kg, sendo que a de 400 mg/kg foi a que apresentou melhores efeitos, sem causar citotoxicidade nos camundongos, e por este motivo foi utilizada para o modelo de metástase pulmonar.

A administração foi iniciada 34 dias antes da inoculação de células, e após esse tempo, os animais foram anestesiados com solução quetamina e xilasina e foram inoculados com 5×10^5 células B16F10, ressuspensas em 0,05 mL de PBS, pela veia caudal, seguindo as orientações determinadas após as simulações de indução. A administração de resveratrol e PBS perdurou até o dia de eutanásia, realizada 22 dias após a inoculação, período este mostrado em estudos encontrados na literatura como período máximo de sobrevivência dos camundongos com nódulos nos pulmões (Bhattacharya et al., 2011; Chen et al., 2012).

Os pulmões dos camundongos foram retirados, os nódulos pulmonares foram contabilizados a olho nu e posteriormente foram fotografados e armazenados em formaldeído 10% para avaliações histológicas. A histologia e mensuração da área microscópica dos nódulos

foi realizada como descrita abaixo nessa mesma sessão. A taxa de sucesso da inoculação pela veia caudal subiu para 80%, e com a avaliação do peso diário dos camundongos durante o experimento, foi visto que entre os dias 18 e 20 de administração do resveratrol, os camundongos deste grupo começaram a apresentar redução no peso corporal, informação que nos permitiu determinar o período máximo de administração do resveratrol e PBS pré-inoculação.

O experimento apresentado nesta dissertação foi iniciado em Maio/2019, e o mês anterior foi marcado pela calibração dos pesquisadores para o procedimento de indução. Este experimento acatou as informações obtidas com o piloto, como: a quantidade de células utilizadas por camundongo (5×10^5 células B16F10, ressuspensas em 0,05 mL de PBS), a quantidade de camundongos utilizados (28), a quantidade de dias de administração das drogas pré-indução (21 dias), a quantidade de dias que os camundongos seriam mantidos até o sacrifício (20 dias), e a confirmação que a dose de resveratrol utilizada (400 mg/kg) funcionaria como dose terapêutica, sem causar nenhum sinal físico de citotoxicidade nos camundongos. A taxa de sucesso de indução foi de 94%.

4.3 Cultivo Celular

Células de melanoma cutâneo murino da linhagem B16F10 foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 0.27 mM ampicilina, 5.41 μ M anfotericina B e 0.06 mM estreptomicina, mantidas em ambiente úmido à 37 °C e 5% de CO₂.

Para a realização dos experimentos, as células B16F10 cultivadas ao atingirem confluência de 90% foram soltas das placas com tratamento em tripsina por 5 minutos, a 37 °C em 5% de CO₂. Quando desprendidas, a tripsina foi inativada com 10% de SFB, e as células foram centrifugadas (1000 rpm), ressuspensas em meio de cultivo RPMI e a concentração de células foi mensurada com auxílio de uma câmara de Neubauer espelhada e coloração de azul de tripano.

4.4 Ensaio de Migração das Células B16F10

Para avaliar a capacidade de migração celular, 4×10^5 células B16F10 foram semeadas em placas de 6-poços e foi aguardado 24 horas para a adesão das células a placa. Após 24 horas, foi feita uma lesão no meio dos poços, com o auxílio da ponta de uma

micropipeta estéril de 200 µL e os mesmos foram fotografados. As células foram tratadas com Resv em três diferentes concentrações, de 25, 50 e 100 µg/mL por 48 horas. Células B16F10 não tratadas com Resv foram usadas como controle e seguiram o mesmo processo das tratadas. A concentração do Resv utilizada foi determinada em ensaio prévio de viabilidade celular por MTT, onde as células B16F10 foram tratadas com Resv nas concentrações de 1,56 a 200 µg/mL (dados não apresentados). As concentrações escolhidas para o ensaio de migração apresentaram redução na viabilidade celular, mas manteve uma quantidade de células viáveis para realização dos experimentos.

Após as 48 horas de incubação, as células foram dissociadas da placa com tripsina, centrifugadas e ressuspensas com albumina de soro bovino e 200 mL de meio RPMI para a aquisição de novas imagens. As imagens foram feitas com o auxílio de um microscópio Olympus FSX100, acoplado a uma câmera Sony 3CCD, com aumento de 10x. O software ImageJ® foi usado para mensurar a área da fenda antes e após o tratamento com Resv. O experimento foi feito em triplicata e realizado em três ensaios independentes.

4.5 Modelo Animal de Melanoma Metastático Pulmonar

O estudo *in vivo* foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação e Bem-estar Animal (Protocolo: 131/2017 – ANEXO A). Camundongos C57BL/6, fêmeas, saudáveis, sem histórico de uso de qualquer droga, com idade de 6 a 8 semanas, foram utilizados no ensaio de Melanoma Metastático Pulmonar. Os camundongos foram mantidos no biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Unimontes, nas condições de temperatura a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de 60-70%, luz controlada com ciclos de 12h de claro/escuro, baixo nível sonoro < 40 dB, com livre acesso à água filtrada e ração balanceada (Purina-Labina®).

Os camundongos foram divididos em dois grupos: animais tratados com resveratrol em uma concentração de 400 mg para cada 1000 mg de peso corporal do camundongo, diluído com solução tampão PBS (Resv400; n = 13), e o segundo grupo com os animais tratados com PBS, caracterizando como grupo controle (Controle; n = 13). A administração do Resv foi iniciada 23 dias antes da indução tumoral, via oral, por meio de gavagem, sempre no período da manhã. A dosagem em ambos os tratamentos foi feita a partir do peso corporal dos camundongos, que foram mensurados diariamente.

Após os 23 dias de pré-tratamento, os camundongos foram anestesiados com quetamina e xilasina. A área da cauda sofreu assepsia local com álcool e 5×10^5 células B16F10,

ressuspensas em PBS, foram inoculadas via intravascular pela veia da cauda. Embora seja um modelo de indução que mimetize o processo metastático devido a passagem das células pela corrente sanguínea até a chegada aos pequenos capilares pulmonares, cada nódulo que se desenvolve na realidade é um tumor primário independente (da Silva, Melo, Bernardes, & Cecchini, 2016). Diariamente os animais foram pesados e tratados com Resv400 e PBS de acordo com o grupo em que foram alocados por mais 20 dias, totalizando 43 dias de tratamento, como demonstrada na Figura 2. Os animais foram sacrificados e os pulmões foram retirados. Os nódulos metastáticos presentes foram contados a olho nu por contagem mascarada e a área tumoral foi mensurada pelo Image J[®] Software. Os pulmões foram fixados em formaldeído à 10% e armazenados.

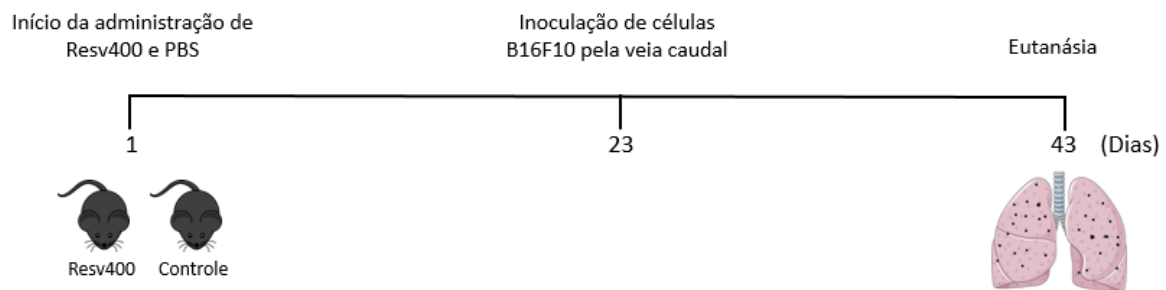


Figura 2: Representação da linha temporal no modelo de metástase pulmonar.

4.6 Análises histopatológicas e histomorfométricas do tecido pulmonar

Os pulmões armazenados e fixados em formaldeído à 10% foram processados em equipamento histotécnico automatizado (modelo MTP, Slee Technik GmbH, Mainz, Alem), onde os tecidos foram desidratados em quantidades crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 100%) por 1 hora em cada um. Posteriormente as amostras tomaram 3 banhos em xilol, com duração de 1 hora cada, para retirada do excesso de álcool, e em seguida foram submetidos a 3 banhos de 1 hora cada em parafina líquida aquecida para a infiltração no tecido. O tecido infiltrado foi emblocado em parafina com o auxílio de formas delimitadoras.

Os cortes histológicos foram feitos com auxílio de micrótomo histológico manual (modelo CUT5062, Slee Technik GmbH, Mainz, Alemanha), com cortes de 5 µm de espessura e intervalo regular de 50 µm entre cada corte. Os cortes foram aderidos a lâminas de vidro corretamente identificadas com o animal e o seu grupo de experimentação correspondente, e foram incubados em uma estufa a 50°C por 4 horas. Os cortes histológicos foram submetidos à coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E), para isso, as lâminas com os tecidos foram

hidratadas com quantidades decrescentes de álcool, coradas com a hematoxilina e posteriormente com a eosina, e foram novamente desidratadas e montadas com meio de montagem.

As lâminas coradas foram fotografadas pelo microscópio FSX100 (Olympus Scientific Solution), acoplado com uma câmera Sony 3CCD, com aumento de 10x. A área dos nódulos metastáticos foi mensurada pelo Image J[®] Software, e o resultado foi dado por média de grupos em μm .

4.7 Análise Estatística

Todos os dados do presente estudo foram apresentados como média \pm erro padrão (EP), em dois estudos independentes. O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi realizado para todos os dados, e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste Mann Whitney para dados não-paramétricos, usando o Graphpad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significante. O tamanho do efeito foi realizado para aqueles dados que não deram significância estatística.

5 PRODUTOS

5.1 Produto 1: *Inhibitory Effects of Resveratrol on Migration of B16F10 Mouse Cutaneous Melanoma Cells and Lungs Metastasis: In Vitro and In Vivo Assays*, formatado segundo as normas para publicação do periódico Nutrients (Anexo B).

5.1 PRODUTO 1

Inhibitory Effects of Resveratrol on Migration of B16F10 Mouse Cutaneous Melanoma Cells and Lungs Metastasis: *In Vitro* and *In Vivo* Assays

Bruna Nathália Santos ¹, Walter de Freitas Filho ¹, Valéria Couto Quintão ¹, Sérgio Henrique Sousa Santos ^{1,2}, Lucyana Conceição Farias ^{1,3}, André Luiz Sena Guimarães ^{1,3}, Ludmilla Regina de Souza David ¹, Alfredo Mauricio Batista De-Paula ^{1,3}

¹ Nucleus of Epidemiological and Molecular Research Catrumano. Health Research Laboratory. Health Science Post-graduate Programme. Universidade Estadual de Montes Claros, 39401-001, Montes Claros, MG, Brazil

² Institute of Agricultural Sciences, Food Engineering College, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Montes Claros, Brazil

³ Department of Dentistry. Universidade Estadual de Montes Claros, 39401-001, Montes Claros, MG, Brazil

* Correspondence: ambpatologi@gmail.com; Tel.: 55-21-38 32248380 (A.B.M.D.P)

Abstract: Background: Resveratrol (Resv) has received huge attention as a strategic agent for antineoplastic treatment, due his wide-range health effects. Metastasis is a pathologic phenomenon responsible for high morbidity rate and poor prognosis to individuals with cancer. The aim of this study is to investigate the effect of Resv on murine cutaneous melanoma cell migration and lung metastasis formation using a syngeneic mouse metastasis model. Material and Methods: B16F10 cutaneous melanoma cells were used in migration assay and were treated with different concentrations of Resv. To *in vivo* assay, B16F10 cells were inoculated through tail vein in C57BL/6, for induction of lungs metastasis model. Mice received Resv 400 mg/Kg, and control group received PBS, both for 23 days before the inoculation, and after that further 20 days. Mice were euthanized and lungs were removed to analysis. Results: Resv significantly reduced migratory ability of B16F10 cells *in vitro* ($p < 0,01$) and reduced the number and area of metastatic nodules in lungs of mice treated with Resv when compared with control ones, with a high size effect. Conclusion: Resv seems to contribute to decrease migration of B16F10 murine cutaneous melanoma cells and occurrence of lung metastasis in C57BL/6 mice.

Keywords: Metastatic Melanoma; 3,4',5-trihydroxystilbene; Lungs Metastatic Model.

1. Introduction

Resveratrol (Resv) is a natural polyphenolic compound, easily found available in a regular diet, specifically in plants, such as red grapes, peanuts, green tea, and berries. The structure of Resv is stilbene-based and comprises two phenolic rings connected by a styrene double bond to produce 3,4',5-trihydroxystilbene, which occurs in both chemical trans- and cis-isoforms. Resv has a wide-range health effects, including anti-oxidative, anti-inflammatory, cardio and neuroprotective, and important anti-tumor properties, and besides that, exhibits a much favorable safety profile for consumption with no or minimal toxicity to normal cells (Ko et al., 2017).

Resv has received huge attention due to its potential strategic use as an adjuvant agent for antineoplastic treatment. According to findings from many studies, it is capable to modulate multiple cellular-signaling pathways that are usually altered during tumorigenesis and progression of many solid cancers, including inhibition of metastasis (Bhattacharya et al., 2011; He et al., 2017; Wu & Cui,

2017). It has been hypothesized that the adjuvant use of Resv may effectively exert efficient antineoplastic effects when administered in conjunction with certain chemotherapeutic, due the chemosensitizing action in malignant cells (Lee et al., 2015; Rai, Mishra, Suman, & Shukla, 2016).

Metastatic process is defined by the detachment of cancer cells from primary malignant tumor aiming to reach distant organs. The metastatic process is related to the higher morbidity and poor prognosis, and is responsible for the most part of deaths caused by cancer. Once metastasis occur, surgical resection is no longer enough to treat cancers and chemotherapeutic approaches are necessary, which is accompanied by several side effects, decreasing patient's quality of life and survival rate (Faries et al., 2017; Quail & Joyce, 2013).

Melanoma is the most aggressive skin cancer, with high mortality rates due their great capacity of metastasize. Metastatic melanoma treatment is based in chemotherapy, but, normally that approaches only help in reduce tumor burden and symptoms, with no specific improvement in patients survival. Besides that, acquire resistance to treatment with chemotherapies can occur throughout multiple mechanisms, and in that way, metastatic melanoma remained associated with poor prognosis (Koppolu & Rekha Vasigala, 2018; Malissen & Grob, 2018; Winder & Virós, 2018).

In this study, we analyzed the effects of Resv on murine B16F10 cutaneous melanoma cell migration and on lungs metastasis formation in a syngeneic mouse lungs metastasis model in C57BL6 mice.

2. Materials and Methods

2.1 Reagents

All chemicals reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Poole, UK), unless otherwise stated. Resveratrol (SKU: HRES005), in *trans*-resveratrol isoform, was purchased by VitaJoy (Suzhou, CHI), RPMI 1640 medium from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA USA), fetal bovine serum from Euroclone (Milan, ITA). The anesthetics ketamine and xilasine were acquire from Bayer Laboratory (GER). The B16F10 murine cutaneous melanoma cell line were kindly provided by Dr Lope, M. T. P (Department of Pharmacology, Federal University of Minas Gerais, UFMG, Brazil).

2.2 Cell Culture

The B16F10 murine melanoma cell line was cultured in RPMI-1640 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 0.27 mM ampicillin, 5.41 μ M amphotericin B and 0.06 mM streptomycin, at 37°C and 5% CO₂ incubator. The number of cells needed for the experiments was determined by counting in Neubauer chambers using trypan blue stain.

2.3 Migration cell Assay

4×10^5 B16F10 cells were seeded in 6-well plates. After 24 hours for cell adhesion, a scratch was made using a 200 μ L sterile micropipette tip and the wells were photographed. Then, the cells were submitted to resveratrol in concentrations of 25 μ g/mL, 50 μ g/mL and 100 μ g/mL for 48 h. A group of control cells was incubated with phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) for the same period of time. The concentration of Resv used was determined previously by a MTT assay (data not showed). After that, 200 mL of RPMI medium was added before images acquisition. The images were obtained with the Olympus FSX100 microscope, coupled to a Sony 3CCD camera, at 10x magnification. Three photos were acquired of each group, before and after treatment. The ImageJ® software was used to measure the gap area before and after resveratrol treatment. The experiments were made in triplicate and in 3 independent assays.

2.4 Animals

Twenty-eight C57BL/6 female mice, 6-8 weeks old, were obtained from Animal Facility Center, from Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. Mice were maintained under controlled light (12 h of light/12 h of darkness), temperature ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) and relative air humidity (60-

70%) conditions, with free access to food and water consumption. Mice were separated into two groups of treatment: those treated with resveratrol at a dose of 400 mg to each 1000 mg of body weight of mice, diluted with PBS, (Resv400; n = 13); and the second group was treated with PBS, as a placebo, (control; n = 13). The Resv dosage was determined by results from previously studies performed (data not showed). The body weight was measured daily, and both, resveratrol and PBS were administered orally by gavage. The Resv administration (400 mg/kg) began 23 days before the inoculation of B16F10 cells, and continued after inoculation for a further 20 days, totalizing 43 days of experiment.

The *in vivo* study design 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).

2.4 Experimental lung metastasis tumor model

Mice were anesthetized, and injected with 5×10^5 B16F10 cells, intravenously, via tail vein. Although B16F10 cells have the characteristic of being metastatic, it is very difficult spontaneous metastasis occurs in a subcutaneously inoculated model, due to the characteristics of these cells to form an "encapsulated" tumor. In addition, animals usually die from cancer complications prior to metastatic process occur (Kee et al., 2017). In this model, each pulmonary nodule is actually an independent primary tumor, but due to the passage of cells through the bloodstream to find a microenvironment for growth and expansion, this model can consistently imitate the metastatic process (da Silva et al., 2016) as seen also in other studies (Kee et al., 2017; Zhang et al., 2015). After 21 days of inoculation and treatment with Resv400 and PBS, the mice were sacrificed, and lungs were collected. The lungs were photographed, and all visible surface metastases were quantified by masked counting. They were fixed in 10% formaldehyde and stored. The area from macroscopic nodules were measured by ImageJ® software.

2.5 Histopathologic and histomorphometric analyses

Lungs stored and fixed were processed in automated histotechnical equipment and paraffin-embedded. The paraffin blocks were submitted to 5 μm -thick sections and a regular interval of 50 μm -thick between each section, using a manual microtome (CUT5062, SLEE Technik GmbH, Mainz, GER). Tissue section was adhered on a glass slide, correctly identified, and placed in an incubator at 50°C for 4 hours, and then stained with hematoxylin and eosin (H&E). Hematoxylin has affinity for acid structures of cells, like nucleus, while eosin has affinity to cytoplasm structures, staining them in blue and orange, respectively. After staining process, the glass slides were assembled with the support of cover glass and mounting medium. Stained tissue sections were analyzed and photographed with an Olympus FSX100 microscope, coupled to a Sony 3CCD camera, in 10x magnification. The metastatic nodules area were measured by ImageJ® software, and the total number and size (mm^2) of the metastatic foci were given by group average.

2.6 Statistical Analyses

All quantitative data in the present study was shown as mean \pm standard error (SE) of two independent experiments. Shapiro's-Wilk normality test was performed, and statistical analyses was performed with Mann Whitney test, using Graphpad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Effect size was performed for all data without statistical significance.

3. Results

3.1. Resv inhibits B16F10 cell migration *in vitro*

The ability of cells to migrate is an important event in the progression of primary tumor to metastatic process. We investigated the migratory potential of B16F10 murine cutaneous melanoma cells after 48 hours treatment at different concentrations of Resv (Figure 1). All Resv concentrations used in this study (25, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) promoted an increase of scratch in a dose-dependent manner

compared to control cells (Figure 1A), demonstrating a decrease of migratory activity of B16F10 cells ($p < 0,05$; $p < 0,05$; and $p < 0,01$, respectively) (Figure 1B).

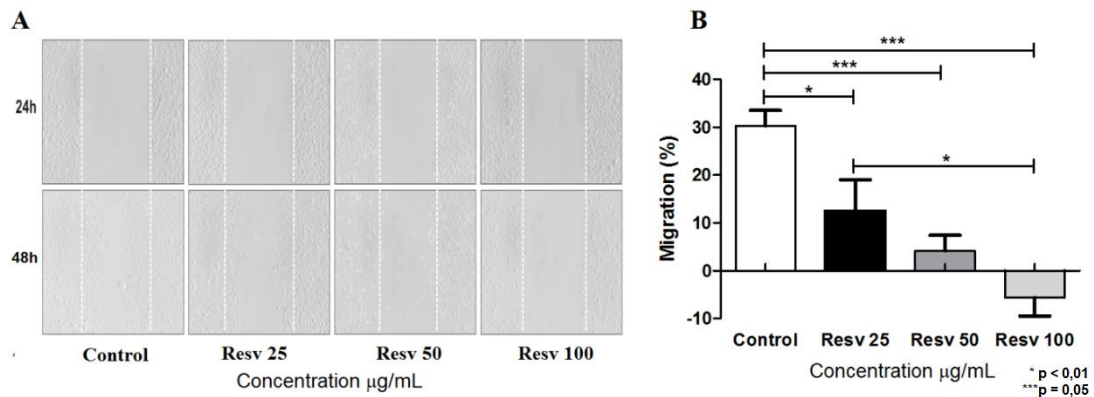


Figure 1. Effect of Resveratrol (Resv) on migration of B16F10 cells. (a) Cancer cell motility was determined by migration assay and the denuded zone was observed at 48 h after Resv treatment at 25 (Resv 25), 50 (Resv 50) and 100 $\mu\text{g/mL}$ (Resv 100). Images were photographed using a microscope at 10x magnification. (b) Decreasing of migratory area (%) in a significantly way when compared control cells and treated cells, in a dose-dependent manner. * $p < 0,01$ *** $p < 0,05$.

3.2. Resv produce less metastatic foci on lung surface

During all treatment period, the mice maintained the body weight and behave normally. There were no physical signs of toxicity caused by oral administration of Resv. In order to quantify and compare the occurrence of surface lung metastasis between experimental and control mice, animals were euthanized 20 days after tail intravenous injection of B16F10 cells. Control mice treated with placebo developed more lung metastases when compared to mice treated with Resv400, as shown on Figure 2B ($p = 0,0577$), however, reduction of the tumor surface area by Resv treatment was not paralleled with the nodule number change 2C ($p = 0,2110$). Both datas showed high size effect (0,58 and 0,57 respectively).

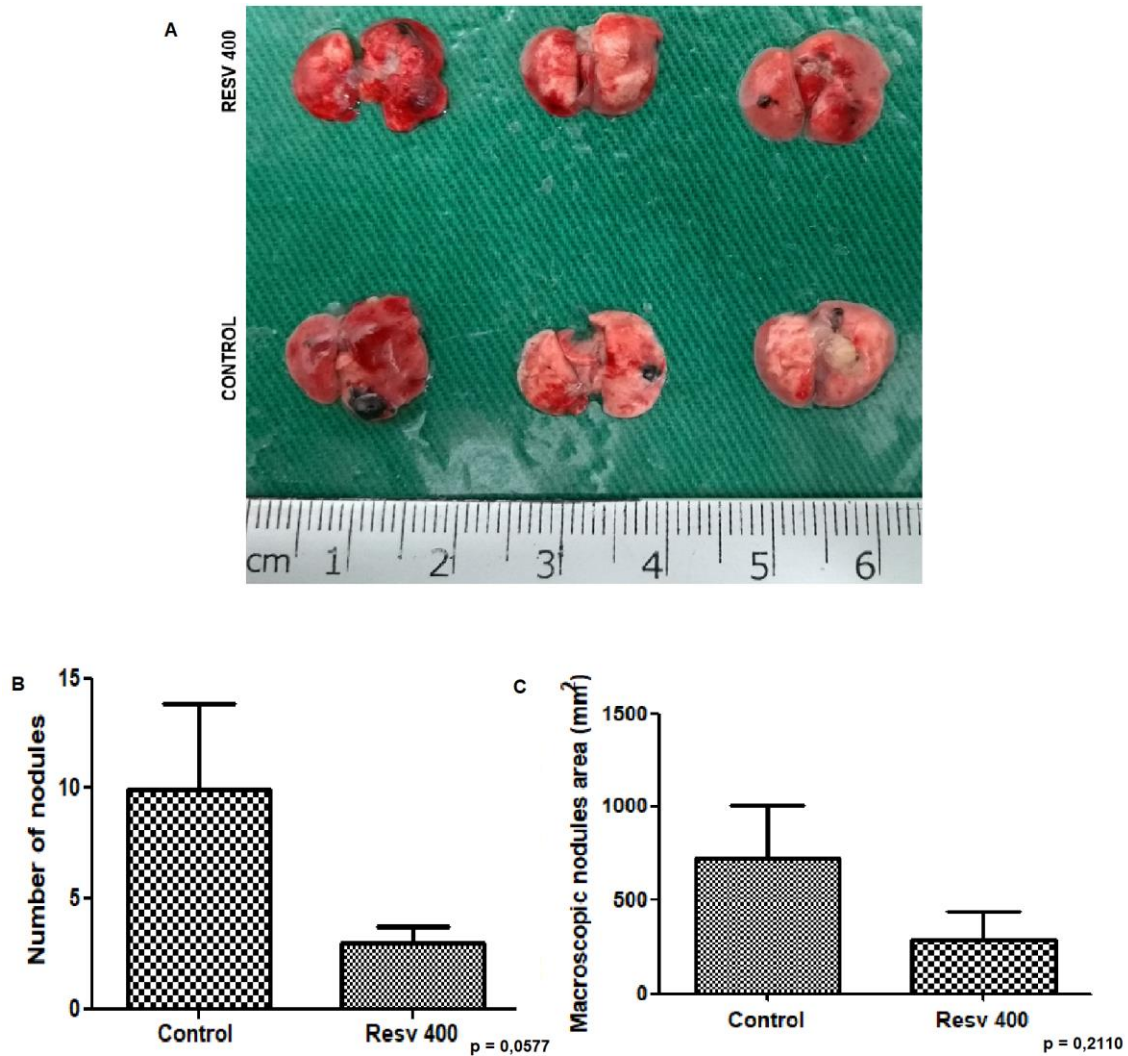


Figure 2. Lungs Metastatic Model, *in vivo*, performed with B16F10 cells, injected in tail vein of C57BL/6 mice (a) Metastatic nodules in lungs surface, 20 days after beginning of Resv400 or PBS administrations. (b) Number of macroscopic nodules found in lung surface in the control ($\bar{x} = 9,96$ and $SD = 19,80$) and Resv400 groups ($\bar{x} = 2,96$ and $SD = 4,17$). The data showed $p = 0,0577$, and a high size effect (0,58). (c) Macroscopic nodule area in control ($\bar{x} = 721,8$ and $SD = 1001$) and Resv400 groups ($\bar{x} = 290,4$ and $SD = 509,1$), in mm^2 . The data showed $p = 0,2110$, and a high size effect (0,57).

3.3. Resv effect on histologic parameters of metastatic lung tissue

The histologic analyses showed that, in both groups, metastatic foci development was accompanied by a fibrosis that reduced the alveolar space. Large fibrous area in the interalveolar septa tissue, peribronchial and perivascular regions were seen with apparent infiltration of lymphocytes. Moreover, some lung tissue areas were characterized by necrosis around the alveolar passages and bronchioles. Lung sections from control mice group exhibited greater area size and number of metastatic foci when compared to lungs from experimental mice. Representative H&E-stained lung section recovered from control and experimental mice are shown in Figure 3.

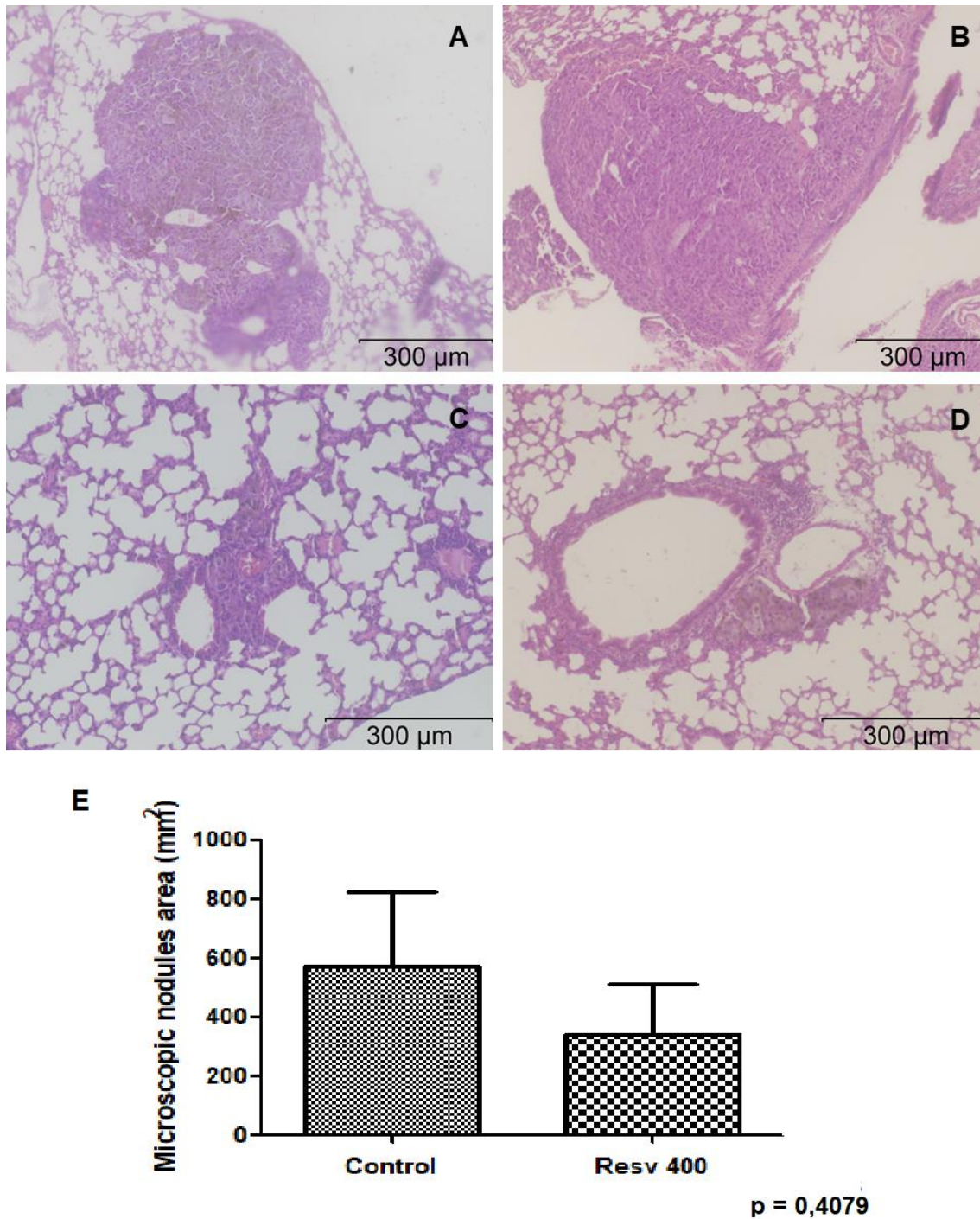


Figure 3. Histological analyses from C57BL/6 mice lungs, stained by Hematoxylin and Eosin. (a) and (b) Lungs nodules from C57BL/6 mice treated with PBS (control group). (c) and (d) Lungs nodules from C57BL/6 mice treated with resveratrol 400 mg/kg (Resv400). (e) Microscopic area of pulmonary nodules from C57BL/6 mice, in mm², between control (\bar{x} = 570,9 and SD = 764,8) and Resv400 group (\bar{x} = 337,3 and SD = 467,7). The data showed $p = 0,4079$ and a medium size effect (0,37).

4. Discussion

This study attempted to assess the antimetastatic effects of Resveratrol on metastatic murine melanoma cell lines and in an experimental animal metastasis model. According to our findings, Resv treatment significantly reduced the in vitro migratory ability of B16F10 cells, and treatment with Resv400 inhibited the formation of lung metastasis in C57BL/6 mice.

The migration ability of malignant cells is an important step for metastatic process, due the capacity of cells to move into blood vessels to metastatic site. The migration assay, as done here, is based in the ability of cells to migrate into an area denuded of cells, filling that space. In our study, Resv could significantly decreased the migration process in B16F10 murine melanoma cutaneous cells in all concentrations tested, in a dose-dependent manner, when compared with control group ($p < 0,05$).

In a study with T24 bladder cancer cells, treated with Resv in a concentration of 0, 10, 25 and 50 μM the results were similar to ours, indicating a inhibition in the migration activity of cancer cells treated with Resv, in a dose-dependent manner (Bai et al., 2017). The effect of Resv in inhibit migration has also been seen in different types of cancer cells, such as hepatocellular carcinoma, breast and prostate cancer (Chai et al., 2017; Khusbu et al., 2020; Sun et al., 2019), confirming the anti-migratory activity of Resv in cancer cells.

Besides the migratory activity, in this study we also evaluated the anti-metastatic effect of Resv in the progression of melanoma in a lungs metastatic model induced with B16F10 murine melanoma cutaneous cells intravenously inoculated in tail vein. We demonstrated that Resv treatment could decrease the number of nodules in the lungs surface when compared to control group (Fig 2B). The area of metastatic nodules were also evaluated in a macroscopic (Fig 2C) and microscopic (Fig 3E) way, and in both of them, the average area in lungs surface of treated mice were smaller than animals treated with placebo. Even though this results does not showed statistically significant difference, the data showed a high and medium size effect. This shows that our results has an important clinical significance, and, with a biggest sample, we may have a statistical difference. In the histologic evaluation could be seen the metastatic foci accompanied of fibrous area, a decrease in the alveolar space and regions with infiltration of lymphocytes, and these characteristics were less impacting in lungs of mice treated with Resv400 than in lungs of control group.

In a study performed by Bhattacharya et al. (2011), the effect of resveratrol were evaluated in a migration assay using B16BL6 murine melanoma cells, and an *in vivo* lung metastatic model using B16F10 murine melanoma cell, similar to those performed in these study. In the migration assay, the average number of cells B16BL6 migrating to denuded space was decreased when treated with 50 μM and 100 μM of Resv, when compared to control groups. In *in vivo* assay, the C57BL6 mice were treated with Resv daily, during 21 days, and as result Resv could reduce the averaged size of metastatic nodules in lungs surface when compared with control ones (Bhattacharya et al., 2011), and both results of these study are consistent with our results presented here.

These effect of resveratrol is also seen in other melanoma lineage, as seen in a study with K1735 murine melanoma cells, where the tumor growth index in lungs surface were significantly lower when compared with non-treated group (Chen et al., 2012). In a model of hepatic metastatic melanoma using B16F10 cells, resveratrol treatment could decrease the development of metastasis in 60% and also decreased the size of nodules, when compared with control group. In addition, they evaluated the expression of IL-18 (interleukin-18), a proinflammatory cytokine that expression is high in several cancers, and Resv could inhibit hepatic secretion of IL-18, which is correlated to decrease the inflammatory process and consequently support the inhibition of metastasis development (Salado et al., 2011).

Resv has shown an amount of activities in different types of cancer cells lineage, via several signaling pathways and different mechanisms, including anti-angiogenic (Trapp, Parmakhtiar, Papazian, Willmott, & Fruehauf, 2010), anti-inflammatory, anti-migratory and invasive properties (Salado et al., 2011; Zhang et al., 2015), and inhibition of MMPs (Lin et al., 2015) and EMT (Bhattacharya et al., 2011), which can corroborate to anti-tumoral effects intensively studied.

In conclusion, from *in vitro* and *in vivo* assays, our results suggest that Resv may contribute to occurrence of anti-metastatic effects on murine B16F10 melanoma cells. These data provide more evidences to further support the potential of Resv as a potential adjuvant agent during therapeutic for individuals with metastasis.

Author Contributions: Conceptualization, B.N.S.; W.F.F; V.C.Q; S.H.S.S; L.C.F; A.L.S.G; L.R.S.D; A.M.B.D.P.; methodology, B.N.S.; W.F.F; V.C.Q; L.R.S.D.; investigation, B.N.S.; W.F.F; V.C.Q; S.H.S.S; L.C.F; A.L.S.G; L.R.S.D; A.M.B.D.P; data curation, B.N.S; L.R.S.D; A.M.B.D.P.; writing—review and editing, B.N.S; L.R.S.D; A.M.B.D.P; supervision, L.R.S.D; A.M.B.D.P.; funding acquisition, A.M.B.D.P.

Funding: This research was funded by FAPEMIG, CNPq and CAPES.

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

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ko J-H, Sethi G, Um J-Y, Shanmugam MK, Arfuso F, Kumar AP, et al. The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):2589.
2. Wu F, Cui L. Resveratrol suppresses melanoma by inhibiting NF- κ B/miR-221 and inducing TFG expression. *Arch Dermatol Res.* 2017;309(10):823-31.
3. Bhattacharya S, Darjatmoko SR, Polans AS. Resveratrol modulates the malignant properties of cutaneous melanoma through changes in the activation and attenuation of the antiapoptotic protooncogenic protein Akt/PKB. *Melanoma Res.* 2011;21(3):180-7.
4. He L, Fan F, Hou X, Gao C, Meng L, Meng S, et al. Resveratrol suppresses pulmonary tumor metastasis by inhibiting platelet-mediated angiogenic responses. *J Surg Res.* 2017;217:113-22.
5. Lee SH, Koo BS, Park SY, Kim YM. Anti-angiogenic effects of resveratrol in combination with 5-fluorouracil on B16 murine melanoma cells. *Mol Med Rep.* 2015;12(2):2777-83.
6. Rai G, Mishra S, Suman S, Shukla Y. Resveratrol improves the anticancer effects of doxorubicin in vitro and in vivo models: A mechanistic insight. *Phytomedicine.* 2016;23(3):233-42.
7. Faries MB, Thompson JF, Cochran AJ, Andtbacka RH, Mozzillo N, Zager JS, et al. Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma. *N Engl J Med.* 2017;376(23):2211-22.
8. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.* 2013;19(11):1423-37.
9. Koppolu V, Rekha Vasigala VK. Checkpoint immunotherapy by nivolumab for treatment of metastatic melanoma. *J Cancer Res Ther.* 2018;14(6):1167-75.
10. Malissen N, Grob J-J. Metastatic Melanoma: Recent Therapeutic Progress and Future Perspectives. *Drugs.* 2018;78(12):1197-209.
11. Winder M, Virós A. Mechanisms of Drug Resistance in Melanoma. *Handb Exp Pharmacol.* 2018;249:91-108.
12. Kee JY, Han YH, Kim DS, Mun JG, Park SH, So HS, et al. Beta-Lapachone Suppresses the Lung Metastasis of Melanoma via the MAPK Signaling Pathway. *PloS one.* 2017;12(5):e0176937.
13. da Silva CFN, Melo GP, Bernardes SS, Cecchini AA. Modelos experimentais de melanoma murino in vivo. *Biosaúde.* 2016;15(2):73-80.
14. Zhang L, Tao L, Shi T, Zhang F, Sheng X, Cao Y, et al. Paeonol inhibits B16F10 melanoma metastasis in vitro and in vivo via disrupting proinflammatory cytokines-mediated NF-kappaB and STAT3 pathways. *IUBMB life.* 2015;67(10):778-88.
15. Bai Y, Yang H, Zhang G, Hu L, Lei Y, Qin Y, et al. Inhibitory effects of resveratrol on the adhesion, migration and invasion of human bladder cancer cells. *Mol Med Rep.* 2017;15(2):885-9.
16. Chai R, Fu H, Zheng Z, Liu T, Ji S, Li G. Resveratrol inhibits proliferation and migration through SIRT1 mediated post-translational modification of PI3K/AKT signaling in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Med Rep.* 2017;16(6):8037-44.
17. Khusbu FY, Zhou X, Roy M, Chen F-Z, Cao Q, Chen H-C. Resveratrol induces depletion of TRAF6 and suppresses prostate cancer cell proliferation and migration. *Int J Biochem Cell Biol.* 2020;118:105644-.
18. Sun Y, Zhou Q-M, Lu Y-Y, Zhang H, Chen Q-L, Zhao M, et al. Resveratrol Inhibits the Migration and Metastasis of MDA-MB-231 Human Breast Cancer by Reversing TGF- β 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Molecules.* 2019;24(6):1131.
19. Chen M-C, Chang W-W, Kuan Y-D, Lin S-T, Hsu H-C, Lee C-H. Resveratrol inhibits LPS-induced epithelial-mesenchymal transition in mouse melanoma model. *Innate Immun.* 2012;18(5):685-93.
20. Salado C, Olaso E, Gallot N, Valcarcel M, Egilegor E, Mendoza L, et al. Resveratrol prevents inflammation-dependent hepatic melanoma metastasis by inhibiting the secretion and effects of interleukin-18. *J Transl Med.* 2011;9:59-.
21. Trapp V, Parmakhtiar B, Papazian V, Willmott L, Fruehauf JP. Anti-angiogenic effects of resveratrol mediated by decreased VEGF and increased TSP1 expression in melanoma-endothelial cell co-culture. *Angiogenesis.* 2010;13(4):305-15.

22. Lin F-Y, Hsieh Y-H, Yang S-F, Chen C-T, Tang C-H, Chou M-Y, et al. Resveratrol suppresses TPA-induced matrix metalloproteinase-9 expression through the inhibition of MAPK pathways in oral cancer cells. *J Oral Pathol Med.* 2015;44(9):699-706.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, avaliamos a ação do Resv em modelos *in vitro*, com o ensaio de migração celular. Neste ensaio, o Resv diminuiu ativamente o potencial migratório que as células B16F10 de melanoma cutâneo murino apresentam de uma forma dose-dependente, ou seja, quanto maior a dose testada, maior a sensibilização das células tumorais ao resveratrol e menor a taxa migratória consequente. Realizamos também ensaios *in vivo*, e induzimos um modelo de melanoma com metástase pulmonar em camundongos C57BL/6 com sucesso, para assim mimetizar o processo de metástase do melanoma em humanos, que um dos principais sítios pré-metastáticos são os pulmões. Com o modelo estabelecido, tratamos os animais com o Resv em concentração já estabelecida em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa como dose terapêutica, sem causar toxicidade. Com a administração do Resv400 por 20 dias após a indução tumoral, os animais tratados se apresentaram mais ativos comparados aos do grupo controle. Conseguimos também observar uma diminuição geral na quantidade e na área de nódulos macroscópicos na superfície dos pulmões dos camundongos que receberam o tratamento. A avaliação histopatológica também nos mostrou um melhor perfil pulmonar patológico nos camundongos tratados, com menores alterações características de progressão tumoral do que aquelas vistas nos pulmões dos animais do grupo controle. Mesmo com alguns resultados sem significância estatística como visto no valor de p apresentado, ainda podemos ver que houve uma grande melhora nos parâmetros avaliados, mostrando a grande relevância clínica deste estudo.

Um longo caminho ainda precisa ser percorrido para determinarmos como e por quais vias o Resv agiu para a diminuição da metástase nos pulmões dos animais. A avaliação dos parâmetros relacionados a transição epitelial-mesenquimal será um importante passo para o complemento deste estudo, para que assim possamos avaliar os efeitos do Resv nas alterações relacionadas. Dessa forma é importante ressaltar a importância da continuação desta linha de estudos, onde os efeitos do Resv são avaliados no melanoma metastático.

REFERÊNCIAS

- Adler, N. R., Haydon, A., McLean, C. A., Kelly, J. W., & Mar, V. J. (2017). Metastatic pathways in patients with cutaneous melanoma. *Pigment cell & melanoma research*, 30(1), 13-27. doi: 10.1111/pcmr.12544
- Ankeny, J. S., Labadie, B., Luke, J., Hsueh, E., Messina, J., & Zager, J. S. (2018). Review of diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in melanoma. *Clinical & experimental metastasis*, 35(5-6), 487-493. doi: 10.1007/s10585-018-9892-z
- Aziz, M. H., Reagan-Shaw, S., Wu, J., Longley, B. J., & Ahmad, N. (2005). Chemoprevention of skin cancer by grape constituent resveratrol: relevance to human disease? *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(9), 1193-1195. doi: 10.1096/fj.04-3582fje
- Bai, Y., Mao, Q.-Q., Qin, J., Zheng, X.-Y., Wang, Y.-B., Yang, K., . . . Xie, L.-P. (2010). Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Cancer science*, 101(2), 488-493. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01415.x
- Bai, Y., Yang, H., Zhang, G., Hu, L., Lei, Y., Qin, Y., . . . Mao, Q. (2017). Inhibitory effects of resveratrol on the adhesion, migration and invasion of human bladder cancer cells. *Molecular medicine reports*, 15(2), 885-889. doi: 10.3892/mmr.2016.6051
- Bandarchi, B., Ma, L., Navab, R., Seth, A., & Rasty, G. (2010). From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatol Res Pract*, 2010. doi: 10.1155/2010/583748
- Bhattacharya, S., Darjatmoko, S. R., & Polans, A. S. (2011). Resveratrol modulates the malignant properties of cutaneous melanoma through changes in the activation and attenuation of the antiapoptotic protooncogenic protein Akt/PKB. *Melanoma research*, 21(3), 180-187. doi: 10.1097/CMR.0b013e3283456dfc
- Braeuer, R. R., Watson, I. R., Wu, C.-J., Mobley, A. K., Kamiya, T., Shoshan, E., & Bar-Eli, M. (2014). Why is melanoma so metastatic? *Pigment cell & melanoma research*, 27(1), 19-36. doi: 10.1111/pcmr.12172
- Brasil, M. d. S. (2013). *Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Melanoma Maligno Cutâneo*.
- Cao, Z., Fang, J., Xia, C., Shi, X., & Jiang, B.-H. (2004). trans-3,4,5'-Trihydroxystibene inhibits hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10(15), 5253-5263. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0588
- Carter, L. G., D'Orazio, J. A., & Pearson, K. J. (2014). Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Endocrine-related cancer*, 21(3), R209-R225. doi: 10.1530/ERC-13-0171
- Castro, L. G. M., Bakos, R. M., Duprat Neto, J. P., Bittencourt, F. V., Di Giacomo, T. H. B., Serpa, S. S., . . . Gontijo, G. (2016). Brazilian guidelines for diagnosis, treatment and follow-up of primary cutaneous melanoma - Part II. *Anais brasileiros de dermatologia*, 91(1), 49-58. doi: 10.1590/abd1806-4841.20164715
- Castro, L. G. M., Messina, M. C., Loureiro, W., Macarenco, R. S., Duprat Neto, J. P., Di Giacomo, T. H. B., . . . Gontijo, G. (2015). Guidelines of the Brazilian Dermatology Society for diagnosis, treatment and follow up of primary cutaneous melanoma--Part I. *Anais brasileiros de dermatologia*, 90(6), 851-861. doi: 10.1590/abd1806-4841.20154707
- Chai, R., Fu, H., Zheng, Z., Liu, T., Ji, S., & Li, G. (2017). Resveratrol inhibits proliferation and migration through SIRT1 mediated post-translational modification of PI3K/AKT signaling in hepatocellular carcinoma cells. *Molecular medicine reports*, 16(6), 8037-8044. doi: 10.3892/mmr.2017.7612
- Chen, M.-C., Chang, W.-W., Kuan, Y.-D., Lin, S.-T., Hsu, H.-C., & Lee, C.-H. (2012). Resveratrol inhibits LPS-induced epithelial-mesenchymal transition in mouse melanoma model. *Innate immunity*, 18(5), 685-693. doi: 10.1177/1753425912436589


- da Silva, C. F. N., Melo, G. P., Bernardes, S. S., & Cecchini, A. A. (2016). Modelos experimentais de melanoma murino in vivo. *Biosaúde*, *15*(2), 73-80.
- de la Lastra, C. A., & Villegas, I. (2007). Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society transactions*, *35*(Pt 5), 1156-1160. doi: 10.1042/BST0351156
- Descot, A., & Oskarsson, T. (2013). The molecular composition of the metastatic niche. *Experimental cell research*, *319*(11), 1679-1686. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.04.017
- Faries, M. B., Thompson, J. F., Cochran, A. J., Andtbacka, R. H., Mozzillo, N., Zager, J. S., . . . Elashoff, R. M. (2017). Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma. *The New England journal of medicine*, *376*(23), 2211-2222. doi: 10.1056/NEJMoa1613210
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., . . . Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International journal of cancer*, *144*(8), 1941-1953. doi: 10.1002/ijc.31937
- GBM. (2017). *Novas definições e comentários referentes ao estadiamento proposto na 8ª edição da AJCC de 2017. Grupo Brasileiro de Melanoma.*
- Gong, C., & Xia, H. (2020). Resveratrol suppresses melanoma growth by promoting autophagy through inhibiting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Exp Ther Med*, *19*(3), 1878-1886. doi: 10.3892/etm.2019.8359
- He, L., Fan, F., Hou, X., Gao, C., Meng, L., Meng, S., . . . Wu, H. (2017). Resveratrol suppresses pulmonary tumor metastasis by inhibiting platelet-mediated angiogenic responses. *The Journal of surgical research*, *217*, 113-122. doi: 10.1016/j.jss.2017.05.009
- INCA, I. N. d. C. (2020). *Câncer de pele melanoma.*
- Kee, J. Y., Han, Y. H., Kim, D. S., Mun, J. G., Park, S. H., So, H. S., . . . Hong, S. H. (2017). Beta-Lapachone Suppresses the Lung Metastasis of Melanoma via the MAPK Signaling Pathway. *PLoS One*, *12*(5), e0176937. doi: 10.1371/journal.pone.0176937
- Khusbu, F. Y., Zhou, X., Roy, M., Chen, F.-Z., Cao, Q., & Chen, H.-C. (2020). Resveratrol induces depletion of TRAF6 and suppresses prostate cancer cell proliferation and migration. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *118*, 105644-105644. doi: 10.1016/j.biocel.2019.105644
- Knackstedt, T., Knackstedt, R. W., Couto, R., & Gastman, B. (2018). Malignant Melanoma: Diagnostic and Management Update. *Plastic and reconstructive surgery*, *142*(2), 202e-216e. doi: 10.1097/PRS.0000000000004571
- Ko, J.-H., Sethi, G., Um, J.-Y., Shanmugam, M. K., Arfuso, F., Kumar, A. P., . . . Ahn, K. S. (2017). The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *International journal of molecular sciences*, *18*(12), 2589. doi: 10.3390/ijms18122589
- Koppolu, V., & Rekha Vasigala, V. K. (2018). Checkpoint immunotherapy by nivolumab for treatment of metastatic melanoma. *Journal of cancer research and therapeutics*, *14*(6), 1167-1175. doi: 10.4103/jcrt.JCRT_1290_16
- Lee, S. H., Koo, B. S., Park, S. Y., & Kim, Y. M. (2015). Anti-angiogenic effects of resveratrol in combination with 5-fluorouracil on B16 murine melanoma cells. *Molecular medicine reports*, *12*(2), 2777-2783. doi: 10.3892/mmr.2015.3675
- Leonardi, G. C., Falzone, L., Salemi, R., Zanghì, A., Spandidos, D. A., McCubrey, J. A., . . . Libra, M. (2018). Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *International journal of oncology*, *52*(4), 1071-1080. doi: 10.3892/ijo.2018.4287
- Leung, A. M., Hari, D. M., & Morton, D. L. (2012). Surgery for distant melanoma metastasis. *Cancer J*, *18*(2), 176-184. doi: 10.1097/PPO.0b013e31824bc981
- Lin, F.-Y., Hsieh, Y.-H., Yang, S.-F., Chen, C.-T., Tang, C.-H., Chou, M.-Y., . . . Chen, M.-K. (2015). Resveratrol suppresses TPA-induced matrix metalloproteinase-9 expression through the inhibition of MAPK pathways in oral cancer cells. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, *44*(9), 699-706. doi: 10.1111/jop.12288

- Malissen, N., & Grob, J.-J. (2018). Metastatic Melanoma: Recent Therapeutic Progress and Future Perspectives. *Drugs*, 78(12), 1197-1209. doi: 10.1007/s40265-018-0945-z
- Mendenhall, W. M., Amdur, R. J., Morris, C. G., Kirwan, J., Shaw, C., & Dziegielewski, P. T. (2017). Adjuvant postoperative radiotherapy for cutaneous melanoma. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, 56(3), 495-496. doi: 10.1080/0284186X.2017.1295168
- NICE, N. C. C. f. C.-. (2015). *Melanoma: Assessment and Management*.
- Nieweg, O. E., & Gallegos-Hernández, J. F. (2015). Cutaneous malignant melanoma and the new drugs. [La cirugía en melanoma cutáneo maligno y las nuevas drogas]. *Cirugía y cirujanos*, 83(2), 175-180. doi: 10.1016/j.circir.2015.04.016
- Niles, R. M., McFarland, M., Weimer, M. B., Redkar, A., Fu, Y. M., & Meadows, G. G. (2003). Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Lett*, 190(2), 157-163. doi: 10.1016/s0304-3835(02)00676-6
- Pannu, N., & Bhatnagar, A. (2019). Resveratrol: from enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 109, 2237-2251. doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.075
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., . . . Lyden, D. (2016). Corrigendum: Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature medicine*, 22(12), 1502-1502. doi: 10.1038/nm1216-1502b
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., . . . Lyden, D. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature medicine*, 18(6), 883-891. doi: 10.1038/nm.2753
- Pezzuto, J. M. (2019). Resveratrol: Twenty Years of Growth, Development and Controversy. *Biomolecules & therapeutics*, 27(1), 1-14. doi: 10.4062/biomolther.2018.176
- Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine*, 19(11), 1423-1437. doi: 10.1038/nm.3394
- Rai, G., Mishra, S., Suman, S., & Shukla, Y. (2016). Resveratrol improves the anticancer effects of doxorubicin in vitro and in vivo models: A mechanistic insight. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 23(3), 233-242. doi: 10.1016/j.phymed.2015.12.020
- Rastrelli, M., Tropea, S., Rossi, C. R., & Alaibac, M. (2014). Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In vivo (Athens, Greece)*, 28(6), 1005-1011.
- Rauf, A., Imran, M., Suleria, H. A. R., Ahmad, B., Peters, D. G., & Mubarak, M. S. (2017). A comprehensive review of the health perspectives of resveratrol. *Food & function*, 8(12), 4284-4305. doi: 10.1039/c7fo01300k
- Salado, C., Olaso, E., Gallot, N., Valcarcel, M., Egilegor, E., Mendoza, L., & Vidal-Vanaclocha, F. (2011). Resveratrol prevents inflammation-dependent hepatic melanoma metastasis by inhibiting the secretion and effects of interleukin-18. *Journal of translational medicine*, 9, 59-59. doi: 10.1186/1479-5876-9-59
- Singh, S., Varney, M., & Singh, R. K. (2009). Host CXCR2-dependent regulation of melanoma growth, angiogenesis, and experimental lung metastasis. *Cancer research*, 69(2), 411-415. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3378
- Stevens, G., & McKay, M. J. (2006). Dispelling the myths surrounding radiotherapy for treatment of cutaneous melanoma. *The Lancet. Oncology*, 7(7), 575-583. doi: 10.1016/S1470-2045(06)70758-6
- Sun, Y., Zhou, Q.-M., Lu, Y.-Y., Zhang, H., Chen, Q.-L., Zhao, M., & Su, S.-B. (2019). Resveratrol Inhibits the Migration and Metastasis of MDA-MB-231 Human Breast Cancer by Reversing TGF-β1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(6), 1131. doi: 10.3390/molecules24061131
- Swetter, S. M., Tsao, H., Bichakjian, C. K., Curiel-Lewandrowski, C., Elder, D. E., Gershenwald, J. E., . . . Lamina, T. (2019). Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma.


- Journal of the American Academy of Dermatology*, 80(1), 208-250. doi: 10.1016/j.jaad.2018.08.055
- Testori, A., Rutkowski, P., Marsden, J., Bastholt, L., Chiarion-Sileni, V., Hauschild, A., & Eggermont, A. M. M. (2009). Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 20 Suppl 6(Suppl 6), vi22-vi29. doi: 10.1093/annonc/mdp257
- Trapp, V., Parmakhtiar, B., Papazian, V., Willmott, L., & Fruehauf, J. P. (2010). Anti-angiogenic effects of resveratrol mediated by decreased VEGF and increased TSP1 expression in melanoma-endothelial cell co-culture. *Angiogenesis*, 13(4), 305-315. doi: 10.1007/s10456-010-9187-8
- Valastyan, S., & Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2), 275-292. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.024
- Wang, H., Zhang, H., Tang, L., Chen, H., Wu, C., Zhao, M., . . . Liu, G. (2013). Resveratrol inhibits TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and suppresses lung cancer invasion and metastasis. *Toxicology*, 303, 139-146. doi: 10.1016/j.tox.2012.09.017
- Weng, C.-J., Wu, C.-F., Huang, H.-W., Wu, C.-H., Ho, C.-T., & Yen, G.-C. (2010). Evaluation of anti-invasion effect of resveratrol and related methoxy analogues on human hepatocarcinoma cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(5), 2886-2894. doi: 10.1021/jf904182y
- Winder, M., & Virós, A. (2018). Mechanisms of Drug Resistance in Melanoma. *Handbook of experimental pharmacology*, 249, 91-108. doi: 10.1007/164_2017_17
- Wu, F., & Cui, L. (2017). Resveratrol suppresses melanoma by inhibiting NF- κ B/miR-221 and inducing TFG expression. *Archives of dermatological research*, 309(10), 823-831. doi: 10.1007/s00403-017-1784-6
- Yeung, K. T., & Yang, J. (2017). Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. *Molecular oncology*, 11(1), 28-39. doi: 10.1002/1878-0261.12017
- Zhang, L., Tao, L., Shi, T., Zhang, F., Sheng, X., Cao, Y., . . . Lu, Y. (2015). Paeonol inhibits B16F10 melanoma metastasis in vitro and in vivo via disrupting proinflammatory cytokines-mediated NF-kappaB and STAT3 pathways. *IUBMB Life*, 67(10), 778-788. doi: 10.1002/iub.1435
- Zhao, H., Han, L., Jian, Y., Ma, Y., Yan, W., Chen, X., . . . Li, L. (2018). Resveratrol induces apoptosis in human melanoma cell through negatively regulating Erk/PKM2/Bcl-2 axis. *Onco Targets Ther*, 11, 8995-9006. doi: 10.2147/ott.s186247

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa



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



Unimontes

PARECER CONSUBSTANCIADO

Montes Claros, 20 de fevereiro de 2017.

Processo N.º 131

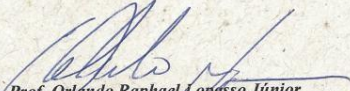
Título do Projeto: EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO, DO RESVERATROL NO SISTEMA UBIQUINA-PROTEASSOMA, NO CRESCIMENTO TUMORAL, NA OCORRÊNCIA DE METÁSTASE E NA CAQUEXIA ASSOCIADA AO MODELO SINGÊNICO DE MELANOMA CUTÂNEO EM CAMUNDONGOS C57Bl/6.

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 sobrevivência 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

1



Type of the Paper (Article, Review, Communication, etc.)

Title

Firstname Lastname ¹, Firstname Lastname ² and Firstname Lastname ^{2,*}

¹ Affiliation 1; e-mail@e-mail.com

² Affiliation 2; e-mail@e-mail.com

* Correspondence: e-mail@e-mail.com; Tel.: (optional; include country code; if there are multiple corresponding authors, add author initials) +xx-xxxx-xxx-xxxx (F.L.)

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: A single paragraph of about 200 words maximum. For research articles, abstracts should give a pertinent overview of the work. We strongly encourage authors to use the following style of structured abstracts, but without headings: (1) Background: Place the question addressed in a broad context and highlight the purpose of the study; (2) Methods: Describe briefly the main methods or treatments applied; (3) Results: Summarize the article's main findings; and (4) Conclusions: Indicate the main conclusions or interpretations. The abstract should be an objective representation of the article, it must not contain results which are not presented and substantiated in the main text and should not exaggerate the main conclusions.

Keywords: keyword 1; keyword 2; keyword 3 (List three to ten pertinent keywords specific to the article; yet reasonably common within the subject discipline.)

0. How to Use This Template

The template details the sections that can be used in a manuscript. Note that each section has a corresponding style, which can be found in the 'Styles' menu of Word. Sections that are not mandatory are listed as such. The section titles given are for Articles. Review papers and other article types have a more flexible structure.

Remove this paragraph and start section numbering with 1. For any questions, please contact the editorial office of the journal or support@mdpi.com.

1. Introduction

The introduction should briefly place the study in a broad context and highlight why it is important. It should define the purpose of the work and its significance. The current state of the research field should be reviewed carefully and key publications cited. Please highlight controversial and diverging hypotheses when necessary. Finally, briefly mention the main aim of the work and highlight the principal conclusions. As far as possible, please keep the introduction comprehensible to scientists outside your particular field of research. References should be numbered in order of appearance and indicated by a numeral or numerals in square brackets, e.g., [1] or [2,3], or [4–6]. See the end of the document for further details on references.

2. Materials and Methods