

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Valéria Couto Quintão Eleutério

Efeitos do Resveratrol na viabilidade, proliferação e apoptose de células B16F10 de Melanoma cutâneo murino: estudos *in vitro*

Montes Claros  
2020

Valéria Couto Quintão Eleutério

Efeitos do Resveratrol na viabilidade, proliferação e apoptose de células B16F10 de Melanoma cutâneo murino: estudos *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências em 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: Alfredo Maurício Batista de Paula

Coorientadora: Ludmilla Regina de Souza David

Montes Claros  
2020

E39e

Eleutério, Valéria Couto Quintão.

Efeitos do Resveratrol na viabilidade, proliferação e apoptose de células B16F10 de melanoma cutâneo murino [manuscrito] : estudos *in vitro* / Valéria Couto Quintão Eleutério. – Montes Claros, 2020.

50 f. : il.

Bibliografia: f. 46-49.

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. Resveratrol - Efeitos. 2. Melanoma cutâneo. 3. Células B16F10. 4. Ciclo celular. 5. Proliferação celular. 6. Morte celular programada. 7. Ensaio *in vitro*. I. Paula, Alfredo Maurício Batista de. II. David, Ludmilla Regina de Souza. III. Universidade Estadual de Montes Claros. IV. Título. V. Título: Estudos *in vitro*.

## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS-UNIMONTES

Reitor: Antônio Alvimar Souza

Vice-reitora: Ilva Ruas de Abreu

Pró-reitor de Pesquisa: Clarice Diniz Alvarenga Corsato

Coordenadoria de Acompanhamento de Projetos: Virgílio Mesquita Gomes

Coordenadoria de Iniciação Científica: Sônia Ribeiro Arrudas

Coordenadoria de Inovação Tecnológica: Dario Alves de Oliveira

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

Coordenadoria de Pós-graduação *Lato-sensu*: Marcos Flávio Vasconcelos D'Ângelo

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

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenador: Alfredo Maurício Batista de Paula

Coordenadora Adjunta: Marise Fagundes da Silveira



MESTRANDA: VALÉRIA COUTO QUINTÃO

TÍTULO DO TRABALHO: “Efeitos do Resveratrol na viabilidade, proliferação e apoptose de células B16F10 de Melanoma cutâneo murino: estudos *in vitro*”

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Mecanismos e Aspectos Clínicos da Doença.

LINHA DE PESQUISA: Etiopatogenia e Fisiopatologia das Doenças.

BANCA EXAMINADORA (MEMBROS TITULARES)

PROF. DR. ALFREDO MAURÍCIO BATISTA DE PAULA - ORIENTADOR

PROFª DRª. LUDMILLA REGINA DE SOUZA DAVID -COORIENTADORA

PROF. DR. OTÁVIO CARDOSO FILHO

PROF. DR. JOÃO MARCUS DE OLIVEIRA ANDRADE

ASSINATURAS

BANCA EXAMINADORA (MEMBROS SUPLENTE)

PROF. DR. ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES

PROF. DR. MARCOS VINICIUS MACEDO DE OLIVEIRA

ASSINATURAS

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

[ ] APROVADA

[ ] REPROVADA

Hospital Universitário Clemente Farias – HUCF

<http://www.unimontes.br> / [ppgcs@unimontes.br](mailto:ppgcs@unimontes.br)

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

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

## AGRADECIMENTOS

Obrigada Deus por me abençoar e me manter firme nesse propósito, nos momentos nebulosos encontrei em ti a paz que eu preciso para continuar.

Agradeço ao meu marido, Guilherme, por caminhar ao meu lado e suportar todos os momentos difíceis dessa caminhada.

Agradeço a minha filha, Dara, amor mais puro, por ser o motivo para que eu queira vencer.

A minha família. Essa é a vitória de todos que sempre estão ao meu lado, vó, mãe e irmãos.

A minha vó Icléia, por todo cuidado, amor e dedicação. Exemplo de mulher guerreira e batalhadora. Essa conquista é nossa!

Sou imensamente grata ao meu orientador Alfredo, pela oportunidade em fazer parte do laboratório de pesquisa em saúde, contribuindo para meu crescimento profissional. Obrigada pela orientação, apoio e dedicação que sempre demonstrou.

À minha coorientadora e amiga Ludmilla, nossa flor, que sempre de forma atenciosa e dedicada me auxiliou no direcionamento desse trabalho. Obrigada por sempre me escutar, acalmar e encorajar

Sou grata a minha amiga, Amanda Rodrigues, pela amizade sincera, ensinamentos e apoio durante toda a caminhada.

Agradeço ao meu amigo Otavio Filho, por sempre me ajudar e encorajar nos momentos difíceis.

Obrigada Amanda (Xulina) pelas longas conversas, conselhos, você fez essa caminhada mais doce.

Agradeço ao meu amigo, Victor Dantas. pelo apoio dado no decorrer dessa caminhada.

Obrigada a todos os colegas e amigos do laboratório de pesquisa por alegrarem os meus dias.

Agradeço a todos os professores membros da banca, pela disponibilidade e atenção na leitura de meu trabalho.

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

## RESUMO

O Resveratrol (Resv), um fitonutriente polifenólico natural, atua como modulador negativo de vias moleculares relacionadas com a progressão tumoral, incluindo o controle do ciclo celular e a morte celular programada de células cancerosas. O Resv é um fitonutriente de baixa toxicidade em células normais, usado de forma adjuvante durante tratamento antineoplásico parece promover uma diminuição da resistência de células cancerosas à drogas utilizadas em estudo experimental. O Melanoma cutâneo (MC) é um câncer que se origina a partir de melanócitos da pele. Esse tipo de câncer representa um importante problema de saúde pública em muitas populações humanas ao redor do mundo. Estudos clínicos demonstram que o MC é bastante resistente ao tratamento antineoplásico convencional devido à sua rápida progressão, notadamente a capacidade de originar metástases em estágios iniciais de desenvolvimento da lesão, e à resistência aos tratamentos quimioterápicos atuais. Nesse contexto, esse estudo teve como objetivo investigar os efeitos *in vitro* do Resv sobre a viabilidade celular, proliferação e morte celular programada em células de MC murino B16F10. Para isso, as células foram cultivadas e tratadas com diferentes concentrações de Resv, a fim de se investigar a viabilidade via ensaio de MTT. O efeito do Resv (25, 50, e 100 µg/mL) na apoptose de células B16F10 foi investigado com a realização do método de incorporação de iodeto de propídio/alaranjado de acridina, quantificação da expressão gênica de Bax e Caspase-3 via reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) e fragmentação de DNA pela citometria de fluxo. O ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo usando a marcação do DNA com iodeto de propídio. Os resultados demonstraram que o Resv reduziu a viabilidade celular de maneira dependente da concentração e confirmaram o potencial indutor de apoptose desse composto em células de MC murino-B16F10. Além disso, os resultados da parada do ciclo celular mostraram que as células expostas ao Resv nas concentrações mais baixas avaliadas (25 e 50 µg/mL) exibiram um aumento na população de células na fase G2/M, enquanto a concentração de 100 µg/mL mostrou uma proporção de células em cada fase compatível com o grupo controle, no entanto, nos ensaios de morte celular foi a concentração que demonstrou maior atividade apoptótica. Dessa forma, conclui-se que o Resv exibe efeitos antineoplásicos em células de MC murino B16F10 via indução da inibição da proliferação celular, promoção de morte celular por apoptose e bloqueio do ciclo celular nessas células.

**Palavras-chave:** resveratrol, 3,5,4'-trihidroxiestilbeno. melanoma cutâneo. B16F10. ciclo celular. proliferação celular. morte celular programada. ensaios *in vitro*.



## ABSTRACT

Resveratrol (Resv), a natural polyphenolic nutrient, acts as a negative modulator of molecular pathways related to tumor progress, including control of the cell cycle and programmed cell death of cancer cells. Resv is a low toxicity adjustment in normal cells, used adjuvantly during antineoplastic treatment and it seems to promote a reduction in the resistance of cancer cells to drugs used in experimental studies. Cutaneous melanoma (CM) is a cancer that originates from skin melanocytes. This type of cancer represents a major public health problem in many human populations around the world. Cynical studies demonstrate that this cancer is quite resistant to conventional antineoplastic treatment due to its progression, notably the ability to originate metastases in the early stages of lesion development, and resistance to current chemotherapy treatments. In this context, this study focused on investigate the in vitro effects of Resv on cell viability, proliferation and programmed cell death in B16F10 murine CM cells. For this, the cells were cultured and treated with different concentrations of Resv, in order to investigate the viability via MTT of the assay. The effect of Resv (25, 50, and 100 µg/mL) on the apoptosis of B16F10 cells was investigated by carrying out the method of incorporating propidium iodide / acridine orange, quantifying Bax and Caspase-3 gene expression via real-time reaction quantitative polymerase chain (RT q-PCR) and DNA fragmentation by flow cytometry. The cell cycle was evaluated by flow cytometry using DNA staining with propidium iodide. The results demonstrated that Resv reduced cell viability in a concentration-dependent manner and confirmed the potential for apoptosis inducing this compound in murine CM-B16F10 cells. In addition, the results of the cell cycle arrest showed that cells exposed to Resv in the lowest evaluated lows (25 and 50 µg/mL) exhibited an increase in the cell population in the G2 / M phase, while the concentration of 100 µg/mL showed a proportion of cells in each phase compatible with the control group, however, in cell death tests, it was a concentration that demonstrated greater apoptotic activity. Thus, it is concluded that Resv exhibits antineoplastic effects in murine MC B16F10 cells via induction of cell proliferation inhibition, promotion of cell death by apoptosis and cell cycle block in these cells.

**Keywords:** resveratrol, 3,5,4'-trihydroxystylbene. cutaneous melanoma. B16F10. cell cycle. cell proliferation. programmed cell death. in vitro tests.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Estrutura química dos isômeros trans-Resveratrol e cis-Resveratrol.....	13
<b>Figura 2</b> - Tumorigênese e tumorigênese: iniciação, promoção e progressão.....	17
<b>Figura 3</b> – Tumorigênese da da lesão neoplásica maligna melanocítica.....	19
<b>Figura 4</b> - Fases do ciclo celular.....	21
<b>Figura 5</b> - Apoptose dependente de mitocôndrias.....	22

## LISTA DE ABREVIATURAS

BAK	-	BCL2 Antagonist
BAX	-	BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator
BAX	-	Bcl2-associated X protein
BCL-2	-	B-cell lymphoma 2
BCL-XL	-	B-cell lymphoma-extra large
BID	-	Agonista da morte do domínio de interação BH3
BNIP3	-	BCL2 Interacting Protein 3
CDK-1	-	Cyclin Dependent Kinase 1
CDK4	-	Cyclin Dependent Kinase
CN	-	Crista neural
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
ERRO	-	Espécies reativas de oxigênio
MC	-	Melanoma Cutâneo
MCL-1	-	Apoptosis Regulator, BCL2 Family Member
MCL-1	-	Apoptosis Regulator, BCL2 Family Member
P21	-	Inibidor da quinase 1 dependente de ciclina
P27	-	Inibidor de quinase 1B dependente de ciclina
PI	-	Iodeto de propídeo
qPCR	-	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RESV	-	Resveratrol
UV	-	Radiação ultravioleta

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 Resveratrol.....	13
2.2 Tumorigênese .....	17
2.3 Melanoma cutâneo.....	18
2.4 Ciclo celular.....	21
2.5 Morte celular programada por apoptose .....	23
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo Geral.....	25
3.2Objetivos Específicos.....	25
4 PRODUTO CIENTÍFICO.....	26
4.1 Artigo Científico: <i>Effects of Resveratrol on the cell viability, proliferation, and apoptosis of murine B16F10 cutaneous melanoma cells: in vitro studies</i> .....	27
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
REFERÊNCIAS.....	46
ANEXO A- Normas do periódico Phytomedicine.....	50

## 1 INTRODUÇÃO

Resveratrol (Resv) é uma fitoalexina polifenólica encontrada em uva, bagas, amendoins e vinhos. Sua estrutura química é composta por dois anéis aromáticos aliados por uma ponte de metileno e apresenta-se nas formas isoméricas *trans* e *cis* (1). A forma *trans*- Resveratrol é a mais estável e apresenta maior atividade biológica (2-4).

O Resv possui diferentes atividades biológicas demonstradas em literatura, dentre elas destaca-se a atividade anticâncer (5-8). Estudos relatam sua ação em diversas vias de sinalização celular, incluindo angiogênese e inibição de invasão, adesão e metástase, apreensão do ciclo celular, supressão da proliferação celular tumoral, indução de apoptose e diferenciação (9). Inibição da proliferação e apoptose são observadas em vários tipos de cânceres, como mama, próstata, tumores gástricos, cólon e câncer de pele melanoma (6, 10, 11). Ainda, foi verificado que o Resv possui um efeito inibitório sobre a resistência das células cancerígenas aos medicamentos quimioterápicos, característica que pode ser essencial para aumentar a sobrevivência do indivíduo com a doença (12, 13).

O Melanoma cutâneo (MC) é um tipo de câncer que se desenvolve nos melanócitos, de natureza multifatorial, decorrente de uma interação entre suscetibilidade genética e exposição ambiental (14). O MC é caracterizado por sua capacidade precoce e altamente metastática, que promove altas taxas de mortalidade e a sua incidência está aumentando significativamente ao longo dos anos (15)

Os tratamentos antineoplásicos convencionais para o MC são cirurgia, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia (16). No entanto, esses tratamentos frequentemente promovem danos em tecidos normais, com promoção e uma série de efeitos colaterais e ocorrência de resistência às múltiplas drogas quimioterápicas(17). O Resv é um composto que possui baixa toxicidade para células normais e acredita-se que ele exerça efeitos que podem atenuar os efeitos colaterais promovidos pelo tratamento antineoplásico padrão e reverter a resistência a drogas quimioterápicas (8, 18).

Sendo assim, esse trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos *in vitro* do Resveratrol na viabilidade celular, atividade proliferativa e na morte celular por apoptose em células de

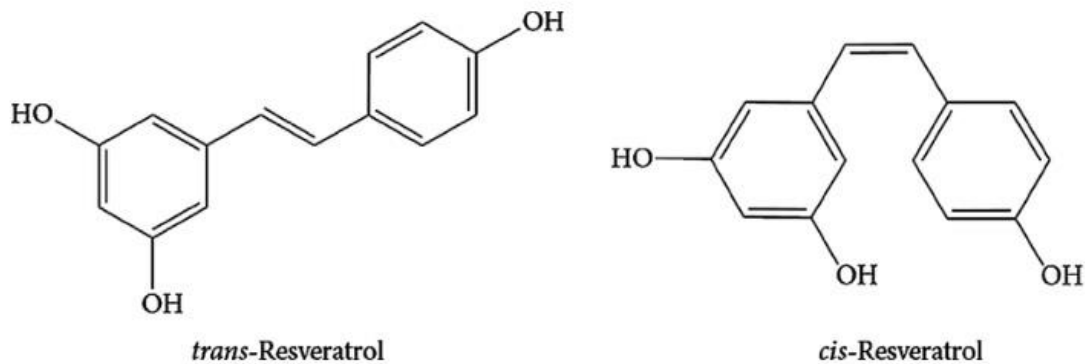
melanoma cutâneo (MC) murino B16F10.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Resveratrol

O Resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno, Resv) é um fitoalexina natural (19) produzida por muitas plantas em resposta à lesão, infecção fúngica ou bacteriana e radiação ultravioleta. Esse composto polifenólico pode ser encontrado em alguns alimentos naturais, incluindo mirtilo, framboesa, amora e uva, sendo que sua concentração exata em cada fonte varia muito. O Resv mostra um perfil de segurança muito favorável ao consumo, sem toxicidade ou toxicidade mínima para células normais (8). Sua estrutura química é composta por dois anéis aromáticos aliados por uma ponte de metileno e apresenta-se nas formas isoméricas *trans* e *cis*, no entanto, a maioria das vantagens médicas registradas é atribuída a isoforma *trans*- Resveratrol (Figura 1) (1, 3). A exposição à radiação e ao calor pode converter a isoforma *trans* em *cis*, cuja sua estrutura se assemelha ao do estrógeno sintético dietilestibestrol e por isso o Resveratrol também foi classificado como um fitestrogênio (8).

Figura 1 - Estrutura química dos isômeros *trans*-Resveratrol e *cis*-Resveratrol



(LIAZID, et al., 2007)

O Resv é usado como um agente anti-inflamatório, no entanto, esta molécula possui várias propriedades biológicas, como neuroprotetora, cardioprotetora, antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antiviral, e antienvhecimento (5-8). Uma das atividades biológicas mais marcantes do Resveratrol intensamente investigada nos últimos anos tem sido suas propriedades preventivas ou anticâncer (20) que foram descobertas em 1997 por Jung e colegas, quando demonstraram as atividades anti-iniciação, anti-promoção e anti-progressão (21). A

atividade antitumoral desse composto se dá por meio de sua ação em diversas vias de sinalização celular, incluindo angiogênese e inibição de invasão, adesão e metástase, apreensão do ciclo celular, supressão da proliferação celular tumoral, indução de apoptose e diferenciação (9).

O principal obstáculo no processo de tratamento do câncer é a resistência aos medicamentos das células tumorais. A grande parte das mortes relacionadas ao câncer é devido a resistência à quimioterápicos. Dessa forma, encontrar remédios que possam resultar no aumento a quimissensibilidades das células tumorais é a chave para superar a resistência (12).

Neste contexto, a investigação de compostos naturais como coadjuvantes tem ganhado grande notoriedade no tratamento do câncer. Os mecanismos dos compostos naturais que atuam como adjuvantes quimioterapêuticos podem ser resumidos em três abordagens: potencializando os efeitos da radioterapia e quimioterapia, melhorando diretamente o efeito tumoricida, revertendo a quimiorresistência e aliviando a toxicidade induzida por drogas quimioterapêuticas (22). Acredita-se que o Resv exerça efeitos que revertem a resistência a drogas em uma variedade de células tumorais (8, 18). Além disso, estudos demonstraram que o Resv induz a antiproliferação e apoptose em vários tipos de câncer, como mama, próstata, estômago e cólon (6, 10, 11, 23, 24).

Em células de melanoma humano, A375 e SK-MEL-31, foi observado que o Resv inibiu a viabilidade, interrompeu o ciclo celular (fase G1), aumentou as taxas de apoptose e a expressão das proteínas Bax e Caspase-3 foi dependente da dose (9, 25, 26). Em células de câncer de pulmão, A549, o Resveratrol também inibiu a viabilidade celular, promoveu a apoptose e a parada do ciclo celular (G0 / G1). Nas células câncer orais, esse composto também foi capaz de inibir a proliferação, induzir a apoptose e interromper o ciclo celular (G2 / M) (27).

O tratamento combinado de Resv e Gefitinibe em câncer de pulmão de células não pequenas induziu significativamente a apoptose celular, autofagia, interrupção do ciclo celular (G2/M), acompanhada de aumento da expressão da Caspase-3 clivada, LC3B-II, p53 e p21 (28). A combinação do Resv +ABT-737 também diminuiu acentuadamente a viabilidade celular, aumentou o dano ao DNA e a apoptose, promoveu o acúmulo de células na fase G0 / G1 do ciclo celular e a regulação positiva da razão BAX / BCL-2 (29). No entanto, outro estudo sugeriu que concentrações mais baixas de RResv causam acúmulo de células na fase S,



enquanto concentrações mais altas causam acúmulo de células na fase G<sub>0</sub> / G<sub>1</sub> ou G<sub>2</sub> / M (30).

O Resv pode ser usado como: (1) agente quimioterápico neoadjuvante: devido sua capacidade de inibir a proliferação de células cancerosas e induzir a apoptose nessas células, esse composto pode ser usado antes da cirurgia para diminuir o volume do tumor; (2) Agente quimioterápico adjuvante: usado para inibir a invasão tecidual local e a ocorrência de metástases após a cirurgia; (3) agente de sensibilização à radioterapia e/ou quimioterapia em combinação com agentes quimioterápicos, como docetaxel, capsaicina, docetaxel, doxorrubicina, temozolomida e gemcitabina, uma vez que o Resv pode melhorar os efeitos anticâncer promovidos por esses fármacos; (4) agente preventivo do do câncer: usado em pessoas sob alto risco de câncer; (5) agente radioprotetor: usado para diminuir os efeitos adversos do tratamento induzidas por radioterapia (5, 31).

Foi relatado que a combinação Resv + docetaxel em células de câncer de próstata humano modula várias proteínas apoptóticas (PARP, Caspases clivadas), pró-apoptóticas (BAX, BID, BNIP3, BAK) e anti-apoptóticas (MCL-1, BCL-XL, BCL-2), estimula a maior expressão de inibidores do ciclo celular p21, p27 e menor expressão de cinases dependentes de ciclina CDK1, CDK4, ciclina E1 e ciclina B1 o que interrompe a transição das células de fases G<sub>1</sub> / S e G<sub>2</sub> / M (6, 31).

O Resv também demonstrou reverter a resistência à adriamicina em células cancerosas da bexiga (32) e Leucemia mielóide aguda (33), além de ser capaz de sensibilizar células de carcinoma de células renais para morte induzidas pelo fator de necrose tumoral (34).

Em estudo *in vivo*, a combinação de Resv, quercetina e catequina potencializou o efeito do gefitinibe no câncer de mama resistente e causou uma redução dramática e significativa nas metástases pulmonares (35). Esse composto também é um agente protetor eficaz nas células normais contra toxicidade induzida pela terapia com rádio iodo (36).

O Resv é intimamente ligado às bases de DNA, particularmente a guanina (5), e como se sabe que os íons cobre são encontrados no núcleo, ligado às bases de guanina na cromatina, a mobilização desse cobre endógeno pelo Resv resulta na clivagem do DNA pró-oxidante no local. Como descrito anteriormente, o Resv é um antioxidante, mas na presença de ions exhibe propriedades pró-oxidantes, e seu efeito pode levar a quebra oxidativa do DNA celular, o que

resulta na apoptose Além disso, é relatado que a concentração de cobre aumenta em várias doenças malignas (37).

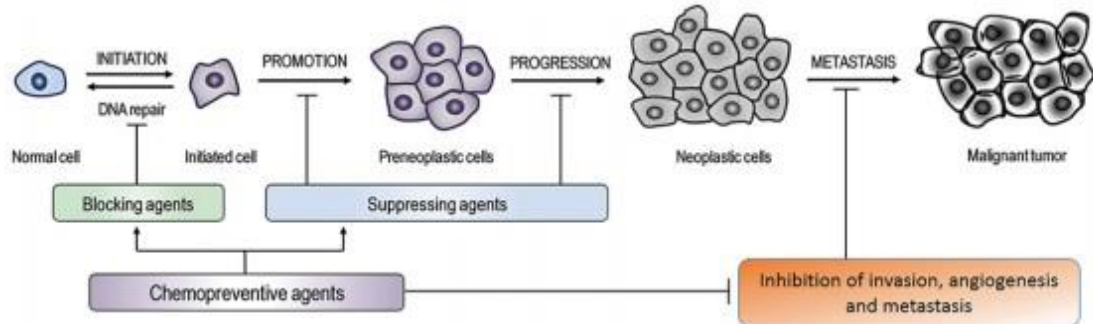
Existem vários mecanismos de ação para explicar a atividade antiproliferativa do Resv, incluindo, a ativação da via apoptótica intrínseca, a liberação mitocondrial do citocromo c e o envolvimento de BAX, a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), modulação da via p53 e a ativação da via extrínseca do receptor da morte. O Resv interfere com a cadeia respiratória mitocondrial e leva ao aumento da produção de ERO. O estado redox das células desempenha um papel em muitos tipos de apoptose e as EROs produzidas no nível das mitocôndrias podem estar envolvidas na morte celular. Sabe-se que o Resv pode funcionar como um agente pró-oxidante e anti-oxidante, isso vai depender da concentração administrada às células e do tipo de célula. Além disso, o Resv pode induzir apoptose em vários tipos de células tumorais através da modulação das proteínas pertencentes à família BCL-2. O Resv neutraliza as proteínas anti-apoptóticas enquanto induz a expressão proteica, alterações conformacionais e redistribuição celular das proteínas pró-apoptóticas da família BCL-2 (38), sendo assim, o Resveratrol demonstrou ser uma arma natural na guerra contra o câncer (39).

## 2.2 Tumorigênese

O câncer é caracterizado pelo crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos sendo considerado um grande problema de saúde pública em todo o mundo (40). Entende-se o desenvolvimento do câncer como um processo de várias etapas: iniciação, promoção, progressão e metástase. A iniciação envolve mutação ou alteração de genes que surgem de forma espontânea ou induzida pela exposição a um agente cancerígeno. Alterações genéticas podem resultar em desregulação das vias de sinalização bioquímica associadas à proliferação, sobrevivência e diferenciação celular, que podem ser influenciadas por alguns fatores, incluindo a taxa e o tipo de metabolismo carcinogênico e a resposta da função de reparo do DNA. O estágio de promoção é considerado demorado e reversível, onde as células pré-neoplásicas em proliferação ativa se acumulam. A progressão é a fase entre uma lesão pré-maligna e o desenvolvimento de câncer invasivo, é o estágio final da transformação neoplásica, onde ocorrem alterações fenotípicas, genéticas e proliferação celular, envolvendo um aumento rápido no tamanho do tumor, onde as células podem passar por mais mutações com potencial invasivo e metastático. A metástase envolve a disseminação de células cancerígenas do local primário

para outras partes do corpo através da corrente sanguínea e do sistema linfático (41) (Figura 2).

Figura 2 - Fases de tumorigênese: iniciação, promoção, progressão e metástase



(SIDDIQUI et al., 2015)

### 2.3 Melanoma cutâneo

O câncer de pele é a neoplasia maligna mais comum na maioria dos países, e são classificados como câncer de pele não-melanoma (Carcinoma basocelular e Carcinoma espinocelular) e Melanoma de pele (42). Entre os cânceres de pele, o Melanoma cutâneo (MC) é o tipo mais agressivo, (43) e sua taxa tem aumentado nos últimos 30 anos (44). É um tumor de alta prevalência, classificado como o 19º câncer mais comum em todo o mundo (45). O número estimado de novos casos no Brasil para o ano de 2020 será de 8.450, sendo 4.200 homens e 4.250 mulheres (46). Representa 4% dos tumores de pele, no entanto, menos que 15% dos pacientes sobrevivem 5 anos após o diagnóstico de melanoma metastático (47). Apesar dos recentes avanços no diagnóstico e na terapia de diferentes tipos de câncer, o câncer de pele do melanoma ainda apresenta alta taxa de mortalidade relacionada à resistência à quimioterapia, comportamento agressivo e propensão a metastizar rapidamente (44, 48). Portanto o diagnóstico preciso e o tratamento adequado estão associados a altas taxas de cura (48).

O MC tem etiologia multifatorial. Esse câncer é decorrente de uma interação entre suscetibilidade genética / epigenética dos indivíduos e a exposição de fatores ambientais. A exposição à radiação ultravioleta (UV) devido ao seu efeito genotóxico, é o fator de risco ambiental mais importante e potencialmente modificável para o desenvolvimento de melanoma maligno. As queimaduras solares, bronzamento artificial, fitoquimioterapia com radiação também estão associadas a um risco aumentado de MC. Os fatores de risco mais importantes do hospedeiro são o número de nevos melanócitos, história familiar e suscetibilidade genética.

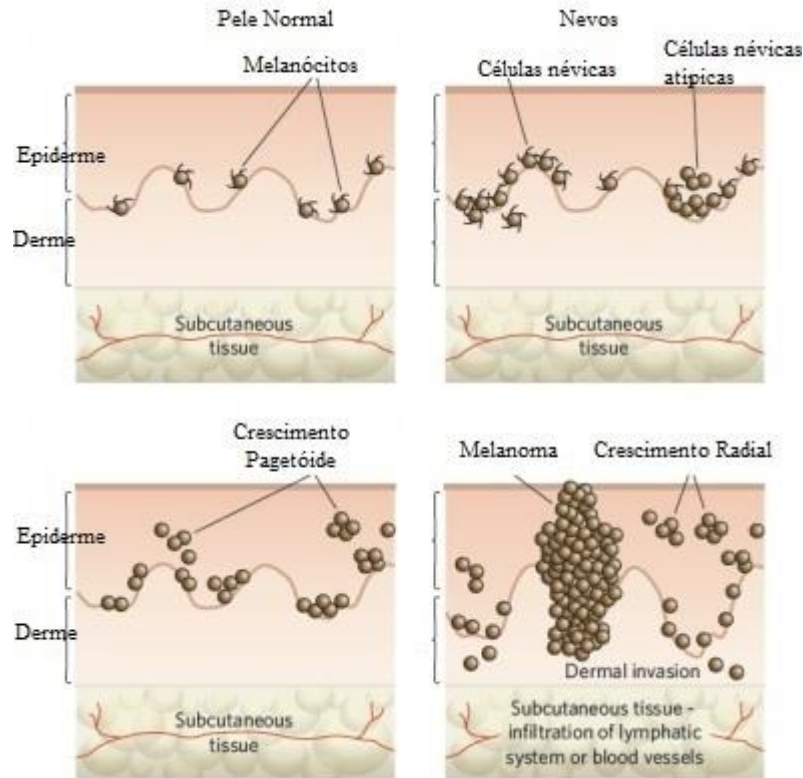
Certas características fenotípicas aumentam o risco de desenvolver melanoma em aproximadamente 50%, como pele clara, numerosas sardas, cabelos ruivos, sensibilidade ao sol e uma incapacidade de se bronzear (49).

Os melanócitos são originados de células da crista neural (CN). No decorrer do desenvolvimento embrionário, as células-tronco pluripotentes diferenciam-se em células CN multipotentes, podendo então se diferenciar ainda mais em melanoblastos e por fim, amadurece em melanócitos (50). Os melanócitos são encontrados na epiderme, folículos capilares, íris, coroide e estria vascular da cóclea da ouvido interno (51). Essas células são conhecidas por serem produtores de melanina, um pigmento que colore os olhos, pele e cabelos (52). O pigmento tem uma função fundamental para o organismo, ele fornece a proteção contra o efeito da radiação ultravioleta (RUV), conseguindo absorver e dispersá-la, reduzindo assim, os danos ao DNA celular e a instabilidade genômica. Este processo é ainda mais importante para fins de bronzeamento e responde a danos causados por RUV produzindo mais pigmentos (51).

Os quatro subtipos principais de MCo são, disseminação superficial, que é responsável por aproximadamente 70% de todos os Melanomas, Melanoma nodular que representa 15-30%, Lentigo maligna e Acral lentiginoso. Grande parte dos MCaparecem como tumores superficiais confinados à epiderme e podendo ficar por muitos anos em uma fase de crescimento horizontal ou “radial”, em que são na maioria das vezes curáveis apenas pela excisão cirúrgica. Os que infiltram na derme são considerados de fase de crescimento “vertical” e têm potencial metastático. Os MC nodulares não têm crescimento radial identificável ou fase in situ, e entram na fase de crescimento vertical quase desde o início. Ulceração do tumor, taxa mitótica, presença de invasão linfovascular, microssatélites, regressão, invasão perineural e a presença de linfócitos infiltrando o tumor são outros fatores histológicos que afetam o potencial metastático (53).

Clinicamente, os MC são classificados de acordo com a espessura total em milímetros, presença de ulceração, profundidade de penetração e localização das metástases existentes. Histologicamente, podem distinguir-se cinco estádios distintos de progressão do melanoma: nevos benignos sem alterações displásicas, nevos displásicos, fase de crescimento radial, fase de crescimento vertical e melanoma metastático (Figura 3) (54).

Figura 3 - Tumorigênese da lesão neoplásica melanocítica da pele.



(GRAY-SCHOPFER, et al., 2007)

A avaliação clínica começa com a suspeita da lesão melanocítica, e entre os principais critérios de diagnóstico clínico do melanoma encontra-se a regra mnemônica do sistema ABCD (55), que foi desenvolvido para pacientes e médicos reconhecerem características associadas a essa malignidade. A assimetria, B borda irregular, C variação de cor, D diâmetro superior a 6 mm. Deve ser considerada suspeita de melanoma, qualquer lesão pigmentada que estiver dentro do acrônimo ABCDE. As lesões identificadas devem ser avaliadas quanto a área circundante para possíveis lesões satélites ou focos metastáticos em trânsito, as superfícies cutâneas remanescentes também devem ser inspecionadas quanto a presença de qualquer lesão adicional suspeita. Devem ser documentadas toda lesão de aspecto benigno e todas as bacias linfonodais devem ser palpadadas para linfadenopatia. Após a lesão ser avaliada e documentada, a biópsia e a revisão histológica devem ser consideradas. A amostragem da lesão em questão pode ser realizada através de vários métodos, incluindo biópsia excisional e biópsia parcial (56, 57).

O MC maligno é dividido em quatro estágios, sendo o estágio I o menos grave e o estágio IV, o mais grave. O estágio III inclui doença localmente avançada (inoperável) e o estágio IV inclui metástase à distância. Os tratamentos convencionais para o melanoma são, cirurgia, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia (16). Além da cirurgia ser o tratamento primário para o melanoma, é também o único potencialmente curativo. O diagnóstico precoce e o tratamento cirúrgico adequado curam 80% a 90% dos pacientes, enquanto 10% a 20% apresentam uma recaída como recidiva local / regional ou disseminação à distância, no entanto pacientes com melanoma maligno metastático têm prognóstico ruim (58). A quimioterapia não funciona tão bem no melanoma quanto em outros tipos de câncer, mas, ainda assim, pode melhorar a qualidade de vida e prolongar a vida do paciente. Da mesma forma que a quimioterapia, a radioterapia pode ser usada para aliviar dores (especialmente nos casos de metástases ósseas) e evitar a volta (recidiva) do tumor. A imunoterapia é outra opção para tratamento do melanoma, com uso dos interferons, substâncias que o organismo produz para combater infecções e que pode ser usada nos casos em que haja maior probabilidade de o câncer voltar após o tratamento (58). Apesar dos avanços científicos no conhecimento da doença, as opções de tratamento quimioterápico (44, 48), são dificultadas por efeitos colaterais tóxicos e pelo desenvolvimento frequente de resistência a múltiplas drogas. Os tratamentos radioterápicos podem causar danificação do tecido normal (17, 59), e o Resv é um composto que mostrou ter um perfil de segurança muito favorável ao consumo, sem toxicidade ou toxicidade mínima para células normais (8), além de ser um agente protetor eficaz nas células normais contra a toxicidade induzida pela terapia com radioiodo (18).

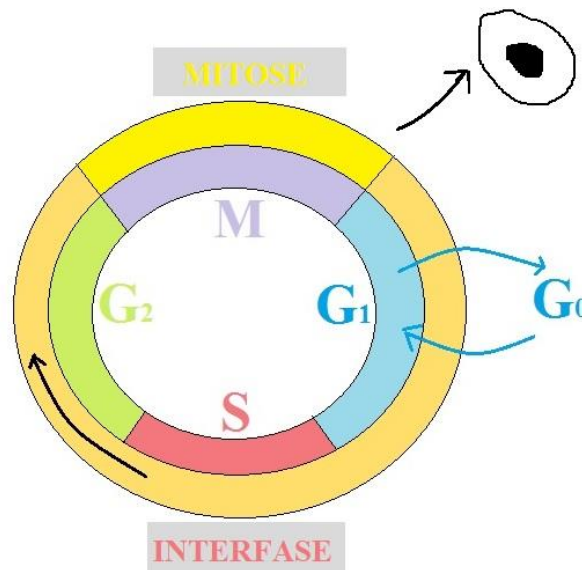
## 2.4 Ciclo Celular

O ciclo celular compreende a interfase, que consiste nas fases  $G_1$ , S e  $G_2$ , e a fase mitótica M (Figura 4). Durante a interfase, uma célula se prepara para divisão por meio de crescimento e replicação do DNA. A fase  $G_1$  é o intervalo entre o fim da citocinese de uma divisão anterior e o início da fase S, e é a fase em que a célula cresce em preparação para a replicação do DNA, bem como a fase em que é decidido se uma a célula se dividirá novamente ou entrará em  $G_0$ , uma fase de repouso. A remoção de fatores de crescimento no início da fase  $G_1$  irá enviar a célula em  $G_0$ , mas a sua remoção mais tarde, no  $G_1$ , após o ponto de verificação de restrição, permitirá que a célula continue na fase S. Então, na fase S, o genoma inteiro da célula é replicado, ou seja, a replicação do DNA ocorre e cada cromossomo é duplicado, tornando-se

duas cromátides irmãs. Na fase  $G_2$ , a célula se prepara para a divisão e verifica o tamanho e os erros de duplicação de DNA, a célula sintetiza os materiais necessários para a mitose, como RNA e proteínas, essa fase marca a lacuna entre o final da fase S e o início da mitose. Durante a fase M, o envelope nuclear se decompõe, a cromatina é condensada e o DNA  $4n$  é segregado em duas células filhas diplóides. Nessa fase começa a mitose, que é subdividida em cinco fases, prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase, e termina em citocinese. A reprodução através do ciclo celular resulta em células filhas geneticamente idênticas. Após a conclusão da divisão celular, as células podem retomar a próxima rodada do ciclo celular ou permanecer quiescentes na fase  $G_0$ . Para garantir que a divisão celular ocorra sem erros, o ciclo celular é regulado de maneira temporal e espacial. O sistema regulador do ciclo celular consiste em pontos de checagem que param durante as transições de fase para avaliar se as condições celulares são adequadas para o crescimento e a divisão. A regulação do ciclo celular inclui a fosforilação de proteínas por complexos de quinases dependente de ciclinas (CDKCs) e a expressão temporizada de ciclinas (A, B, D e E) (60, 61). O câncer pode ser pensado como uma doença do ciclo celular: onde uma célula cancerosa ignora os sinais de “parada” e não espera pelos sinais de “prosseguir” (59).

O DNA pode sofrer danos de origem exógena (radiação ultravioleta, radiação ionizante, químicos genotóxicos), e endógena (espécies reativas de oxigênio). Esses agentes causam alterações como quebras simples ou duplas na fita de DNA, ligações entre bases, erros de pareamento, inserções ou deleções, que se não reparadas podem causar o acúmulo de mutações em diversos genes, incluindo os responsáveis pelo controle ou progressão do ciclo celular. Diante de um dano, as células sinalizam para o bloqueio temporário do ciclo celular com o propósito de realizar o reparo, no entanto, as proteínas do ciclo ativam o mecanismo de morte celular programada se o dano não for corrigido (62, 63).

Figura 4 - Fases do ciclo celular composta em interfase (fases G<sub>1</sub>, S, e G<sub>2</sub>), seguido pela fase mitótica (mitose) e fase G<sub>0</sub>.



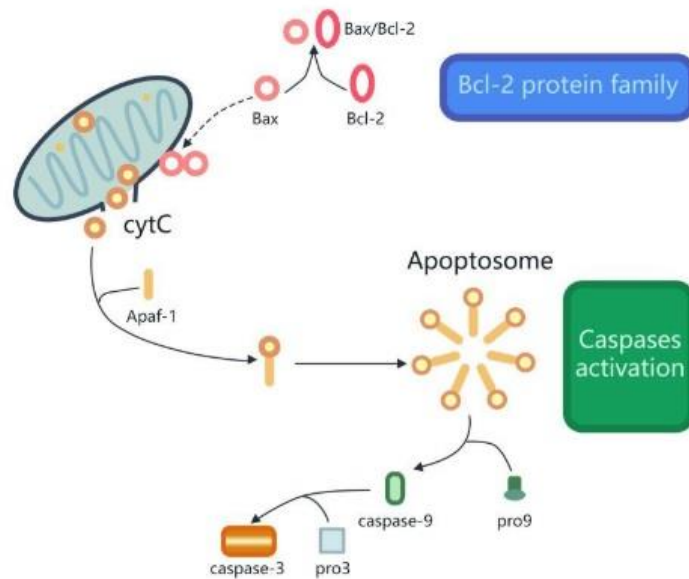
(Autoria própria)

## 2.5 Morte celular por Apoptose

A morte celular programada ou apoptose pode ser desencadeada em uma célula através das vias extrínseca ou intrínseca (64). A via de sinalização extrínseca é induzida pela ligação de receptores de morte transmembrana e ligantes de morte, e a via de sinalização intrínseca é desencadeada por estímulos não mediados por receptor, como estresse oxidativo, dano ao DNA e estresse no Er (65). A via intrínseca é regulada pela família de proteínas do linfoma de células B-2 (BCL-2) (66), que abrange proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-w e Bcl-x<sub>L</sub>), membros pró-apoptóticos de múltiplos domínios (Bax e Bak) e membros pró-apoptóticos de domínio BH3 (Bad, Bid, Bim, Bik, Noxa e PUMA). Um membro da família Bcl-2 pró-apoptótico, Bax, tem um papel essencial na indução de apoptose em resposta a estímulos de estresse. O Bax está localizado principalmente no citoplasma, mas a estimulação apoptótica promove sua redistribuição na membrana mitocondrial. Após a translocação para as mitocôndrias, Bax forma complexos proteicos homo-oligoméricos que alteram a permeabilidade da membrana mitocondrial, liberando o citocromo c (66). O citocromo c juntamente com o fator de ativação da peptidase apoptótica 1 (APAF1) e a desoxATP geram um apoptossoma que ativa a caspase 9, levando ao processamento da caspase-3 (65-67) (Figura 5).



Figura 5 - Apoptose dependente de mitocôndria



(IGEM.org.2016)

A indução do apoptose em células alteradas de lesões cancerizáveis pode remover células potencialmente prejudiciais, o que resulta no bloqueio do crescimento tumoral. A desregulação desse processo de morte está ligada à proliferação celular não controlada, desenvolvimento e progressão do câncer e resistência ao câncer em terapias medicamentosas. Diante disso, a desregulamentação na maquinaria da morte celular apoptótica é uma marca registrada do câncer. Estratégias terapêuticas que visam moléculas envolvidas na resistência apoptótica, representam uma abordagem válida a ser seguida, a fim de restaurar a sensibilidade das células cancerígenas à apoptose e superar a ineficácia dos tratamentos (46).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos *in vitro* do Resveratrol (Resv) na viabilidade, atividade proliferativa e de morte celular programada por Apoptose em células do Melanoma cutâneo (MC) murino B16F10.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Averiguar o efeito do Resv sobre a viabilidade das células da linhagem de melanoma murino-B16F10.
- Avaliar a indução da apoptose mediada pelo Resveratrol nas células de MC murino B16F10.
- Avaliar o efeito do tratamento do Resv sobre a expressão de genes relacionados com o ciclo celular das células de MC murino B16F10.

## **4 PRODUTO CIENTÍFICO**

4.1 Produto Científico: *Effects of Resveratrol on the cell viability, proliferation, and apoptosis of murine B16F10 cutaneous melanoma cells: in vitro assays*, formatado segundo as normas para publicação do periódico “Phytomedicine” (ISSN: 0944-7113).

**Effects of Resveratrol on the cell viability, proliferation, and apoptosis of murine B16F10 cutaneous melanoma cells: *in vitro* assays.**

**Running-title:** Antitumor effects of Resveratrol on murine cutaneous melanoma.

Valéria Couto Quintão<sup>a</sup>; Otávio Cardoso-Filho<sup>a</sup>; João Lucas Rodrigues dos Santos<sup>a</sup>; Magda Mendes Vieira<sup>a</sup>; Amanda Souto Machado<sup>a</sup>; Amanda Rodrigues Santos<sup>a</sup>; Andréia de Souza Brito<sup>a</sup>; Miriam Teresa Paz Lopes<sup>b</sup>; Sérgio Henrique Sousa Santos<sup>c</sup>; Lucyana Conceição Farias<sup>e</sup>; André Luiz Sena Guimarães<sup>e</sup>; Mariléia Chaves Andrade<sup>d</sup>; Ludmilla Regina de Souza David<sup>a</sup>; Alfredo Mauricio Batista De-Paula<sup>a,e</sup>

<sup>a</sup>Núcleo de Pesquisa Epidemiológica e Molecular Catrumano (NUPEMOC). Laboratório de Pesquisa em Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), 39401-001, Montes Claros, MG, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Farmacologia. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>c</sup> Instituto de Ciências Agrícolas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Montes Claros, Brasil.

<sup>d</sup> Departamento de Fisiopatologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Brasil

<sup>e</sup> Departamento de Odontologia. Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), 39401-001, Montes Claros, MG, Brasil.

**Adress correspondence to:**

Alfredo Maurício Batista De-Paula.

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Hospital Universitário Clemente de Faria - Universidade Estadual de Montes Claros.

Avenida Cula Mangabeira, 562. Bairro Santo Expedito, Montes Claros.

Minas Gerais, Brasil.

CEP: 39401-001.

Telefone: 55-21-332248380

e-mail: [ambpatologi@gmail.com](mailto:ambpatologi@gmail.com)

## Abstract

**Introduction:** Resveratrol (Resv), a naturally occurring polyphenol, acts as a negative modulator of molecular pathways related to the progress of malignancies, including the use of the cell cycle and programmed cell death of cancer cells. Resv demonstrates a compound with low toxicity in normal cells, being used in research as an antineoplastic treatment in an adjuvant manner, promoting the reduction of the resistance of cancer cells to the drugs used. Cutaneous Melanoma (CM) is a cancer that develops in melanocytes, which is multifactorial in nature. Studies demonstrate that this cancer is resistant to conventional antineoplastic treatment due to its fast evolution, notably the ability to cause metastases in the early stages of lesion development and resistance to current chemotherapy treatments.

**Aim:** In the present study, we investigated the action of Resveratrol on parameters such as viability, proliferation and programmed cell death in murine cutaneous melanoma cells – B16F10.

**Methods:** B16F10 cells were treated with Resv (1.56-200  $\mu\text{M}$ ), of propidium iodide/acridine orange assay, mRNA expression by qPCR with BAX and Caspase primers and cell fragmentation by flow cytometry were used. The cell cycle was assessed by flow cytometry using the marking of protid iodide. We observed that Resv functions as an inhibitor of cancer cell proliferation, apoptosis stimulator and cell cycle blocker in B16F10 cells. These findings provide further evidence to support Resv as a nutraceutical with adjuvant anticancer therapeutic properties.

**Results:** Treatment with Resv has been shown to reduce cell viability in a concentration-dependent manner. The assays confirm the potential for apoptosis inducing Resv in cutaneous melanoma cells -B16F10. In addition, a change in the cell cycle was avoided in cells treated at concentrations of 25 and 50  $\mu\text{g/mL}$ , where there was a higher percentage of cells in the G2/M phases, and in cells treated at a concentration of 100  $\mu\text{g/mL}$ , a percentage of cells in each phase compatible with the control group, however, a concentration of 100  $\mu\text{g/mL}$  in the apoptosis assays showed higher rates of cell death.

**Conclusion:** The results of the present study indicated that Resveratrol was able to inhibit viability, induce apoptosis and block the cell cycle in B10F10 murine melanoma cells.

**Keywords:** 3,5,4'-trihidroxiestilbeno. cutaneous melanoma. cell cycle. cell proliferation. programmed cell death.

## Introduction

Resveratrol (Resv) is a polyphenol present in several plant species, encompassing those often consumed by humans such as blueberry, raspberry, blackberry and grape, and is also found in wine (1, 2). The Resv shows a safety profile very favorable to consumption, with no toxicity or minimal toxicity for normal cells (3). It is typically used as an anti-inflammatory agent, however, this molecule has several biological properties, namely, neuroprotective, cardioprotective, antioxidant, antibacterial, antifungal, antiviral and anticancer. Its chemical structure is composed of two phenol rings combined with an ethylene bridge, and presents trans and cis isomeric forms (4). The trans isoform is the main isoform and represents the most widely studied chemical form (3).

Resv mediated anticancer activities indicate its action in several cell signaling pathways, including angiogenesis and inhibition of invasion, adhesion and metastasis, arrest of the cell cycle, suppression of tumor cell proliferation, induction of apoptosis and differentiation (5). Inhibition of proliferation and apoptosis are observed in various types of cancer, such as breast, prostate, gastric and colon tumors, and melanoma skin cancer (6-8). At the same time, Resv has been shown to inhibit the resistance of cancer cells to chemotherapy drugs, characteristic that can be essential for increasing the survival of the carrier of the disease (9, 10).

Despite recent advances in diagnosis and therapy of different types of cancer, the melanoma skin cancer still has high mortality rate related to resistance to chemotherapy, aggressive behavior and propensity to metastasize quickly (11, 12). It is a tumor that originates in melanocytes, of a multifactorial nature, which represents only 4% of skin tumors, but less than 15% of patients survive 5 years after diagnosis of melanoma metastatic (13).

MC is one of the most aggressive cutaneous neoplasms, with great capacity for proliferation, stimulation of angiogenesis, impairment of successive levels of the dermis and generation of metastases by lymphatic or hematogenic route. Therefore, it is essential to identify new strategies or new therapeutic agent that can overcome the chemoresistance and radioresistance of cutaneous melanoma (MC). Resveratrol's anti-tumor properties can be promising for the treatment of melanoma. Resv has been shown to reverse adriamycin resistance in bladder cancer cells (14) and acute myeloid leukemia (15). It was able to sensitize renal cell carcinoma cells to death induced by tumor necrosis factor (16). In an *in vivo* study, the combination of Resveratrol, quercetin and catechin potentiated the effect of gefitinib in resistant breast cancer and caused a dramatic and significant reduction in lung metastases (17). This compound is also an effective protective agent in normal cells against toxicity induced by

radioiodine therapy ([18](#)).

Thus, the present study evaluated the effects of Resveratrol on viability, induction of programmed cell death and proliferative activity of murine cutaneous melanoma cells (B16F10) *in vitro*.

## Material and Methods

### *Reagents*

Resveratrol (Resv), Ethidium Bromide, Acridine Orange Base, and Trypan Blue Solution, RNase and Dimethyl sulfoxide were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). The trypsin-EDTA was acquired from Life Technologies. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium, trizol, DNase (Deoxyribonuclease I) were obtained of Imbion. Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverse transcriptase, 3,4,5-dimethylthiazol-2,5 biphenyl tetrazolium bromide, RnaseOUT (15) and propidium iodide were obtained from Invitrogen (USA). Fetal bovine serum, NaHCO<sub>3</sub> amphotericin B, ampicillin and streptomycin were obtained from Gibco (USA). TaqMan Universal PCR Master Mix and the primers B-actin, BAX and CASP3 purchased from Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA. OligodT (15) and Random Primers were obtained from Promega. Gallios cytometer were obtained from Beckman Coulter Life sciences. Spectrophotometer (DR-200B) and fluorescence microscopy (Olympus FSX100) were obtained from Olympus Life Science.

### *Cell culture*

Murine B16F10 cutaneous melanoma (CM) cell line (ATCC® CRL-6475™) was kindly provided by Antitumor Substances Laboratory, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil. B16F10 cells were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS (v:v), antibiotic ampicillin (0.27 mM), amphotericin B (5,41 μM) and streptomycin (0,06 mM). The cells were kept in a humid incubator at 37°C, 80% humidity and 5% CO<sub>2</sub>. After reaching around of 80% confluence, they were trypsinized using Trypsin / EDTA. The cells number needed for each experiment was determined by counting in a Neubauer chamber with trypan.

### *Cell viability assay*

Cell viability analysis was performed using the MTT (3- 4,5-dimethyl-thiazol-2-yl -2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, MTT reagent is enzymatically reduced to purple formazan by viable cells only. Initially,  $2 \times 10^3$  cells/well were seeded in 96-well plates. The cells were allowed to adhere to culture microplates for 24 h, and were then exposed to increasing



concentrations of Resveratrol (1.56 to 200  $\mu$ M) for 48 h. A group of control cells was incubated with Phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) for the same period of time. Next, the cells were incubated with 0.5 mg / mL of MTT at 37°C for 4 h. MTT solution was removed, and the formazan was extracted from the cells with 200  $\mu$ L of dimethyl sulfoxide (DMSO) (19). The absorbance (570 nm) was measured using a spectrophotometer (DR-200B). Each concentration was tested in triplicate from three independent experiments. The results were expressed as viable cell percentage in relation to the control group. Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM).

#### *Cell death assays*

Differential staining with ethidium bromide/acridine orange (BE/AA) allows us to distinguish viable cells from those that are cell dead due to apoptosis or necrosis. In six-well plates,  $3 \times 10^5$  cells/well were seeded. The cells were then treated with Resveratrol in concentrations of 25  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL and 100  $\mu$ g/mL for 48 h. Each treatment was removed, the cells were detached from the plate, centrifuged and resuspended in 25  $\mu$ L of RPMI medium. Then, 1  $\mu$ L of the BE/AA (1:1) mixture (0.5 mg/mL both BE and AA) was added to the cells. The cells were immediately analyzed by fluorescence microscopy (Olympus FSX100) at 5 $\times$  magnification (20). Images were made from three fields per well. Only cells that emitted green fluorescence were classified as viable cells, and dead cells were classified from red or orange fluorescence. Subsequently, the images were submitted to the ImageJ<sup>®</sup> program to quantify the percentage of dead cells. Each concentration was tested in triplicate from three independent experiments, and the results were represented as mean + SEM.

#### *Quantitative reverse transcription-qPCR-based expression gene*

B16F10 cells were seeded in 25 cm<sup>2</sup> culture flasks. Different amounts of cells were established so that the control group reached the confluence only on the last experimental day, and so that all experimental groups had the number of cells necessary for RNA extraction. Thus,  $2 \times 10^5$  cells and  $3,5 \times 10^5$  were seeded for control and Resveratrol groups, respectively. Resveratrol treatments were carried out with 25  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL and 100  $\mu$ g/mL for 48 h. After the treatments, the adhered cells were harvested and used for the extraction of nucleic acids. Samples were treated with DNase I to remove genomic DNA residues. Then, the reverse transcription reaction was performed using 1000 ng of total RNA, M-MLV Reverse

transcriptase, OligodT (15), Random Primers and RNase inhibitors (RnaseOUT™). Procedures were performed according to the manufacturer's instructions. The cDNA obtained was stored at -20 °C. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was performed using a TaqMan gene expression assay according to the manufacturer's recommendations. 5 µL of the TaqMan® Universal PCR Master Mix assay (2×), 0.5 µL of the primer (TaqMan gene expression assay 20x), 3.5 µL water and 1 µL of cDNA were mixed for each sample. The primers specifications used were: B-actin, BAX, and CASP3 (Table 1). The comparative CT method was applied to compare the gene expression levels between the groups using the equation  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (21). Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM).

#### *DNA fragmentation and Cell cycle analysis*

We used the flow cytometry assay with propidium iodide (PI) to assess DNA fragmentation and the cell cycle. B16F10 cells were plated in the amount of  $2 \times 10^5$  cells/well and treated at concentrations of 25 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL for 48 h. Next, cells were collected and fixed with 70% ethanol (v:v) for 2 years at 4°C, rinsed with PBS, incubated with 50 µg/mL RNase for 30 min at 37°C, and the genetic material was labeled with 50 µg / mL PI for 30 min at room temperature in the dark. A total of 30,000 events per sample were counted on the Gallios cytometer (Beckman Coulter, Life sciences). Cells percentages in the different phases of the cell cycle were determined using the kaluza software. Only cells with DNA content between 2n-4n were considered in the analysis of cell cycle. DNA fragmentation was identified in the sub-G1 population (DNA content <2n) and calculated considering the totality of events. Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM).

#### *Statistical analysis*

Statistical analysis of the data was performed using the GraphPad Prism software (version 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA). The data were evaluated by one-way ANOVA, by two-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. Statistical significance was accepted with a  $p < 0,05$ .

## Results

### *Resv administration decreases cell viability in B16F10 melanoma cells*

The cell viability assay demonstrated that Resveratrol reduced the viability of B16F10 cells at all concentrations analyzed (1.56 to 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $p < 0.05$ ). The intensity of this effect was cell concentration-dependent, with reductions between  $75.35 \pm 7.334$  (1.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) to  $21.66 \pm 0.3340$  (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Figure 1). Reductions of  $35.72 \pm 1.007$ ,  $27.49 \pm 0.6107$  and  $24.50 \pm 0.3897$  in the viability of cells treated with 25, 50 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Resv, respectively, were evidenced in 48 h. Based on this result, these three concentrations of Resveratrol (Resv25, Resv50 and Resv100) were adopted for the next tests (Figure 1).

### *Resveratrol-induced cell death*

Cell staining with ethidium bromide and acridine orange revealed that Resveratrol promoted cell death (red or orange stains) in varying intensities according to the treatment concentrations (Figure 2A). Resveratrol induced death of B16F10 cells in a very discreet manner at a concentration of 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $2.507 \pm 0.8994$  for Resv25 vs  $0.6926 \pm 0.2815$  for control), but promoted a significant increase in cell death at concentrations of 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $16.20 \pm 2.329$  for Resv50) and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $17.97 \pm 2.739$  for Resv50) in relation to the control group of 48 hours of treatment (Figure 2B).

### *Resveratrol promotes overexpression of apoptotic genes*

Transcript levels of the apoptosis-related, BAX and CASP3, were significantly increased in cells treated with Resveratrol 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Revs100) compared to the control group and at concentrations of 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Resv25) and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Resv50) (Figures 3 A and 3B). Resv25 and Resv50 did not promote significant changes in the mRNA expression of the studied genes.

### *DNA fragmentation of B16F10 cells treated with Resveratrol*

DNA fragmentation increased in cells treated with Resv25 ( $51.60 \pm 1.386$ ), Resv50 and Resv100 compared to untreated cells ( $19.84 \pm 2.236$ ) (Figure 4).

#### *Cell cycle arrest*

It was possible to observe a change in the cell cycle of B16F10 cells treated with Resveratrol at concentrations of 25  $\mu\text{g/mL}$  and 50  $\mu\text{g/mL}$ . Both presented a significantly higher proportion of cells arrested at the G2 / M phase compared with that obtained for control cells. There was no statistical difference in the cell percentage present in each phase of cell cycle on control and Resv100 groups, with the highest percentage in the G0/G1 phases (Table 2).

## Discussion

In the search for a therapeutic strategy that can aid in the treatment of cutaneous melanoma, our findings demonstrated that Resv promoted in B16F10 melanoma cells: i. reduction of cell viability, ii. alteration in proliferative activity, and iii. apoptosis. Natural compounds have historically been used as tumoricidal agents or chemotherapeutic adjuvants, reversing chemoresistance or relieving drug-induced toxicity (22). Resveratrol is a natural flavonoid present in several plants and has become known for having chemopreventive properties. Resv has been shown to be a compound that induces apoptosis and inhibits proliferation. In addition, to being able to reduce drug resistance in some cell lines, associated with its low toxicity.

At first, we evaluated cell viability in B16F10 cells treated with different concentrations of Resveratrol. In this trial, Resveratrol showed an inhibitory effect on B16F10 cells in a dose-dependent manner, which may be associated with its effect on reduction of proliferation or death of melanoma cells. From these results, it was possible to define the concentrations to be used subsequently on greater understanding of the inhibitory effect of Resv on the cells studied.

We investigated apoptotic or necrotic cell death by microscopic staining, gene expression and DNA fragmentation analysis. Microscopic analysis revealed that Resv promoted a significant increase on cell death at concentrations of 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  after 48 hours of treatment. Subsequently, the gene expression of BAX and CASPASE 3 noticed an increase in the levels of both the transcripts BAX (protein X associated with the BCL-2 family, pro-apoptotic) and of one of the main executors of apoptosis, caspase 3, on 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration compared to untreated control cells.

It has been reported that apoptosis after treatment with Resveratrol is mediated, depending on the type of cell, through the death receptor and mitochondrial pathways. Recent findings make the involvement of the death receptor pathway questionable. The pro-apoptotic Bax protein is one of the main actors in the mitochondrial form of apoptosis (23). When stimulation of apoptosis occurs, the bax is redistributed to the mitochondrial membrane, forming severe homooligomeric proteins that alter the permeability of the mitochondrial membrane, releasing cytochrome c that generate an apoptosome that activates caspase 9, leading to caspase-3 processing, which will result in apoptosis (24, 25).

The DNA fragmentation assay demonstrated that there was DNA fragmentation promoted by the drug, evidenced in the cells treated with the three study concentrations. As observed by other studies with Resveratrol, our data indicate that the reduction in cell viability

evidenced in the MTT assay relies on the activation of cell death pathways, whether apoptotic or necrotic (5, 23). Although Resveratrol is known to have an antioxidant effect, recent studies have shown that Resveratrol exhibits antioxidant and pro-oxidant properties, depending on its concentration and the type of cell, however, it has been proposed that the pro-oxidant action may be an important mechanism of action of the anticancer and apoptosis-inducing properties of Resveratrol. These pro-oxidant properties lead to the oxidative breakdown of cellular DNA in the presence of transition metal ions, such as copper (26, 27).

Deregulations that favor increased cell proliferation are considered to be marks of tumor cells. The cell cycle consists of four phases, G1 (gap 1), S (synthesis), G2 (gap 2) and M (mitosis) (28). In our study, B16F10 cells treated with Resveratrol at concentrations of 25 and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  showed a change in the cell cycle when compared to the control. In these concentrations, there were more cells trapped in the G2/M phases and fewer cells restarting the cell cycle (G1). We also observed that the concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  showed a proportion of cells in each phase compatible with the control group, where there was a higher percentage of cells in the G0/G1 phases. Together, the current results suggest that low concentration Resveratrol (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) showed a greater effect on alteration of the cell cycle and less on apoptosis, while comparatively the concentration of 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  showed less effect on the cycle and greater in apoptosis. At the concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , we did not observe a Resv effect on the cell cycle, which can be explained by significant induction of apoptosis at this concentration.

The proliferation of several human malignant cell lines is slowed by Resveratrol. Conflicting results have been reported about the induction of apoptosis by Resveratrol. Several antioxidants, such as vitamin E, N-acetylcysteine, flavonoids and carotenoids, have been reported to interfere with the progression of the cell cycle, inducing the expression of cdk inhibitors, such as p21waf1-cip1, p16ink4a and p27kip1. In the case of Resveratrol, this mechanism is still controversial. The effects on cell cycle progression can also be explained by the direct inhibition of ribonucleotide reductase and DNA polymerase (29).

Results similar corroborate findings found in this investigation. A study carried out on human melanoma cells, A375 and SK-MEL-31, showed that Resveratrol inhibited cell viability, induced cell cycle arrest (phase G1), increased rates of apoptosis, and increased Bax and caspase 3 proteins expression in a dose-dependent manner (5, 30, 31). Another study suggested that lower concentrations of Resveratrol cause accumulation of cells in the S phase, while higher concentrations cause accumulation of cells in the G0/G1 phase or G2/M phases (32). Resv increases the sensitivity to melanoma cell radiation by inhibiting proliferation and promoting

apoptosis (33, 34), in addition, Resveratrol and its trans -4,4'-dihydroxystilbene analogue have been reported to exert effects on murine melanoma-B16F10 cells, being able to induce the cycle to stop in the G1 phase and induce caspase 3 dependent apoptosis.

Therefore, Resveratrol may be a promising candidate for anti-cancer drugs complementary for the treatment of cutaneous melanoma. However, more studies should be carried out to better elucidate its anticancer effects, including with the model of in vivo approaches.

### **Conflict of Interest**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Acknowledgements**

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 of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the support to carry out this study

## References

1. Carter LG, D'Orazio JA, Pearson KJ. Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Endocrine-related cancer*. 2014;21(3):R209-25.
2. Nawaz W, Zhou Z, Deng S, Ma X, Ma X, Li C, et al. Therapeutic Versatility of Resveratrol Derivatives. *Nutrients*. 2017;9(11).
3. Ko JH, Sethi G, Um JY, Shanmugam MK, Arfuso F, Kumar AP, et al. The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(12).
4. Salehi B, Mishra AP, Nigam M, Sener B, Kilic M, Sharifi-Rad M, et al. Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits. *Biomedicines*. 2018;6(3).
5. Wu Z, Liu B, E C, Liu J, Zhang Q, Liu J, et al. Resveratrol inhibits the proliferation of human melanoma cells by inducing G1/S cell cycle arrest and apoptosis. *Molecular medicine reports*. 2015;11(1):400-4.
6. Wang Y, Romigh T, He X, Orloff MS, Silverman RH, Heston WD, et al. Resveratrol regulates the PTEN/AKT pathway through androgen receptor-dependent and -independent mechanisms in prostate cancer cell lines. *Human molecular genetics*. 2010;19(22):4319-29.
7. Lin HY, Shih A, Davis FB, Tang HY, Martino LJ, Bennett JA, et al. Resveratrol induced serine phosphorylation of p53 causes apoptosis in a mutant p53 prostate cancer cell line. *The Journal of urology*. 2002;168(2):748-55.
8. Holian O, Wahid S, Atten MJ, Attar BM. Inhibition of gastric cancer cell proliferation by resveratrol: role of nitric oxide. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2002;282(5):G809-16.
9. Jie KY, Wei CL, Min Z, Ping GJ, Ying W, Dan Z, et al. Resveratrol enhances chemosensitivity of renal cell carcinoma to paclitaxel. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 2019;24:1452-61.
10. Meng J, Guo F, Xu H, Liang W, Wang C, Yang XD. Combination Therapy using Co-encapsulated Resveratrol and Paclitaxel in Liposomes for Drug Resistance Reversal in Breast Cancer Cells in vivo. *Scientific reports*. 2016;6:22390.
11. Prasad P, Vasas A, Hohmann J, Bishayee A, Sinha D. Circisiliol Suppressed Epithelial to Mesenchymal Transition in B16F10 Malignant Melanoma Cells through Alteration of the PI3K/Akt/NF-kappaB Signaling Pathway. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(3).
12. Scolyer RA, Judge MJ, Evans A, Frishberg DP, Prieto VG, Thompson JF, et al. Data set for pathology reporting of cutaneous invasive melanoma: recommendations from the international collaboration on cancer reporting (ICCR). *The American journal of surgical pathology*. 2013;37(12):1797-814.
13. Tas F. Metastatic behavior in melanoma: timing, pattern, survival, and influencing factors. *Journal of oncology*. 2012;2012:647684.
14. Wang S, Meng Q, Xie Q, Zhang M. Effect and mechanism of resveratrol on drug resistance in human bladder cancer cells. *Molecular medicine reports*. 2017;15(3):1179-87.
15. Li Y, Guo Y, Feng Z, Bergan R, Li B, Qin Y, et al. Involvement of the PI3K/Akt/Nrf2 Signaling Pathway in Resveratrol-Mediated Reversal of Drug Resistance in HL-60/ADR Cells. *Nutrition and cancer*. 2019;71(6):1007-18.
16. Zeng Y, Li FD, Shi CW, Du JL, Xue YJ, Liu XY, et al. Mechanism and therapeutic prospect of resveratrol combined with TRAIL in the treatment of renal cell carcinoma. *Cancer gene therapy*. 2019.
17. Castillo-Pichardo L, Dharmawardhane SF. Grape polyphenols inhibit Akt/mammalian target of rapamycin signaling and potentiate the effects of gefitinib in breast cancer. *Nutrition and cancer*. 2012;64(7):1058-69.



18. Hosseinimehr SJ, Hosseini SA. Resveratrol sensitizes selectively thyroid cancer cell to 131-iodine toxicity. *Journal of toxicology*. 2014;2014:839597.
19. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European journal of biochemistry*. 2000;267(17):5421-6.
20. Liu K, Liu PC, Liu R, Wu X. Dual AO/EB staining to detect apoptosis in osteosarcoma cells compared with flow cytometry. *Medical science monitor basic research*. 2015;21:15-20.
21. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*. 2008;3(6):1101-8.
22. Lin SR, Chang CH, Hsu CF, Tsai MJ, Cheng H, Leong MK, et al. Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence. *British journal of pharmacology*. 2020;177(6):1409-23.
23. Mahyar-Roemer M, Köhler H, Roemer K. Role of Bax in resveratrol-induced apoptosis of colorectal carcinoma cells. *BMC cancer*. 2002;2:27.
24. Kumarswamy R, Chandna S. Putative partners in Bax mediated cytochrome-c release: ANT, CypD, VDAC or none of them? *Mitochondrion*. 2009;9(1):1-8.
25. Tait SW, Green DR. Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(9).
26. de la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society transactions*. 2007;35(Pt 5):1156-60.
27. Heo JR, Kim SM, Hwang KA, Kang JH, Choi KC. Resveratrol induced reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis, and cell cycle arrest in the A375SM malignant melanoma cell line. *International journal of molecular medicine*. 2018;42(3):1427-35.
28. Tan EP, Duncan FE, Slawson C. The sweet side of the cell cycle. *Biochemical Society transactions*. 2017;45(2):313-22.
29. Stivala LA, Savio M, Carafoli F, Perucca P, Bianchi L, Maga G, et al. Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(25):22586-94.
30. Gong C, Xia H. Resveratrol suppresses melanoma growth by promoting autophagy through inhibiting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Experimental and therapeutic medicine*. 2020;19(3):1878-86.
31. Yang HZ, Zhang J, Zeng J, Liu S, Zhou F, Zhang F, et al. Resveratrol inhibits the proliferation of melanoma cells by modulating cell cycle. *International journal of food sciences and nutrition*. 2020;71(1):84-93.
32. *Journal of Molecular Biology*. Index for volumes 211-216, 1990. *Journal of molecular biology*. 1990:1-86.
33. Fang Y, Bradley MJ, Cook KM, Herrick EJ, Nicholl MB. A potential role for resveratrol as a radiation sensitizer for melanoma treatment. *The Journal of surgical research*. 2013;183(2):645-53.
34. Kma L. Synergistic effect of resveratrol and radiotherapy in control of cancers. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2013;14(11):6197-208.

## LEGENDS OF FIGURES

Figure 1: B16F10 cell viability treated with Resveratrol (Resv). Treatment with Resveratrol in 1.56 - 200  $\mu$ M concentrations for 48 h. The data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the percentage mean of the viable cancer cells. Significant differences between the control group and the treaties are indicated by asterisks (\*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.0001$ ).

Figure 2: Influence of Resveratrol on B16F10 cell death. A) Live cells stained with ethidium bromide (green) and dead cells stained with acridine orange (red or orange) in control group (a), treated with Resveratrol for 48 h at concentrations of 25  $\mu$ g/mL (Resv25) (b), 50  $\mu$ g / mL (Resv50) (c) and 100  $\mu$ g / mL (Resv100) (d). B) Cell death rate. Bars represent the percentage of cell death mean  $\pm$  standard error. Significant difference is indicated by asterisk (\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

Figure 3: Relative gene expression of (A) Caspase-3 and (B) Bax in B16F10 cells. Values shown are mean  $\pm$  SEM. Significant differences are indicated by asterisks (\* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.0001$ ).

Figure 4: DNA fragmentation of B16F10 cells treated with Resveratrol by 48 h. Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. Significant differences are indicated by asterisks (\*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.0001$ )

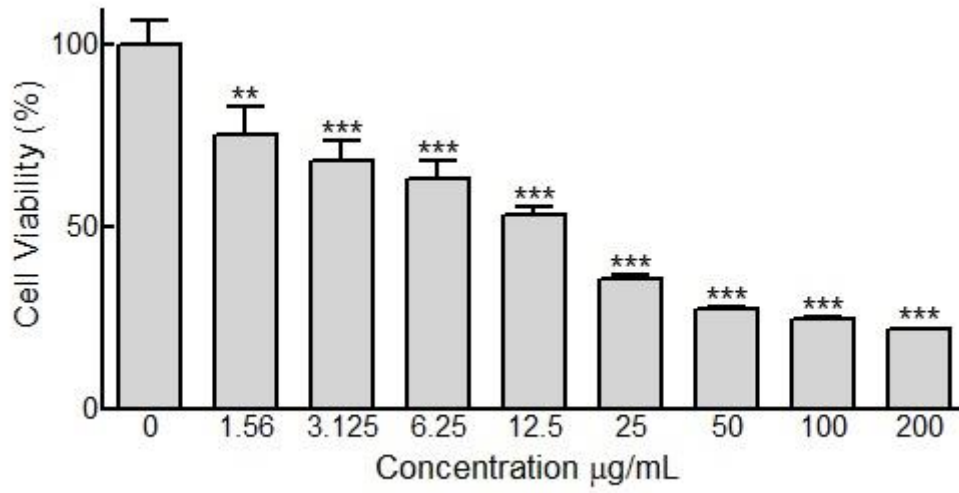
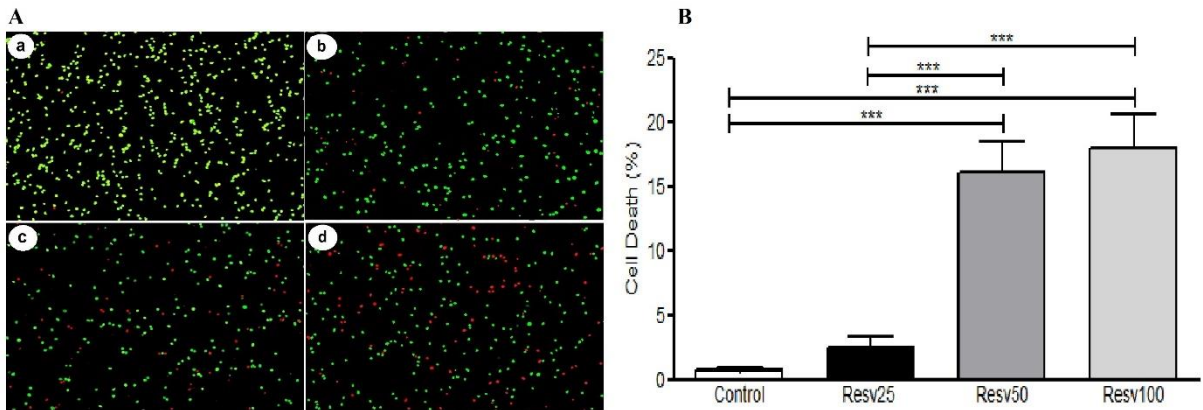
**FIGURES**Figure 1Figure 2

Figure 3

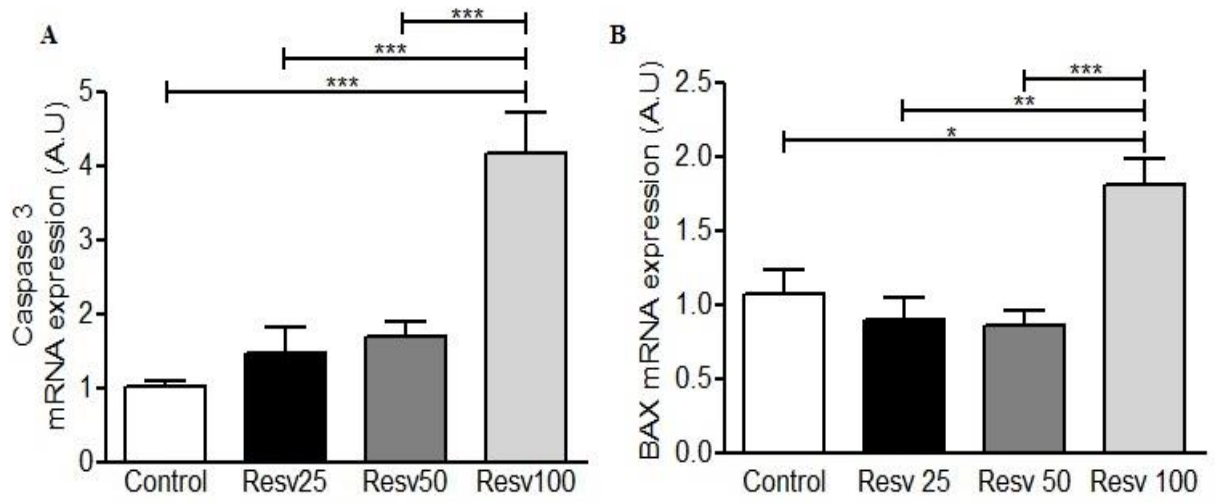
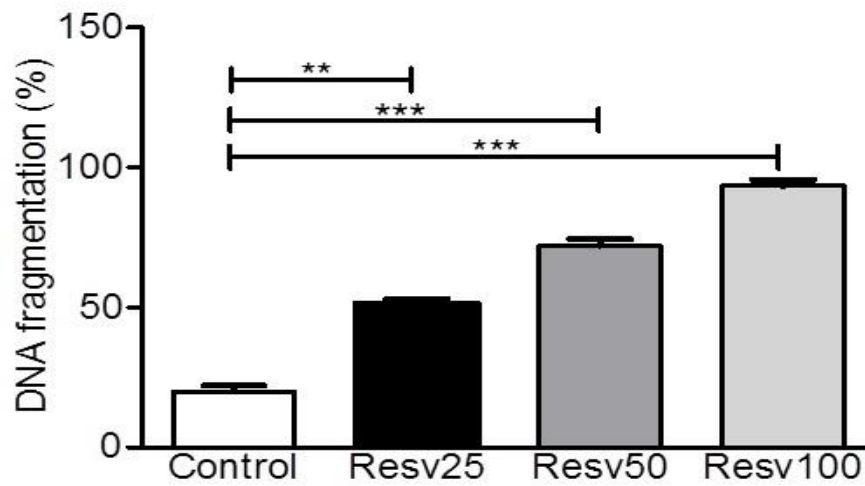


Figure 4



## Tables

Table 1. The oligonucleotides used in the qRT-PCR assay.

<b>Gene</b>	<b>Nome Gene</b>	<b>Identification</b>	<b>Product (pb)</b>
ACTB (control)	Beta Actina	Mm00607939_s1	115
BAX	BCL Associated X Protein	Mm00432051_m1	84
CASP3	Caspase 3	Mm01195085_m1	70

Table 2. Effect of Resveratrol treatment on the distribution of B16F10 cells in the cell cycle phases.

<b>B16F10</b>	<b>G0/G1 (%)</b>	<b>S (%)</b>	<b>G2/M (%)</b>
Control (placebo)	67.18 ± 1.02	10.36 ± 0.67	22.45 ± 0.86
Resv 25 µg/mL	39.88 ± 1.23*	14.31 ± 1.77	45.79 ± 1.46*
Resv 50 µg/mL	52.61 ± 0.89*	11.47 ± 0.45	35.91 ± 0.65*
Resv 100 µg/mL	68.13 ± 2.045	13.19 ± 1.98	18.67 ± 3.00

Data were obtained from three independent experiments and presented as the mean ± standard error of the mean. \* p < 0.05 when compared to the control group.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Finalizo essa etapa com a certeza que os obstáculos encontrados ao decorrer dessa caminhada serviram como degraus para chegar ao final desse ciclo com mais força e determinação. Os contratempos não foram poucos, a insegurança sempre batia a porta, mas diante disso tinha uma motivação, uma força de querer concluir essa etapa. Quando estava cursando o segundo ano de Biomedicina em 2013 os professores da Funorte Camila Pereira Santos e Marcos Vinicius Macedo de Oliveira fizeram um processo seletivo para alunos que tivessem interesse em fazer parte da equipe do laboratório de pesquisa em saúde e foi assim que essa jornada começou. Em dezembro de 2017 entrei no curso de Mestrado em Ciências da Saúde da Unimontes e com grande prazer fui orientada pelos professores Alfredo Mauricio Batista de Paula e Ludmilla Regina de Souza David que me coordenaram de maneira exemplar nesse processo.

Ao longo desses seis anos que estive no laboratório aprendi a ajudar e ser ajudada, a ter paciência, a conviver em grupo, a trabalhar como equipe. Tive a oportunidade de conhecer pessoas que me ajudaram, motivaram e apoiaram. Na metade dessa trajetória comecei a trabalhar com cultura celular e foi incrível, aprendi muito, e isso possibilitou o início dos meus estudos sobre o composto Resveratrol nas células de Melanoma cutâneo murino-B16F10, e foi com essa temática que seguir até o final do mestrado. E os resultados obtidos demonstraram que o Resveratrol reduziu a viabilidade celular, induziu a apoptose e bloqueou o ciclo celular nas células de melanoma murino - B16F10.

Diante de tudo vivenciado finalizo essa etapa com muito gratidão no coração e certeza de que tudo valeu a pena!

## REFERÊNCIAS

1. Nawaz W, Zhou Z, Deng S, Ma X, Ma X, Li C, et al. Therapeutic Versatility of Resveratrol Derivatives. *Nutrients*. 2017;9(11).
2. Dybkowska E, Sadowska A, Swiderski F, Rakowska R, Wysocka K. The occurrence of resveratrol in foodstuffs and its potential for supporting cancer prevention and treatment. A review. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*. 2018;69(1):5-14.
3. Liazid A, Palma M, Brigui J, Barroso CG. Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of chromatography A*. 2007;1140(1-2):29-34.
4. Kumar R, Kaur K, Uppal S, Mehta SK. Ultrasound processed nanoemulsion: A comparative approach between resveratrol and resveratrol cyclodextrin inclusion complex to study its binding interactions, antioxidant activity and UV light stability. *Ultrasonics sonochemistry*. 2017;37:478-89.
5. Salehi B, Mishra AP, Nigam M, Sener B, Kilic M, Sharifi-Rad M, et al. Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits. *Biomedicines*. 2018;6(3).
6. Singh SK, Banerjee S, Acosta EP, Lillard JW, Singh R. Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis with docetaxel in prostate cancer cells via a p53/ p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 pathway. *Oncotarget*. 2017;8(10):17216-28.
7. Stephan LS, Almeida ED, Markoski MM, Garavaglia J, Marcadenti A. Red Wine, Resveratrol and Atrial Fibrillation. *Nutrients*. 2017;9(11).
8. Ko JH, Sethi G, Um JY, Shanmugam MK, Arfuso F, Kumar AP, et al. The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(12).
9. Wu Z, Liu B, E C, Liu J, Zhang Q, Liu J, et al. Resveratrol inhibits the proliferation of human melanoma cells by inducing G1/S cell cycle arrest and apoptosis. *Molecular medicine reports*. 2015;11(1):400-4.
10. Wang Y, Romigh T, He X, Orloff MS, Silverman RH, Heston WD, et al. Resveratrol regulates the PTEN/AKT pathway through androgen receptor-dependent and -independent mechanisms in prostate cancer cell lines. *Human molecular genetics*. 2010;19(22):4319-29.
11. Holian O, Wahid S, Atten MJ, Attar BM. Inhibition of gastric cancer cell proliferation by resveratrol: role of nitric oxide. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2002;282(5):G809-16.
12. Jie KY, Wei CL, Min Z, Ping GJ, Ying W, Dan Z, et al. Resveratrol enhances chemosensitivity of renal cell carcinoma to paclitaxel. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 2019;24:1452-61.
13. Meng J, Guo F, Xu H, Liang W, Wang C, Yang XD. Combination Therapy using Co-encapsulated Resveratrol and Paclitaxel in Liposomes for Drug Resistance Reversal in Breast Cancer Cells in vivo. *Scientific reports*. 2016;6:22390.
14. Matthews NH, Li WQ, Qureshi AA, Weinstock MA, Cho E. Epidemiology of Melanoma. In: Ward WH, Farma JM, editors. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*. Brisbane AU: The Authors.; 2017.
15. Antunes F, Pereira GJ, Jasiulionis MG, Bincoletto C, Smaili SS. Nutritional shortage augments cisplatin-effects on murine melanoma cells. *Chemico-biological interactions*. 2018;281:89-97.
16. Mishra H, Mishra PK, Ekielski A, Jaggi M, Iqbal Z, Talegaonkar S. Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2018;144(12):2283-302.
17. Gambini J, Inglés M, Olaso G, Lopez-Gruoso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, et al. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxidative medicine and cellular*

longevity. 2015;2015:837042.

18. Huang F, Wu XN, Chen J, Wang WX, Lu ZF. Resveratrol reverses multidrug resistance in human breast cancer doxorubicin-resistant cells. *Experimental and therapeutic medicine*. 2014;7(6):1611-6.
19. Nunes S, Danesi F, Del Rio D, Silva P. Resveratrol and inflammatory bowel disease: the evidence so far. *Nutrition research reviews*. 2018;31(1):85-97.
20. de la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society transactions*. 2007;35(Pt 5):1156-60.
21. Ferraz da Costa DC, Pereira Rangel L, Martins-Dinis M, Ferretti G, Ferreira VF, Silva JL. Anticancer Potential of Resveratrol, beta-Lapachone and Their Analogues. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2020;25(4).
22. Lin SR, Chang CH, Hsu CF, Tsai MJ, Cheng H, Leong MK, et al. Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence. *British journal of pharmacology*. 2020;177(6):1409-23.
23. Lin HY, Shih A, Davis FB, Tang HY, Martino LJ, Bennett JA, et al. Resveratrol induced serine phosphorylation of p53 causes apoptosis in a mutant p53 prostate cancer cell line. *The Journal of urology*. 2002;168(2):748-55.
24. Benitez DA, Pozo-Guisado E, Alvarez-Barrientos A, Fernandez-Salguero PM, Castellon EA. Mechanisms involved in resveratrol-induced apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer-derived cell lines. *Journal of andrology*. 2007;28(2):282-93.
25. Gong C, Xia H. Resveratrol suppresses melanoma growth by promoting autophagy through inhibiting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Experimental and therapeutic medicine*. 2020;19(3):1878-86.
26. Yang HZ, Zhang J, Zeng J, Liu S, Zhou F, Zhang F, et al. Resveratrol inhibits the proliferation of melanoma cells by modulating cell cycle. *International journal of food sciences and nutrition*. 2020;71(1):84-93.
27. Yu XD, Yang JL, Zhang WL, Liu DX. Resveratrol inhibits oral squamous cell carcinoma through induction of apoptosis and G2/M phase cell cycle arrest. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2016;37(3):2871-7.
28. Zhu Y, He W, Gao X, Li B, Mei C, Xu R, et al. Resveratrol overcomes gefitinib resistance by increasing the intracellular gefitinib concentration and triggering apoptosis, autophagy and senescence in PC9/G NSCLC cells. *Scientific reports*. 2015;5:17730.
29. Opydo-Chanek M, Rak A, Cierniak A, Mazur L. Combination of ABT-737 and resveratrol enhances DNA damage and apoptosis in human T-cell acute lymphoblastic leukemia MOLT-4 cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2017;42:38-46.
30. Stervbo U, Vang O, Bonnesen C. Time- and concentration-dependent effects of resveratrol in HL-60 and HepG2 cells. *Cell proliferation*. 2006;39(6):479-93.
31. Liu C, Zhu Y, Lou W, Nadiminty N, Chen X, Zhou Q, et al. Functional p53 determines docetaxel sensitivity in prostate cancer cells. *The Prostate*. 2013;73(4):418-27.
32. Sun YY, Xiao L, Wang D, Ji YC, Yang YP, Ma R, et al. Triptolide inhibits viability and induces apoptosis in liver cancer cells through activation of the tumor suppressor gene p53. *International journal of oncology*. 2017;50(3):847-52.
33. Li Y, Guo Y, Feng Z, Bergan R, Li B, Qin Y, et al. Involvement of the PI3K/Akt/Nrf2 Signaling Pathway in Resveratrol-Mediated Reversal of Drug Resistance in HL-60/ADR Cells. *Nutrition and cancer*. 2019;71(6):1007-18.
34. Zeng Y, Li FD, Shi CW, Du JL, Xue YJ, Liu XY, et al. Mechanism and therapeutic prospect of resveratrol combined with TRAIL in the treatment of renal cell carcinoma. *Cancer*



gene therapy. 2019.

35. Castillo-Pichardo L, Dharmawardhane SF. Grape polyphenols inhibit Akt/mammalian target of rapamycin signaling and potentiate the effects of gefitinib in breast cancer. *Nutrition and cancer*. 2012;64(7):1058-69.
36. Hosseinimehr SJ, Hosseini SA. Resveratrol sensitizes selectively thyroid cancer cell to 131-iodine toxicity. *Journal of toxicology*. 2014;2014:839597.
37. Ahmad A, Syed FA, Singh S, Hadi SM. Prooxidant activity of resveratrol in the presence of copper ions: mutagenicity in plasmid DNA. *Toxicology letters*. 2005;159(1):1-12.
38. Frazzi R, Tigano M. The multiple mechanisms of cell death triggered by resveratrol in lymphoma and leukemia. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(3):4977-93.
39. Han G, Xia J, Gao J, Inagaki Y, Tang W, Kokudo N. Anti-tumor effects and cellular mechanisms of resveratrol. *Drug discoveries & therapeutics*. 2015;9(1):1-12.
40. Zugazagoitia J, Guedes C, Ponce S, Ferrer I, Molina-Pinelo S, Paz-Ares L. Current Challenges in Cancer Treatment. *Clinical therapeutics*. 2016;38(7):1551-66.
41. Siddiqui IA, Sanna V, Ahmad N, Sechi M, Mukhtar H. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2015;1348(1):20-31.
42. Pereira S, Curado MP, Ribeiro AM. Multiple skin neoplasms in subjects under 40 years of age in Goiania, Brazil. *Revista de saude publica*. 2015;49:64.
43. Kim SH, Hashimoto Y, Cho SN, Roszik J, Milton DR, Dal F, et al. Microsomal PGE2 synthase-1 regulates melanoma cell survival and associates with melanoma disease progression. *Pigment cell & melanoma research*. 2016;29(3):297-308.
44. Prasad P, Vasas A, Hohmann J, Bishayee A, Sinha D. Cirsiliol Suppressed Epithelial to Mesenchymal Transition in B16F10 Malignant Melanoma Cells through Alteration of the PI3K/Akt/NF-kappaB Signaling Pathway. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(3).
45. Micek A, Godos J, Lafranconi A, Marranzano M, Pajak A. Caffeinated and decaffeinated coffee consumption and melanoma risk: a dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *International journal of food sciences and nutrition*. 2018;69(4):417-26.
46. Melanoma CdP. INCA – Instituto Nacional de Câncer. 2020.
47. Tas F. Metastatic behavior in melanoma: timing, pattern, survival, and influencing factors. *Journal of oncology*. 2012;2012:647684.
48. Scolyer RA, Judge MJ, Evans A, Frishberg DP, Prieto VG, Thompson JF, et al. Data set for pathology reporting of cutaneous invasive melanoma: recommendations from the international collaboration on cancer reporting (ICCR). *The American journal of surgical pathology*. 2013;37(12):1797-814.
49. Ninomiya H, Taniguchi T, Fujiwara M, Shimohama S, Kameyama M. Effect of in vivo exposure to hypoxia on muscarinic cholinergic receptor-coupled phosphoinositide turnover in the rat brain. *Brain research*. 1989;482(1):109-21.
50. Jager K, Larribere L, Wu H, Weiss C, Gebhardt C, Utikal J. Expression of Neural Crest Markers GLDC and ERFFI1 is Correlated with Melanoma Prognosis. *Cancers*. 2019;11(1).
51. Bertolotto C. Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options. *Scientifica*. 2013;2013:635203.
52. Mort RL, Jackson IJ, Patton EE. The melanocyte lineage in development and disease. *Development (Cambridge, England)*. 2015;142(4):620-32.
53. Evans MS, Madhunapantula SV, Robertson GP, Drabick JJ. Current and future trials of targeted therapies in cutaneous melanoma. *Advances in experimental medicine and biology*. 2013;779:223-55.
54. Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy.

Nature. 2007;445(7130):851-7.

55. Krathen M. Malignant melanoma: advances in diagnosis, prognosis, and treatment. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*. 2012;31(1):45-9.
56. Shi W. Radiation Therapy for Melanoma. In: Ward WH, Farma JM, editors. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*. Brisbane AU: The Authors.; 2017.
57. Ward WH, Lambreton F, Goel N, Yu JQ, Farma JM. Clinical Presentation and Staging of Melanoma. In: Ward WH, Farma JM, editors. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*. Brisbane AU: The Authors.; 2017.
58. Melanoma P. ACCamargo Cancer Center. 2019.
59. Gao Q, Zhou G, Lin SJ. How chemotherapy and radiotherapy damage the tissue: Comparative biology lessons from feather and hair models. 2019;28(4):413-8.
60. Tan EP, Duncan FE, Slawson C. The sweet side of the cell cycle. *Biochemical Society transactions*. 2017;45(2):313-22.
61. Wenzel ES, Singh ATK. Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer. *In vivo (Athens, Greece)*. 2018;32(1):1-5.
62. Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nature reviews Cancer*. 2001;1(1):22-33.
63. Niida H, Nakanishi M. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis*. 2006;21(1):3-9.
64. Pistrutto G, Triscioglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*. 2016;8(4):603-19.
65. Kim JA, Kim JC, Min JS, Kang I, Oh J, Ahn JK. HSV-1 ICP27 induces apoptosis by promoting Bax translocation to mitochondria through interacting with 14-3-3theta. *BMB reports*. 2017;50(5):257-62.
66. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(2).
67. Zhao X, Xiang H, Bai X, Fei N, Huang Y, Song X, et al. Porcine parvovirus infection activates mitochondria-mediated apoptotic signaling pathway by inducing ROS accumulation. *Virology journal*. 2016;13:26.

## ANEXOS

## Anexo 1. Normas do periódico “Phytomedicine”.

**PHYTOMEDICINE**

International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology

**AUTHOR INFORMATION PACK****TABLE OF CONTENTS**

●	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Audience</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Impact Factor</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.5</b>



ISSN: 0944-7113

**DESCRIPTION**

*Phytomedicine* is primarily a therapy-oriented Journal. *Phytomedicine* publishes innovative studies on efficacy, safety, quality and mechanisms of action of specified plant extracts, phytopharmaceuticals and their isolated constituents. This includes *clinical, pharmacological, pharmacokinetic, and toxicological studies* of specified herbal medicinal products, herbal preparations and purified compounds which have a defined and consistent quality assuring reproducible pharmacological activity.

*Phytomedicine* was founded in 1994 to focus and stimulate research in this particular field and to set internationally accepted scientific standards for pharmacological studies, proof of clinical efficacy and safety of phytomedicines.

The main aims of *Phytomedicine* are associated with the integration of phytopreparations into conventional/official medicine.

The journal covers the following sections:

Clinical pharmacology and toxicology (randomized, placebo controlled, double blind, and observational open label studies) Behavioural, mental, affective, and stress-associated disorders Age-associated disorders Neuropharmacology Endocrine pharmacology Metabolic syndrome and obesity Cancer Immunopharmacology, inflammation Infectious diseases Pulmonary, gastrointestinal, cardiovascular and urogenital diseases Systems biology Safety assessment, pre-clinical toxicology, interaction with drugs and adverse events of herbal preparations Pharmacokinetic of natural compounds Standardization of herbal preparations Legislation of botanicals Invited reviews

The directions of *Phytomedicine* are known to provide profound scientific background in Herbal Medicinal Products, their reproducible Quality and evidence based therapeutic efficacy. Since then quality criteria and standardization methods were defined and the European Medical Agency has elaborated numerous guidelines for the conduction of clinical studies and preparation of Herbal Medicinal Products. In total 107 ESCOP monographs have been produced and submitted to EMA. Many new analytical methods and instruments were implemented both for analysis and standardization of herbal Substances, herbal preparations and their bioassays and tremendous work has been carried out to remain aligned with these intentions during the last 18 years.

Nowadays important topics remain to be approached, such as harmonization of the regulatory frameworks in Europe, America, Asia and Australia or the legislation of various "botanicals", where strict differentiation of requirements for health claims of herbal medicinal product, dietary supplements and nutraceuticals are required.