

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO
RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

Autor(es): ALFREDO MAURICIO BATISTA DE PAULA, WALTER DE FREITAS FILHO, AMANDA RODRIGUES SANTOS, AMANDA SOUTO MACHADO, OTÁVIO CARDOSO FILHO, ERIVELTON PEREIRA SANTOS, LUDMILLA REGINA SOUZA

Resveratrol Reduz o Desenvolvimento do Melanoma Cutâneo Experimental Singênico em Camundongos C57Bl/6

Introdução

O Melanoma é um tipo de câncer que se desenvolve a partir de alterações nos melanócitos, células produtoras de melanina, situadas na camada basal da epiderme e em outras regiões corpóreas (IRANZO *et al.*, 2015). Dados recentes tem demonstrado um grande aumento na prevalência e na incidência do melanoma cutâneo (MC) mundialmente (CHEN *et al.*, 2011). No Brasil, no biênio de 2014-2015 ocorreram aproximadamente 6.000 novos casos de MC, de forma igualitária entre homens e mulheres (INCA, 2015). Dentre os cânceres de pele, o melanoma cutâneo é considerado o mais grave devido ao seu caráter proliferativo e invasivo nos tecidos adjacentes. O MC revela altas taxas de morbidade e de mortalidade, sendo assim considerado como um importante problema de saúde pública (AMANCIO *et al.*, 2014).

O resveratrol é um composto fenólico pertencente ao grupo dos flavonoides, encontrado em 72 espécies vegetais e seus derivados. Trata-se de um composto sintetizado naturalmente pela planta, e que é rapidamente absorvido e metabolizado pelo organismo humano. Tem sido demonstrado em alguns estudos que o resveratrol parece inibir o desenvolvimento tumoral por atuar em vias moleculares anti-câncer específicas (DEMOULIN E HERMANT, 2015).

No presente estudo, o efeito antitumoral do resveratrol foi comparado entre camundongos C57Bl/6, controles e camundongos casos submetidos ao modelo experimental singênico de MC.

Material e métodos

A. Aspectos éticos e condução animal

O presente estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimental e Bem-estar Animal (CEEBEA/Unimontes. Parecer: 99/2016), recebendo parecer favorável para sua execução.

Foram utilizados 22 camundongos C57Bl/6 fêmeas, saudáveis, sem histórico de uso de qualquer tipo de droga, com idade entre 10 e 12 semanas, com cerca de 23 ± 3 gramas de peso corporal. Os animais foram adquiridos do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Foram mantidos no biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros para adaptação em condições adequadas de temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de $60 \pm 5\%$, 12h de ciclos de claro/escuro e baixo nível sonoro < 40 dB, com livre acesso à água filtrada e ração balanceada (Purina-Labina®). Na condução do experimento, os animais foram distribuídos em quatro grupos, sendo dois grupos controles e dois grupos casos. Os grupos controles foram constituídos por quatro animais cada e não foram submetidos à indução do MC singênico. Já os grupos casos, continham sete animais cada e foram submetidos ao MC singênico, inoculados com células B16-F10. Um grupo controle e um grupo caso foram tratados com resveratrol e os demais grupos receberam tratamento com solução placebo (PBS), ambos pela via gavagem. Os camundongos foram avaliados diariamente quanto às ingestões hídrica e alimentar, tendo sido estabelecidas médias de consumo de cada grupo em função do número de animais por grupo. O peso da ração foi registrado diariamente com o auxílio de uma balança analítica. Para o cálculo do volume de ingestão hídrica, foi registrado o volume de água consumida diariamente com o uso de uma proveta plástica, com escala de volume.

C. Indução do modelo tumoral singênico de MC murino e administração do resveratrol

Os camundongos controles e casos foram submetidos à tricotomia na região dorsal (flanco). Após ausência de sensibilidade dolorosa reflexa, foi realizada assepsia com álcool iodado e em seguida os animais foram inoculados com 5×10^5 células de melanoma murino B16-F10 (Fig. 1A) na região anatômica subcutânea dorsal (Fig. 1B). A presença do tumor foi identificada após um período de cinco dias após a inoculação das células neoplásicas (Fig. 1C). No quinto dia pós-inoculação, os camundongos foram tratados diariamente, por gavagem, com PBS e resveratrol (Sigma-Aldrich Co,



Saint Louis, EUA) na concentração de 200 mg por cada 1 g do peso corporal do camundongo (0,2%). O tratamento teve duração de 11 dias.

D. Avaliação da progressão tumoral e análise estatística

Para estabelecer uma curva do crescimento tumoral, foram realizadas medições diárias do tumor a partir do quinto dias após a inoculação subcutânea, momento em que os tumores em todos os animais se tornaram palpáveis clinicamente. As dimensões do tumor foram feitas com auxílio de um paquímetro digital sem saída, com faixa de medição de 0 a 150 mm, resolução de 0,01 mm (modelo CSX-B, Mitutoyo Corp., Brasil). No décimo segundo dia o tumor foi retirado e submetido à pesagem. O volume tumoral foi determinado segundo a equação: volume tumoral (mm^3) = $\pi/6 \times (L)(W)(H)$, onde L, W e H correspondem ao comprimento, espessura e altura, respectivamente.

Os dados coletados foram analisados estatisticamente pelo teste de ANOVA no programa *Statistical Package for Social Science* (SPSS), versão 18.0. O nível de confiança adotado foi fixado em 95% ($p < 0,05$).

Resultados e discussão

De acordo com os resultados notados nesse estudo, o resveratrol demonstrou um significativo efeito anti-tumoral, sendo esse efeito repressor do crescimento tumoral observado principalmente a partir do nono dia de acompanhamento da progressão tumoral experimental (Fig. 2A). A avaliação macroscópica dos tumores após a exérese da doença neoplásica maligna demonstrou a diferença no tamanho dos tumores experimentais, causada pela ação do resveratrol (Fig. 2B, Fig. 2C). Tem sido demonstrado que o resveratrol deve alterar componentes moleculares envolvidos no controle do ciclo celular e da maquinaria de morte celular programada (apoptose). Dessa forma, o resveratrol parece atuar como um agente anti-proliferativo e pró-apoptótico em células neoplásicas malignas (KAUR & VERMA, 2015). Outros estudos tem demonstrado que os mecanismos anti-tumorais desencadeados pelo resveratrol estão relacionados com atividades antioxidante e anti-inflamatória que o resveratrol apresenta e que podem afetar o crescimento de células neoplásicas direta e indiretamente (SOARES, 2014). Contudo, os eventos moleculares antineoplásicos desencadeados pelo resveratrol que permitiram uma involução dos tumores experimentais de nossas amostras ainda está por ocorrer em futuros estudos.

Conclusão

De acordo com os achados do presente estudo, o resveratrol é capaz de promover uma diminuição do volume tumoral de um modelo experimental singênico de MC em camundongos C57Bl/6. Esses achados suportam o papel do resveratrol como adjuvante no tratamento anti-câncer. Futuros estudos são fundamentais para comprovar os efeitos antineoplásicos do resveratrol no MC experimental e no MC humano.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio e a Diretoria do Hospital Universitário Clemente de Faria pelo suporte.

Referências

- AMANCIO, C. T. et al. Cutaneous melanoma in the State of São Paulo: a spatial approach. *Anais brasileiros de dermatologia*, v. 89, n. 3, p. 442-446, 2014.
- CHEN, C. et al. Evidence for Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Stem Cells of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *PlosOne*, v. 6, n. 1, 2011.
- DEMOULIN, B. et al. Resveratrol induces DNA damage in colon cancer cells by poisoning topoisomerase II and activates the ATM kinase to trigger p53-dependent apoptosis. *Toxicology in vitro*; v. 29, n. 5, p. 1156-65, Aug. 2015.
- INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2014. Incidência do câncer no Brasil. 2015. Disponível em: http://www.inca.gov.br/rbc/n_60/v01/pdf/11-resenha-estimativa-2014-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf. Acesso em 06 Nov. 2016
- IRANZO, C. C. et al. Lesões cutâneas malignas e pré-malignas: conhecimentos, hábitos e campanhas de prevenção solar. *Acta paul. enferm.*, v. 28, n.1, p. 1-6, 2015.
- KAUR, G., VERMA N. Nature curing cancer – review on structural modification studies with natural active compounds having anti-tumor efficiency. *Biotechnology Reports*, v. 6, n. 6, p. 64-78, 2015.
- SOARES, R. J. et al. Involvement of MicroRNAs in the Regulation of Muscle Wasting during Catabolic Conditions. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 32, p. 21909-25, Aug. 2014.

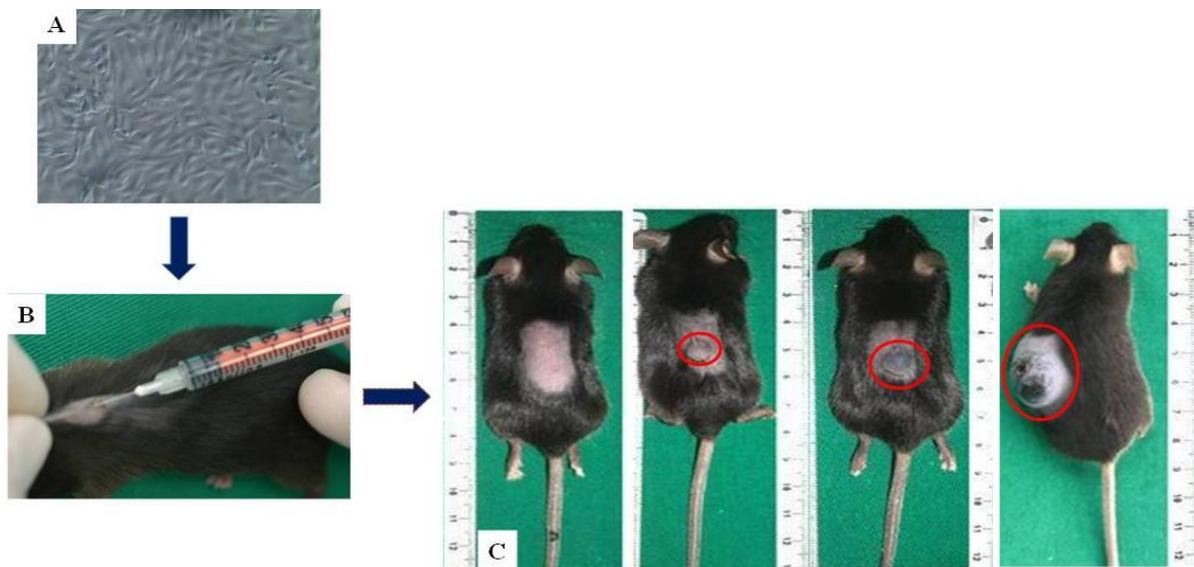


Figura 1: Processo de indução da linhagem celular B16-F10 e representação dos tumores melanocíticos em camundongos C57Bl/6. A) Morfologia da linhagem B16-F10 em frasco de cultivo celular. B) Inoculação das células B16-F10 no flanco do camundongo C57Bl/6. C) Progressão tumoral observada nos dias 1, 5, 7 e 11 após a inoculação em camundongo tratado com solução placebo (PBS).

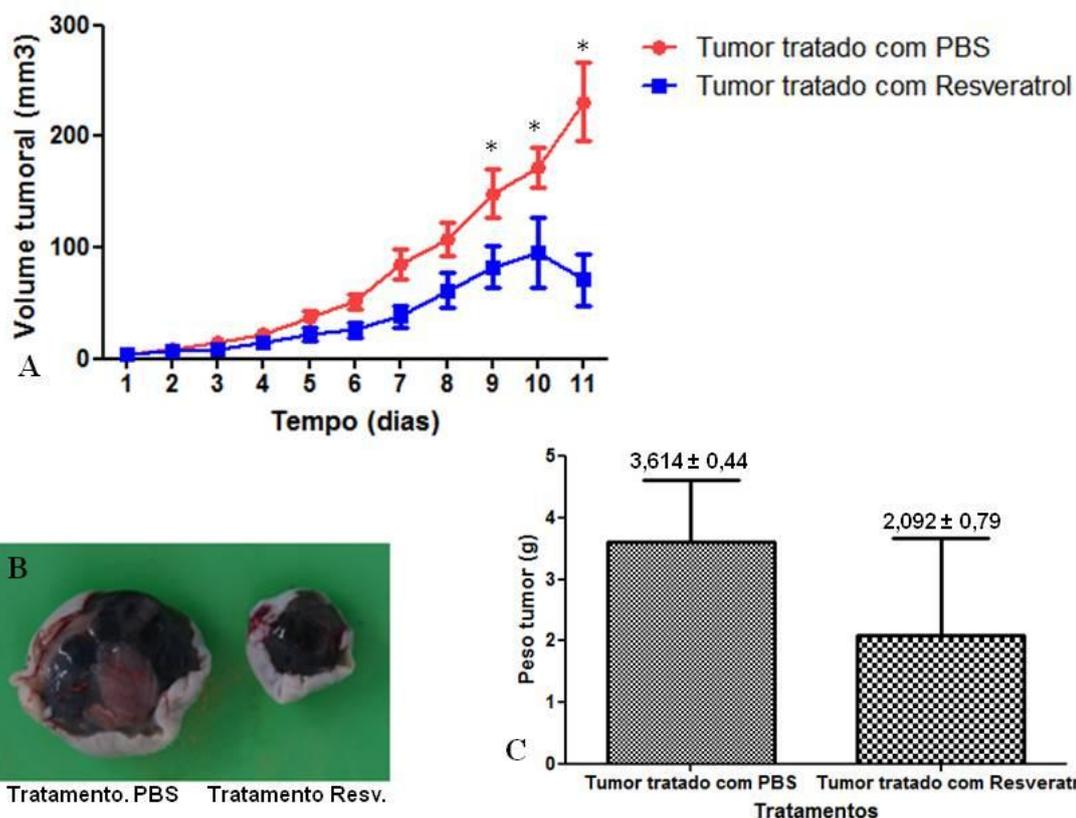


Figura 2: Efeito do resveratrol no desenvolvimento tumoral dos camundongos C57Bl/6 subcutaneamente injetados com células B16-F10. A) Progressão dos tumores durante 11 dias de tratamento ($p < 0,05$). B) Aspecto macroscópico dos tumores. C) Comparação entre os pesos tumorais de animais tratados com PBS e resveratrol ao final do tratamento. PBS = solução salina placebo