

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Vinícius Leobet Lunkes

**EFEITO DA CURCUMINA E VIMBLASTINA NAS VIAS DE
SINALIZAÇÃO CELULAR E ESTRESSE OXIDATIVO EM
CULTURA DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO**

Santa Maria, RS
2021

Vinícius Leobet Lunkes

**EFEITO DA CURCUMINA E VIMBLASTINA NAS VIAS DE
SINALIZAÇÃO CELULAR E ESTRESSE OXIDATIVO EM
CULTURA DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Clínica Médica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Cinthia Melazzo de Andrade
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Krause

Santa Maria, RS
2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Lunkes, Vinícius Leobet

Efeito da curcumina e vimblastina nas vias de sinalização celular e estresse oxidativo em cultura de células de melanoma humano / Vinícius Leobet Lunkes.- 2021.

71 p.; 30 cm

Orientadora: Cinthia Melazzo de Andrade

Coorientador: Alexandre Krause

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2021

1. Curcuma longa 2. Estresse oxidativo 3. Ectonucleotidases 4. Apoptose 5. Radiação ultravioleta I. Andrade, Cinthia Melazzo de II. Krause, Alexandre III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

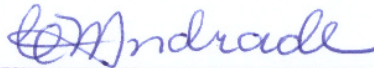
Declaro, VINÍCIUS LEOBET LUNKES, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Vinicius Leobet Lunkes

**EFEITO DA CURCUMINA E VIMBLASTINA NAS VIAS DE
SINALIZAÇÃO CELULAR E ESTRESSE OXIDATIVO EM
CULTURA DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO**

Tese apresentada ao Curso de
Doutorado do Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária,
Área de Concentração Clínica Médica
Veterinária, da Universidade Federal de
Santa Maria (UFSM, RS), como
requisito parcial para obtenção do grau
de **Doutor em Medicina Veterinária**.

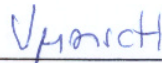
Aprovado em 17 de dezembro de 2021:



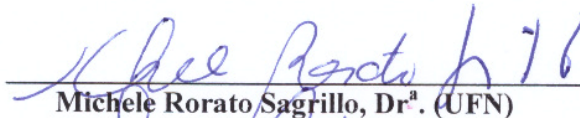
Cinthia Melazzo de Andrade, Dr.^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



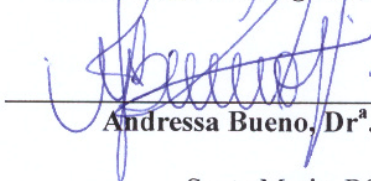
Virgínia Cielo Rech, Dr.^a. (UFN)



Vera Maria Melchiors Morsch, Dr.^a. (UFSM)



Michele Rorato Sagrillo, Dr.^a. (UFN)



Andressa Bueno, Dr.^a. (UFSM)

Santa Maria, RS
2021

RESUMO

EFEITO DA CURCUMINA E VIMBLASTINA NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR E ESTRESSE OXIDATIVO EM CULTURA DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO

AUTOR: Vinícius Leobet Lunkes

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a. Cinthia Melazzo de Andrade

O câncer é uma das principais causas de morte em cães e gatos. O câncer de pele melanoma tem origem nos melanócitos e com maior gravidade em função da possibilidade de metástases e ampla variedade de apresentações. O tratamento envolve quimioterápicos, como a vimblastina, mas pode ser dificultado pela baixa responsividade e efeitos adversos. A curcumina, uma substância extraída dos rizomas da planta *Curcuma longa*, possui efeitos antineoplásicos, inibindo a iniciação tumoral e a progressão tumoral, pois atua em uma ampla variedade de genes, fatores de crescimento e enzimas que regulam a proliferação celular e a apoptose. Considerando os efeitos benéficos da curcumina em várias doenças, seus efeitos têm sido amplamente estudados. Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da adição de curcumina em cultivos celulares de melanoma humano sobre marcadores de estresse oxidativo, atividade de enzimas antioxidantes, componentes do sistema purinérgico, migração celular, apoptose e ciclo celular. Para isso, células de melanoma humano da linhagem SK-MEL-28 foram tratadas por 24 horas com curcumina em concentrações crescentes, a fim de definir a concentração capaz de inibir 50% dos cultivos celulares, que será utilizada nos demais ensaios. A seguir, foram avaliadas vias de sinalização celular, como o mecanismo oxidativo e o sistema purinérgico, além de efeitos celulares, como apoptose e ciclo celular. Concomitantemente, os ensaios foram realizados utilizando vimblastina (isolado ou associado à curcumina), a fim de comparar os resultados com substância utilizada na quimioterapia do melanoma. Após o período de incubação de 24 horas, a concentração de 40 μM de curcumina inibiu 50% dos cultivos celulares, e foi utilizada nos demais ensaios. A curcumina inibiu a migração celular e provocou a parada da replicação celular, induzindo células a morrer por apoptose. A curcumina também interrompeu a cascata que culmina na produção de adenosina, inibindo a imunossupressão nas células tumorais, e causou aumento na produção de espécies reativas de oxigênio. A vimblastina, por sua vez, reduziu a atividade da enzima adenosina desaminase e aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio, promovendo apoptose celular. Pode-se concluir que a curcumina possui efeito pró-oxidativo nas células tumorais, modula a resposta imune e provoca apoptose e parada do ciclo celular em cultivos celulares de melanoma humano, podendo ser uma promissora substância aliada ao tratamento convencional do melanoma.

Palavras-chave: *Curcuma longa*. Estresse oxidativo. Ectonucleotidases. Apoptose. Radiação ultravioleta.

ABSTRACT

EFFECT OF CURCUMIN AND VINBLASTIN ON SIGNALLING PATHWAYS AND OXIDATIVE STRESS IN HUMAN MELANOMA CELL CULTURE

AUTHOR: Vinícius Leobet Lunkes

ADVISER: Prof.^a Dr.^a. Cinthia Melazzo de Andrade

Cancer is a leading cause of death in dogs and cats. Melanoma skin cancer originates from melanocytes and is more severe due to the possibility of metastases and a wide variety of presentations. Treatment involves chemotherapy, such as vinblastine, but it can be hampered by low responsiveness and adverse effects. Curcumin, a substance extracted from the rhizomes of the *Curcuma longa* plant, has antineoplastic effects, inhibiting tumor initiation and tumor progression, as it acts on a wide variety of genes, growth factors and enzymes that regulate cell proliferation and apoptosis. Considering the beneficial effects of curcumin in various diseases, its effects have been widely studied. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of curcumin addition in human melanoma cell cultures on oxidative stress markers, antioxidant enzyme activity, purinergic system components, cell migration, apoptosis and cell cycle. For this, human melanoma cells of the SK-MEL-28 lineage were treated for 24 hours with curcumin in increasing concentrations, in order to define the concentration capable of inhibiting 50% of cell cultures, which will be used in the other assays. Next, cell signaling pathways, such as the oxidative mechanism and the purinergic system, as well as cellular effects, such as apoptosis and cell cycle, were evaluated. Concomitantly, the trials were performed using vinblastine (alone or associated with curcumin), in order to compare the results with a substance used in melanoma chemotherapy. After an incubation period of 24 hours, the concentration of 40 μM of curcumin inhibited 50% of cell cultures, and was used in the other assays. Curcumin inhibited cell migration and caused the arrest of cell replication, inducing cells to die by apoptosis. Curcumin also disrupted the cascade that culminates in the production of adenosine, inhibiting immunosuppression in tumor cells, and causing an increase in the production of reactive oxygen species. Vinblastine, in turn, reduced the activity of the adenosine deaminase enzyme and increased the production of reactive oxygen species, promoting cell apoptosis. It can be concluded that curcumin has a pro-oxidative effect on tumor cells, modulates the immune response and causes apoptosis and cell cycle arrest in human melanoma cell cultures, which could be a promising substance in the conventional treatment of melanoma.

Keywords: *Curcuma longa*. Oxidative stress. Ectonucleotidases. Apoptosis. Ultraviolet radiation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Estágios da carcinogênese.....	13
FIGURA 2 - A - Gato com melanoma maligno no plano nasal. B - Cachorro com melanoma no maxilar. C - Aspecto clínico do melanoma maligno na parede torácica e abdominal. D - Melanoma no olho de um cachorro.	16
FIGURA 3 - Formação de dímeros de pirimidinas no DNA. A radiação Ultravioleta provoca a ligação de duas bases consecutivas na fita de DNA, alterando o pareamento normal da dupla-fita naquele local.....	18
FIGURA 4 - Fontes e respostas celulares às Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e de Nitrogênio (ERN).....	20
FIGURA 5 - Representação dos efeitos do óxido nítrico em relação ao melanoma.....	21
FIGURA 6 - Representação dos efeitos da ativação da p53 sob estímulo celular.....	23
FIGURA 7 - Visão geral da sinalização purinérgica.....	24
FIGURA 8 - (A) - Flor da planta <i>Catharanthus roseus</i> , conhecida como vinca-de-gato ou vinca-de-Madagascar. (B) Estrutura química da vimblastina.....	25
FIGURA 9 - (A) Rizomas de <i>Curcuma longa</i> e tempero culinário preparado pela moagem dos rizomas e (B) visão geral da molécula de curcumina.....	27
FIGURA 10 - Mecanismos de indução de apoptose em células tumorais pela utilização de curcumina.....	28

MANUSCRITO 1

Figure 1 – MTT assay demonstrated decreased viability of SK-Mel-28 cells after exposure to increasing concentrations of CUR (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 and 100 μ M) for 24 h. 40 μ M concentration was statistically different of 20 μ M ($p=0.0001$), 50 μ M ($p=0.035$), 60 μ M ($p=0.0004$), and higher tested concentrations ($p= 0.0001$). One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test: $F_{9, 23} = 121.4$; $n=33$. Data shown as mean \pm SD.....	42
Figure 2 – ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis by E-NTPDase and E-5'-nucleotidase and adenosine deamination (D) in SK-MEL-28 cells after 24 h treatment with, 20 nM of vinblastine (VIN), 40 μ M curcumin (CUR), or	

a combination of both (CUR+VIN). Enzyme-specific activities reported as nmol of Pi released/min/mg of protein. Enzyme activities are reported as U/mg protein. Variables were expressed as mean \pm standard error of the mean (SD). Data are shown as mean \pm SD. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test (A – n=9; B – n=8; C – n=9; D – n=10)..... 43

Figure 3 – (a) Catalase (CAT) and (b) SOD activities in SK-mel-28 cells after exposure to 20 nM of vinblastine (VIN), 40 μ M curcumin (CUR), and a combination of both for 24 h (* represents the difference between treatment and control). (c) Protein carbonylation, (d) TBARS, and (e) DCF levels after 24 h treatment with 20 nM of vinblastine (VIN), 40 μ M curcumin (CUR), and a combination of both (CUR+VIN). Histogram presentation of gated cells in DCFH assay of ROS quantification by flow cytometry in cells treated with CUR (F), VIN (G), and CUR+VIN (H) for 24 h. The continuous line represents untreated SK-MEL-28 cells (control). Data are shown as mean \pm SD, representative for three independent experiments..... 44

MANUSCRITO 2

Figure 1 – (A) Wound healing assay demonstrated decreased migration of SK-Mel-28 cells after exposure to CUR (40 μ M) for 24 h, or VIN (20 nM). Data are shown as mean \pm SD, “*” represents a significant difference of $P \leq 0.05$. (B) Representative images of wound healing assay following exposure of CUR, VIN, and CUR+VIN on SK-MEL-28 cells for 24 hours. wound healing capacity. Magnification, x400..... 55

Figure 2 – (A) Cell cycle arrest effects of CUR, VIN, and CUR+VIN in SK-MEL-28 cells for 24 hours. Graphs represent the percentage of cell cycle distribution at the G1, S and G2 phases.. Data are presented as the mean \pm SD. “*” and “***” represent a significant difference of $p \leq 0.05$ and $**p \leq 0.01$, respectively. (B) Evaluation of apoptosis after 24 h of treatment with CUR, VIN, or CUR+VIN in SK-MEL-28 cells for 24 hours. Quantification by flow cytometry of the percentage of cells in apoptosis and cell death. (C) Dot-plot of the treatments' effects on cell apoptosis. . Data are shown as mean \pm SD, a representative for three independent experiments, “*”, “***”, and “*****” represent a significant difference of $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, and $p \leq 0,001$,

respectively..... 56

Figure 3 – (A) Accumulation of nitrate in the supernatant of cells treated with CUR, VIN, or CUR+VIN for 24 hours. Data are shown as mean \pm SD, a representative for three independent experiments, “*” and “****” represent a significant difference of $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.001$, respectively (B) DNA damage of SK-MEL-28 cells treated with CUR, VIN, or CUR+VIN for 24 hours. Data are shown as mean \pm SD, a representative for three independent experiments, “*” and “**” represent a significant difference of $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.01$, respectively..... 57

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Principais categorias de doenças diagnosticadas por faixa etária em cães necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária da UFSM. A categoria “filhote” compreende animais de até um ano de idade; “adulto” corresponde a animais de um a nove anos de idade; já o termo “idoso” compreende cães com 10 anos de idade ou mais..... 15
- TABELA 2 - Principais genes envolvidos na carcinogênese do melanoma..... 17

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μM	Micromolar
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
ADA	Adenosina desaminase
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
Bcl-2	Célula B associada ao linfoma 2 (<i>B-cell lymphoma 2</i>)
BCI-x	Célula B associada a linfoma X (<i>B-cell lymphoma X</i>)
CUR	Curcumina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	Catalase
CD39	<i>Cluster of Differentiation 39</i>
CD73	<i>Cluster of Differentiation 73</i>
E-NTPDase	Ecto-difosfoidrolases, CD39 ou apirases
DCFH	Diclorofluoresceína
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNP	2,4-dinitrofenil-hidrazina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial (<i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FBS	Soro fetal bovino (<i>Fetal bovine serum</i>)
GSH	Glutationa reduzida
GPX	Glutationa peroxidase
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HClO	Ácido hipocloroso
IC_{50}	Concentração capaz de inibir 50% dos cultivos celulares
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível (<i>Inducible nitric oxide synthase</i>)
IU/mL	Unidades internacionais por mililitro

MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
MDA	Malondialdeído
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinases da matriz
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
NF-κB	Potenciador da cadeia leve kappa do fator nuclear de células B ativadas
NO•	Óxido nítrico (<i>Nitric oxide</i>)
NOS	Óxido nítrico sintase (<i>Nitric oxide synthase</i>)
NOS1	Óxido nítrico sintase 1 (<i>Nitric oxide synthase 1</i>)
NOS2	Óxido nítrico sintase 2 (<i>Nitric oxide synthase 2</i>)
NOS3	Óxido nítrico sintase 3 (<i>Nitric oxide synthase 3</i>)
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal (<i>Neuronal nitric oxide synthase</i>)
NPSH	Tióis não proteicos (<i>Non-protein thiols</i>)
NTPDase	Trifosfato difosfo-hidrolase (<i>Triphosphate diphosphohydrolase</i>)
O ₂ ^{•-}	Radical Superóxido
PARP	Polimerase poli-ADP-ribose
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
PI	Iodeto de propídio (<i>Propidium iodide</i>)
OH•	Radical Hidroxil
OS	Estresse oxidativo (<i>Oxidative stress</i>)
SH	Grupo sulfidrila
SK-MEL-28	<i>Sloan Kettering Memorial – Melanoma -28</i>
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>)
U/L	Unidade por litro
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
VIN	Vimblastina (<i>Vinblastine</i>)

SUMÁRIO

Apresentação.....	12
1 Introdução.....	13
2 CAPÍTULO I – MANUSCRITO I – Curcumin and vinblastine disturb ectonucleotides enzymes activity and promote ROS production in human cutaneous melanoma cells.....	29
3 CAPÍTULO I – MANUSCRITO II – Curcumin and vinblastine induce apoptosis and impair migration in human cutaneous melanoma cells.....	45
4 DISCUSSÃO.....	58
5 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	61

APRESENTAÇÃO

As metodologias e os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de dois manuscritos, os quais abordam os efeitos da adição de curcumina e/ou vimblastina em cultivo celular de melanoma humano, considerando-o como um modelo experimental para o melanoma em pequenos animais. O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica Oxidativa da Universidade Federal de Santa Maria e as análises laboratoriais nos laboratórios de Análises de Bioquímica e Estresse Oxidativo, Laboratório de Enzimologia Toxicológica e Laboratório de Biogenômica da mesma instituição, sob coordenação e orientação das professoras Dr^a. Cinthia Melazzo de Andrade, Maria Rosa Chitolina, Vera Morsch, e Ivana Beatrice Mânica Da Cruz, respectivamente.

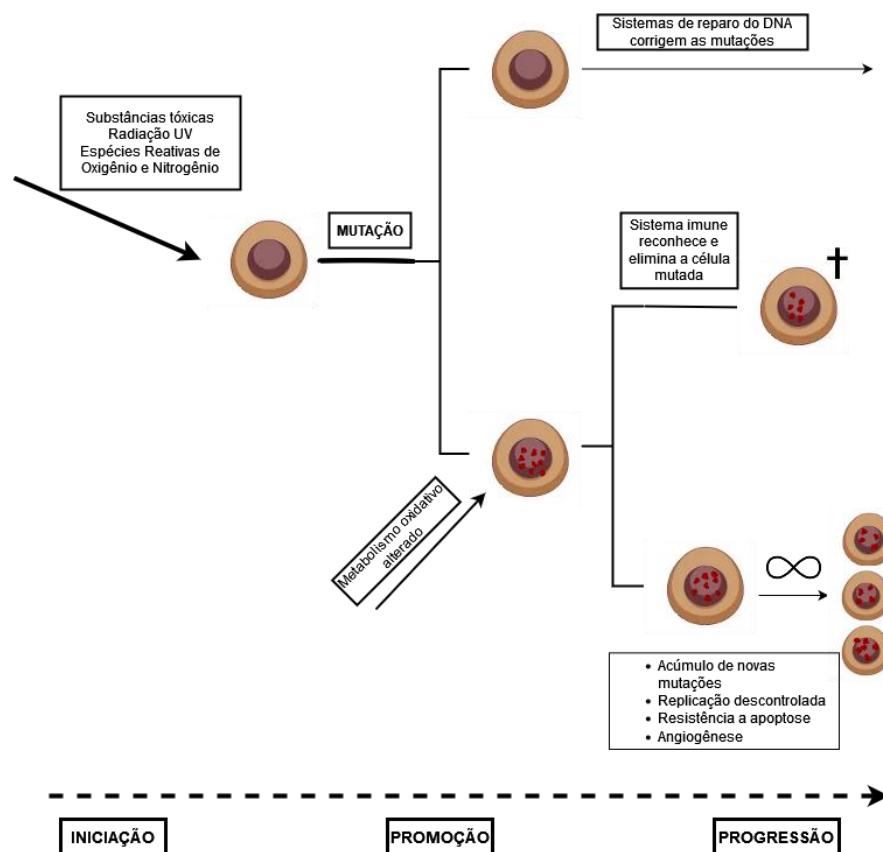
Este documento segue as normas do manual de dissertações e teses da UFSM. O capítulo DISCUSSÃO, encontrado no final da tese, busca conectar os objetivos e resultados obtidos. O capítulo REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, por sua vez, contempla somente as citações do capítulo INTRODUÇÃO.

Os manuscritos estão estruturados conforme as normas da revista em que pleiteamos publicá-los. O MANUSCRITO I foi submetido para publicação na revista *Pharmacological Reports*. O MANUSCRITO II está formatado conforme as normas da revista *Research, Society and Development*. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda principal causa de mortalidade humana e de cães e gatos no mundo (FIGHERA, 2008; GBD 2020 MORTALITY AND CAUSES OF DEATH, 2021) (Tabela 1). Em nível celular, o câncer é um processo que envolve três etapas: iniciação, promoção e progressão tumoral (STODDART, 1983) (Figura 1). Acredita-se que a fase que inicia o processo, a iniciação tumoral, origina-se de alterações genéticas que promovem a proliferação anormal de uma única célula. Tais alterações genéticas podem ser influenciadas por uma série de como a ativação ou inativação de oncogenes (PIEROTTI, 2003), inflamação ou danos ao DNA.

Figura 1 - Estágios da carcinogênese.



Fonte: modificado de SAGRILLO (2014) usando usando *software* disponível em <https://www.diagrams.net/>.

Substâncias químicas ambientais com propriedades carcinogênicas podem desencadear essas alterações genéticas, afetar o ciclo celular e causar proliferação anormal de células (WORLD CANCER RESEARCH FUND, 2007). A próxima etapa, a promoção tumoral, permite a replicação indiscriminada das células tumorais (MARKS, 2007). Alternativamente, vias celulares de reparo do DNA, especialmente a p53 (discutida adiante) podem promover a correção de erros e retorno da célula à normalidade. A fase final da carcinogênese é denominada progressão tumoral, e caracteriza-se pela replicação descontrolada das células, há invasão de tecidos circundantes e ocorrência de metástases (ABEL & DIGIOVANNI, 2015).

No Brasil, dados de SANTOS (2013) indicam que há mais de 54,2 milhões de cães e 23,9 milhões de gatos vivendo em lares brasileiros. Com o aumento da qualidade de vida dos animais, o aumento no diagnóstico do câncer pelos médicos veterinários. A Tabela 1 sumariza as principais categorias de doenças mais diagnosticadas em um serviço de patologia veterinário. Destacam-se a grande ocorrência de neoplasias em animais idosos e adultos.

Nesse contexto, o melanoma tem origem nos melanócitos e possui importância pela alta malignidade, capacidade de metástases e prognóstico reservado. Em função da baixa diferenciação citológica com os melanocitomas benignos, o termo “neoplasia melanocítica” tem sido utilizado para definir lesões tumorais com grande quantidade de células com grânulos de melanina intracitoplasmáticos (RESENDE, 2015). Em cães, essas lesões são comumente encontradas na cavidade oral, lábios, pele e dígito (SMITH, 2002). Em gatos, as neoplasias melanocíticas ocorrem principalmente na região ocular, cabeça, cavidade oral e dígitos (RECK & KESSLER, 2020).

As neoplasias melanocíticas são as principais lesões tumorais da cavidade oral em cães (SMITH, 2002), sendo que a localização anatômica influencia na malignidade tumoral. Assim, as lesões melanocíticas comumente encontradas na cavidade oral e dígitos têm alta malignidade (GILLARD, 2002), enquanto que as lesões oculares e cutâneas tem baixa invasividade e metástase (SMITH, 2002). O prognóstico para as lesões melanocíticas encontradas na cavidade oral é reservado, e a expectativa de vida mesmo após tratamento é de cerca de um ano (FONSECA-ALVES, 2021).

Em gatos, o prognóstico também é reservado, em função principalmente recidivas e de metástases para linfonodos regionais, que ocorrem em cerca de 50% dos casos (VAN DER LINDE-SIPMAN, 1997). Na região ocular, as lesões melanocíticas ocorrem principalmente na íris (DAY & LUCKE, 1995), causando uma área de hiperpigmentação na íris (DUBIELZIG, 1990), e costumam causar glaucoma.

Tabela 1 – Principais categorias de doenças por faixa etária em cães necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária da UFSM. A categoria “filhote” compreende animais de até um ano de idade; “adulto” corresponde a animais de um a nove anos de idade; já o termo “idoso” compreende cães com 10 anos de idade ou mais.

Categoria de doença	Filhote (%)	Adulto (%)	Idoso (%)	Geral (%)
Doenças infecciosas e parasitárias	55,3	27,5	12,4	35
Neoplasias	-	7,9	32,0	7,8
Distúrbios causados por agentes físicos	6,4	9,0	4,1	7,6
Doenças degenerativas	0,6	8,3	22,6	7,1
Intoxicações ou toxiinfecções	1,0	3,5	1,5	2,3
Eutanásia por conveniência	1,0	1,7	3,3	2,1
Doenças metabólicas e endocrinológicas	0,1	2,9	5,0	2,0
Distúrbios iatrogênicos	1,3	1,4	2,0	1,7
Demais causas	34,0	37,5	14,1	34,4

Fonte: FIGHERA (2008), modificado.

De acordo com um levantamento realizado pela Universidade de São Paulo, no período de 1993 a 2002 foram diagnosticados 58 tumores do tipo melanoma em cães em amostras enviadas ao laboratório (KIMURA et al., 2012), quantidade correspondente a 3% do total de neoplasias diagnosticadas. Em gatos, por sua vez, apenas 1 caso de melanoma foi detectado nesse período. No município de São Luis, Maranhão, foram diagnosticados 23 casos de melanoma no período de 2008 a 2015, totalizando 3% dos neoplasmas caninos diagnosticados nesse período (RIBEIRO, 2020). Em Salvador, Bahia, analisando somente tumores de pele de caninos, MACHADO (2018) encontrou prevalência de 3% de melanoma, com maior ocorrência em animais idosos. Assim, observamos que o melanoma possui baixa incidência em cães e gatos, mas sua alta invasividade e capacidade de metástase chamam a

atenção para os possíveis fatores de risco para o melanoma, como consanguinidade, traumas químicos, hormônios e exposição ao sol (RAMOS-VARA, 2000).

Figura 2 - A - Gato com melanoma maligno no plano nasal. B - Cachorro com melanoma no maxilar. C - Aspecto clínico do melanoma maligno na parede torácica e abdominal. D - Melanoma no olho de um cachorro.



Fonte: A - RECK & KESSLER, 2020; B - NISHIYA, 2016; C - NISHIYA, 2016; D - PROUTEAU & ANDRÉ, 2019.

A replicação celular é um processo decorrente da expressão de diversos genes celulares, e a tumorigênese é um processo que envolve a ocorrência de mutações em determinadas sequências genéticas, que conferem vantagem às células neoplásicas. Os principais genes envolvidos na carcinogênese, denominados de oncogenes, estão listados na Tabela 2. As funções da proteína p53 serão discutidas adiante, e alterações genéticas que causam desregulação da p53 são as mais comuns em tumores humanos (KASTENHUBER & LOWE, 2017) e, possivelmente, também em tumores de animais. *MDM2* é um gene que geralmente encontra-se inativo, mas que, em durante a carcinogênese, há aumento da expressão, sendo assim denominado proto-oncogene, e atua inibindo o efeito da p53. Mutações em outros

genes , como *NRAS*, *BRAF V600E* e *c-Kit*, também têm ocorrido em tumores de diversas origens.

Tabela 2 - Principais genes envolvidos na carcinogênese do melanoma.

Gene	Descrição	Referência
<i>TP53</i>	Modula ciclo celular, reparo do DNA e apoptose.	WONG, 2019
<i>MDM2</i>	Gene altera a função da p53 e, possivelmente, pode ser a responsável pela carcinogênese em casos de não há mutações no gene <i>TP53</i>	HAYWARD, 2017
<i>NRAS</i>	Mutações pontuais provocam hiperativação de vias celulares envolvidas com a replicação celular	GILLARD, 2014
<i>PTEN</i>	Codifica proteína responsável por parar a replicação celular. Mutações provocam perda da função da proteína	WEI, 2016
<i>c-Kit</i>	Modula várias vias celulares envolvidas no crescimento, sobrevivência e proliferação celular	PHAM, 2020
<i>BRAF V600E</i>	Gene mais envolvido na carcinogênese do melanoma humano, menor alteração em cães. Mutações indicam exposição à radiação UV.	MOCHIZUKI, 2015
<i>PTPRJ</i>	Possível gene supressor de tumores, que é inativado na carcinogênese	HERLYN, 2010

Fonte: coletânea de referências, criado pelo autor.

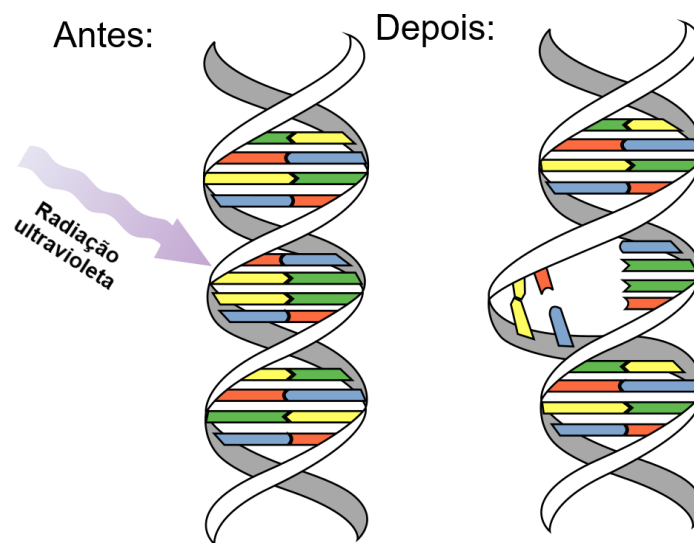
A maioria das alterações genéticas mencionadas acima afetam proteínas envolvidas em vias de sinalização ou replicação celular. Nesse sentido, a realização de perfis de expressão de genes pode auxiliar no diagnóstico e caracterização de neoplasias (PIEROULLI, 2019), e avaliar a diferença entre células normais e tumorais e introduzir novos alvos para terapia. Entretanto, embora as principais causas de câncer sejam mutações no genoma celular, cerca de 10% dessas alterações têm origem hereditária (ANAND, 2008).

Dentre as causas ambientais que merecem destaque, a radiação ultravioleta (UV) é um carcinógeno envolvido no desenvolvimento de câncer de pele do tipo melanoma e não melanoma (MANCEBO & WANG, 2014). Ainda que existam outros fatores para a carcinogênese, especialmente os genéticos, a radiação ultravioleta está envolvida, mesmo que parcialmente, com a formação de melanomas (WATSON, 2016).

O sol emite três tipos principais de raios ultravioleta, conhecidos como ultravioleta A (UVA), ultravioleta B (UVB) e ultravioleta C (UVC) (Figura 3). Os raios UVA (315-400 nm) correspondem a cerca de 95% da radiação que chega ao planeta (IARC WORKING GROUP, 2012), e causa danos às células pela formação de radicais livres (BREM, 2017), além de possuir capacidade de atingir as camadas mais profundas da pele, causando envelhecimento

precoce. A radiação UVB (280–315 nm), por sua vez, causa dano direto ao DNA pela formação de dímeros de pirimidinas (Figura 3) nas cadeias genéticas (MULLENDERS, 2018) e está envolvido principalmente na formação de queimaduras. A radiação UVC (200-280 nm), apesar de causar mais danos que a radiação UVA e UVB, é completamente absorvida pela camada de ozônio e não atinge a superfície terrestre.

Figura 3 - Formação de dímeros de pirimidinas no DNA. A radiação Ultravioleta provoca a ligação de duas bases consecutivas na fita de DNA, alterando o pareamento normal da dupla-fita naquele local.



Fonte: modificado de https://en.wikipedia.org/wiki/Pyrimidine_dimer#/media/File:DNA_UV_mutation.svg

A exposição aguda à radiação UV leva a efeitos biológicos que podem ser reparados, mas a exposição prolongada ou recorrente causa o fotoenvelhecimento, a inflamação crônica, a imunossupressão e problemas de reparo das mutações do ácido desoxirribonucleico (DNA), causando a replicação descontrolada de células cancerosas (BOSCH, 2015). Em adição, ocorrem eritema e queimaduras solares devido a danos ao DNA causado por peroxidação lipídica e modificação de proteínas (DUNAWAY, 2018) A principal lesão associada à radiação ultravioleta é a formação de dímeros entre pirimidinas nucleares (Figura 4) adjacentes (GOTO et al., 2015). Esses danos são comumente corrigidos por meio de mecanismos celulares de reparo genético (DOUKI, 2016) e têm sido implicados na patogênese do melanoma (PFEIFER & BESARATINIA, 2012)

A radiação ultravioleta e a luz visível (>400-500 nanômetros [nm]) também provocam danos ao DNA e alteração de bases genéticas pela produção de radicais livres (MELNIKOVA

& ANANTHASWAMY, 2005). Os radicais livres são moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados nas órbitas externas, o que os torna muito instáveis, lábeis e quimicamente muito reativos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Estas moléculas têm um importante papel na patogênese do dano tecidual em vários distúrbios (BISWAS, 2017).

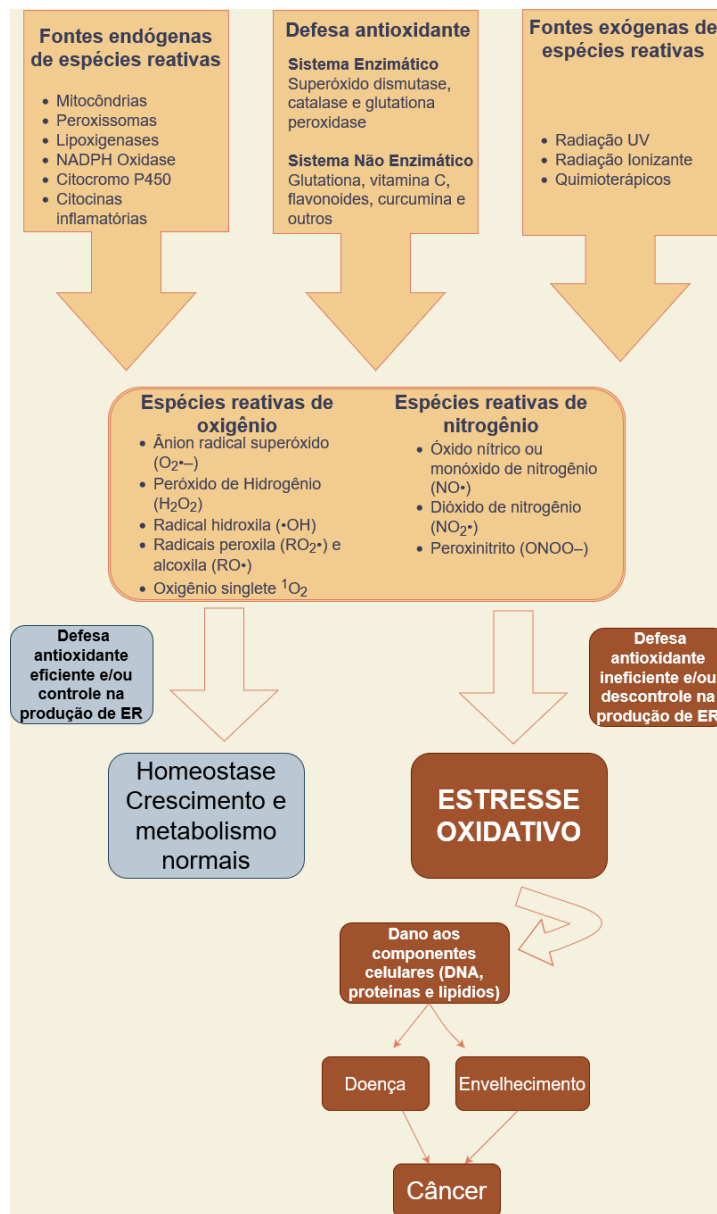
As espécies reativas de oxigênio (ERO) incluem radicais livres como o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peroxil (RO_2^{\bullet}), hidroperoxil (HRO_2^{\bullet}) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}), este último é considerado o mais reativo por combinar-se rapidamente com metais de transição, podendo causar danos como mutação ou inativação do DNA celular, além de iniciar a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (HALLIWELL, 2000; STOHS, 1995). As espécies não radicalares, apesar de não possuírem elétrons desemparelhados, são muito instáveis como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HClO) (OFOEDU, 2021).

O estresse oxidativo (Figura 4) ocorre quando espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas mais rapidamente do que são neutralizadas por mecanismos antioxidantes (AZIZ, 2018). O organismo possui um sistema de proteção antioxidante, enzimático e não enzimático, que tem a importante função de inibir os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio através do equilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes (SHARIFI-RAD, 2020). Em relação ao sistema antioxidante enzimático, pode-se destacar a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx), que constituem a primeira linha de defesa endógena de neutralização das ERO (IGHODARO & AKINLOYE, 2018). Através destas enzimas, as células tentam manter baixas as quantidades do radical superóxido e de peróxidos de hidrogênio, evitando assim, a formação do radical hidroxila. Dentre os antioxidantes não enzimáticos podem-se destacar as vitaminas C e E, além dos compostos orgânicos contendo grupos sulfidril (-SH) denominados tióis não protéicos (*Non-protein thiols* – NPSH). Os tióis de baixo peso molecular como a glutathiona reduzida (GSH) e cisteína são importantes antioxidantes na manutenção da integridade celular (KURUTAS, 2016). Ainda assim, essa resposta pode não ser suficiente para prevenir danos celulares após exposição repetitiva ou excessiva a agentes carcinogênicos (FGUYER, 2003).

Outra importante espécie reativa é o óxido nítrico (NO^{\bullet}), também chamado de monóxido de nitrogênio, uma molécula sinalizadora gerada por múltiplos mecanismos. Um desses mecanismos é catalisado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Em seres humanos, há três isotipos de NOS: neuronal (nNOS ou NOS1), induzível (iNOS ou NOS2) e endotelial (eNOS ou NOS3). Melanócitos normais expressam os três isotipos (BRUCH-GERHARZ, 1998). Outra forma de produção de NO^{\bullet} é por meio da redução do nitrato a nitrito, que, por

sua vez, é reduzido a NO•. O NO• interfere com o metabolismo de proteínas, causando danos e prejudicando a função proteica. Em reação com ânions superóxido, o NO• gera peroxinitrito, substância extremamente tóxica que causa lesões proteicas nos componentes celulares. A expressão de iNOS é maior em células de melanoma e o nível de expressão está associado a maiores índices de gravidade do tumor (AHMED & VAN DEN OORD, 2000; MASSI, 2009). No entanto, níveis elevados de NO• no microambiente tumoral exercem efeitos citotóxicos, enquanto que baixos níveis de NO• promovem o crescimento tumoral (VANNINI, 2015)

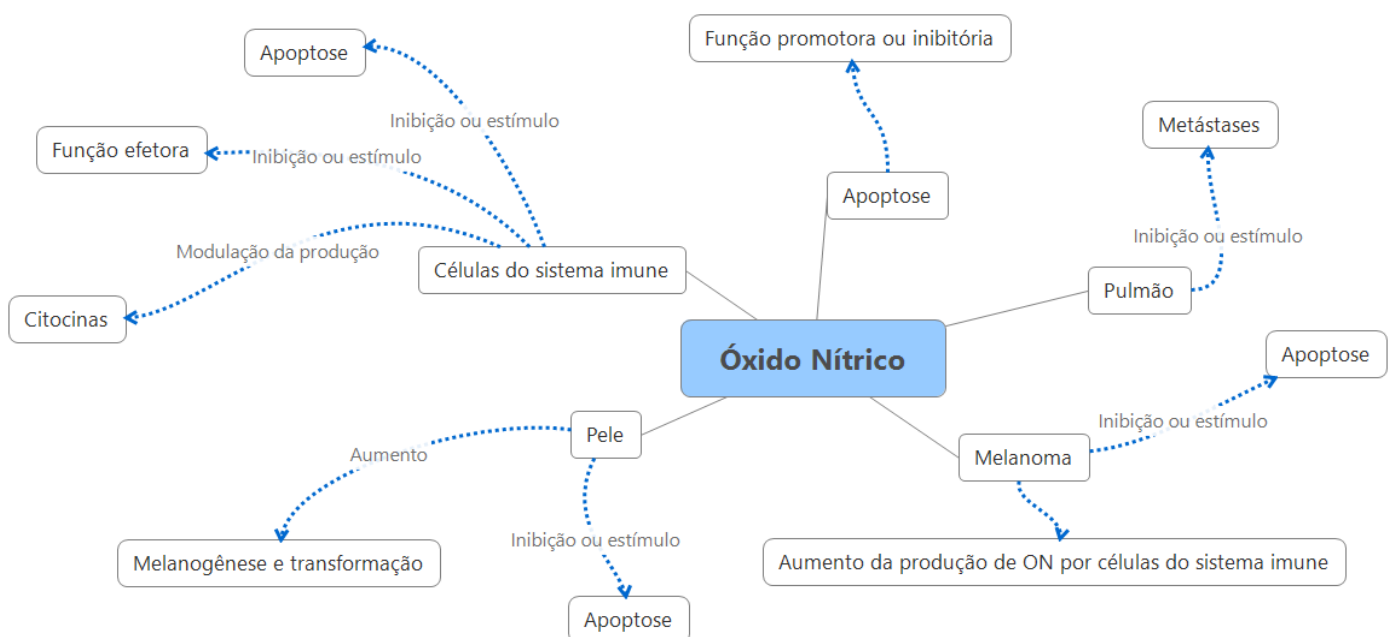
Figura 4 – Fontes e respostas celulares às Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e de Nitrogênio (ERN).



A figura 5 apresenta as principais funções do NO• em relação ao melanoma. A melanina possui participação na carcinogênese do melanoma, além dos seus conhecidos efeitos protetivos (BRASH, 2016). Além da formação de dímeros de timina picossegundos após a absorção da radiação UV por uma timina ou citosina, há a formação de NO• e peroxinitrito, provocando a excitação de elétrons. Nesse momento, há transferência de energia e formação de dímeros de pirimidinas, mesmo sem presença de radiação UV. Dessa forma, o NO• participa da transformação de melanócitos saudáveis em melanócitos tumorais. A progressão tumoral é auxiliada pela angiogênese promovida pelo NO•, provavelmente em função do estímulo do NO• sobre a expressão e atividade do fator de crescimento endotelial (VEGF)(KIMURA & ESUMI, 2003). O VEGF aumenta a permeabilidade vascular e é necessário para a formação e manutenção das fenestras endoteliais (LANKHORST, 2016), auxiliando o processo de metástase tumoral.

O NO• também influencia o microambiente tumoral inflamatório facilitando o escape das células tumorais do sistema imune (YARLAGADDA, 2017). A modulação da resposta imune, como a quimiotaxia de células imunes, além de processos celulares, como a apoptose, são executados por meio de mecanismos com a participação do NO•. Além do escape ao sistema imune, o NO• também pode auxiliar ou inibir a formação de metástases de melanoma, especialmente para o pulmão.

Figura 5– Representação dos efeitos do óxido nítrico em relação ao melanoma.



Fonte: YARLAGADDA, 2017 (modificado usando *software XMind*).

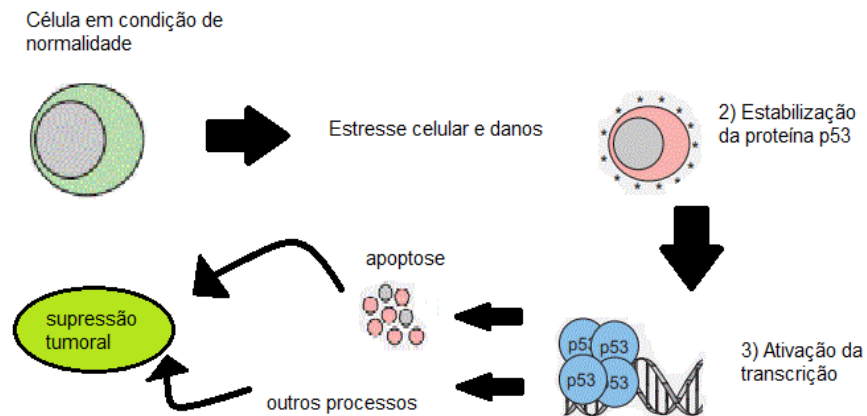
As proteínas da família das metaloproteinases de matriz (MMP) são um conjunto de proteínas que dissolvem a matriz extracelular e permitem a migração e difusão de células tumorais (DAS, 2017). Essas proteínas são expressas em altos níveis em células tumorais e o NO• modula a expressão das MMP, afetando a invasão celular (O’SULLIVAN, 2014). O NO• possui atuação na progressão tumoral e metástase, mas, como mencionado anteriormente, níveis elevados (>400–500 nM) de NO• no microambiente tumoral exercem efeitos citotóxicos, enquanto que baixos níveis de NO (<100 nM) promovem o crescimento tumoral (CHENG, 2014). Os efeitos antitumorais do NO• estão ligados principalmente à formação de ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN), que, por sua vez, promovem danos aos componentes celulares e podem ativar mecanismos de apoptose celular (RAHAT & HEMMERLEIN, 2013).

A ocorrência de danos celulares provoca a ativação de diversas proteínas. Dentre essas, a proteína p53 é um fator de transcrição nuclear que ativa genes envolvidos no ciclo celular ou na apoptose (MINAMI, 2015), sendo expressa em baixos níveis em condições de normalidade e na ausência de estresse celular. Na ocorrência de lesão de DNA (Figura 6), há ativação da p53, que promove reparo do DNA danificado ou induz apoptose celular, conforme a extensão do dano ao DNA (EL-DEIRY, 2003). Não obstante, a p53 causa a parada do ciclo celular na fase G1, permitindo o reparo do DNA antes da sua replicação na fase S (CHEN, 2016). Buscas por mutações indicam que mais de 50% das neoplasias humanas causam alterações no gene p53 (OZAKI & NAKAGAWARA, 2011). Ainda, estudos relacionaram a exposição à radiação solar com a ativação da proteína p53 (FEDAK, 2018; PEI, 2015). Assim, a exposição solar aumenta o dano ao DNA e ocorre a reparação do DNA danificado ou apoptose celular.

Há duas vias distintas para indução de apoptose celular, a via intrínseca e a via extrínseca. A via regulada por Bcl-2, também denominada intrínseca ou mitocondrial, é ativada por situações como o estresse oxidativo ou dano ao DNA (CZABOTAR, 2014). Já a via de apoptose por receptores ou extrínseca é ativada pela ligação a receptores do fator de necrose tumoral (KOKOLAKIS, 2021). A anormalidade desses eventos biológicos e moleculares leva a formação de células cancerígenas. Portanto, o gene p53 tem uma relação direta com câncer, sendo relatado que anormalidades envolvendo a p53 estão associadas a prognóstico reservado (LAI, 2002). Em condições normais, a p53 atua na divisão celular, angiogênese, diferenciação e metabolismo de DNA e apoptose (CHAE, 2011; TAYLOR & STARK, 2001).

A via intrínseca da apoptose envolve a ativação de membros pró-apoptóticos da família *Bcl-2* que exercem sua função, tanto pró como antiapoptótica, pela mitocôndria. As proteínas antiapoptóticas desta família, como *Bcl-2* e *BCL-x* previnem a apoptose sequestrando caspases ou prevenindo a liberação de citocromo C da mitocôndria ao citoplasma. As proteínas pró-apoptóticas desta família, por sua vez, causam a liberação de caspases e liberação de fatores apoptóticos mitocondriais (REDZA-DUTORDOIR & AVERILL-BATES, 2016), como proteínas do citocromo C da mitocôndria e ativação da caspase 3 (XIONG, 2014).

Figura 6 – Representação dos efeitos da ativação da p53 sob estímulo celular.



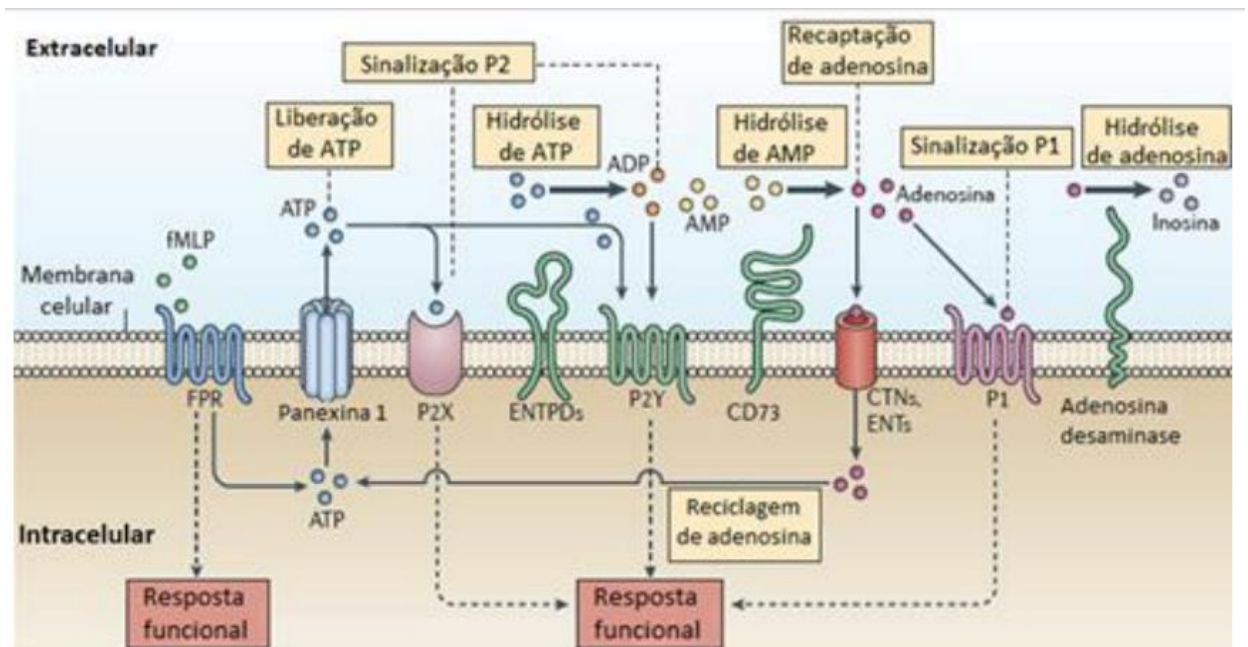
Fonte: AUBREY, 2018 (modificado).

A sinalização purinérgica (Figura 7) é uma importante via moduladora de variados processos fisiológicos, incluindo proliferação, apoptose e morte celular (BURNSTOCK, 2006a). Fazem parte deste sistema os nucleosídeos e nucleotídeos de adenina, receptores purinérgicos e as ectoenzimas, responsáveis pela degradação destas moléculas (YEGUTKIN, 2014).

Apesar de funções para as purinas extracelulares terem sido descritas logo após a descoberta do ATP e ADP, o interesse sobre estas moléculas tinha como base o conceito de "ligação fosfato de alta energia" (MÜLLER, 2019). No entanto, está bem estabelecido o conceito de que essas moléculas também atuam como mensageiros extracelulares, capazes de sinalizar uma variedade de efeitos biológicos no meio extracelular (BURNSTOCK, 2006b). Dentre esses, o ATP extracelular está envolvido na proliferação, diferenciação e apoptose

celular (SALVESTRINI, 2017).

Figura 7 – Visão geral da sinalização purinérgica.



Fonte: JUNGER, 2011 (adaptado por COSTA, 2019)

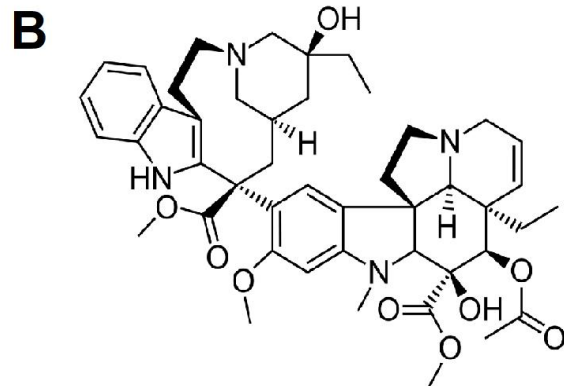
As concentrações dos nucleotídeos extracelulares, em muitos tecidos, são reguladas pela ação de enzimas pertencentes à família das ectonucleotidases. Essas enzimas hidrolisam os nucleotídeos extracelulares em seus respectivos nucleosídeos, dentre elas estão as ENTPDases (ecto-difosfohidrolases, CD39 ou apirases) que hidrolisam tanto adenosina trifosfato (ATP) quanto adenosina difosfato (ADP) em adenosina monofosfato (AMP) na presença de cátions divalentes como cálcio e magnésio, e a Ecto-5' nucleotidase, que termina a cascata ectonucleotidásica com a hidrólise dos nucleotídeos monofosfatados, resultando em adenosina (GIULIANI, 2019). A adenosina desaminase (ADA) também faz parte do conjunto de enzimas responsáveis pela degradação sequencial dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, regulando as concentrações extracelulares de adenosina (GIULIANI, 2020).

A sinalização extracelular da adenosina tem efeitos reparadores em doenças agudas, mas a permanência de níveis elevados de adenosina por um longo período ativa vias que promovem dano tecidual e fibrose (LIU & XIA, 2015). Em experimento utilizando camundongos, demonstrou-se que a adenosina participa ativamente da fibrose na pele (CHAN, 2006). Ainda que promova efeitos benéficos, a sinalização por meio da adenosina

também pode atuar promovendo a apoptose celular, como em células de câncer de cólon (SAITO, 2010). Nesse contexto, a pesquisa por novas substâncias capazes de modular essas vias de sinalização tem sido efetuada.

Dentre essas substâncias, a vimblastina é uma substância de origem natural utilizada para quimioterapia de neoplasias de diversas origens, e é extraída da planta *Catharanthus roseus*, conhecida como vinca-de-madagascar ou vinca-de-gato (Figura 8). Um total de cinco quimioterápicos são extraídos dessa planta e são denominados “alcaloides da vinca”: vimblastina, vincristina vindesina, vinorelbina e vinflunina. A vimblastina é comumente utilizada para tratamento do linfoma, leucemia, câncer testicular (BARZDO, 2009) e melanoma (ANVEKAR, 2012).

Figura 8 – A - Flor da planta *Catharanthus roseus*, conhecida como vinca-de-gato ou vinca-de-Madagascar. (B) Estrutura química da vimblastina.



Fonte: Google Imagens

A principal característica das células tumorais é a replicação desordenada. Os microtúbulos são componentes celulares envolvidos diretamente nesse processo, em que coordenam a adequada segregação dos cromossomos durante a intérfase (CONTI, 2017). Assim, agentes quimioterápicos que atuem nos microtúbulos de células tumorais, como a vimblastina, são ferramentas importantes para o tratamento medicamentoso do câncer. A vimblastina atua impedindo a polimerização da tubulina e consequente formação dos microtúbulos, o que causa parada na replicação celular e apoptose (MITCHISON, 2012). Não obstante, a vimblastina também possui efeitos antiangiogênicos (VACCA, 1999), prejudicando a replicação de células endoteliais, o que certamente expande as doenças em que essa substância pode ser utilizada.

O uso de medicamentos no tratamento do câncer tem sido prejudicado nos últimos anos pela ocorrência de resistência tumoral aos quimioterápicos. Em relação aos alcaloides da vinca, a redução da permeabilidade das membranas celulares ao medicamento é um problema (UEDA, 1987), causando redução da atividade antiproliferativa da vimblastina. Além disso, o uso desses medicamentos causa uma ampla gama de reações adversas, como náusea, vômito, constipação e febre (MOUDI, 2013).

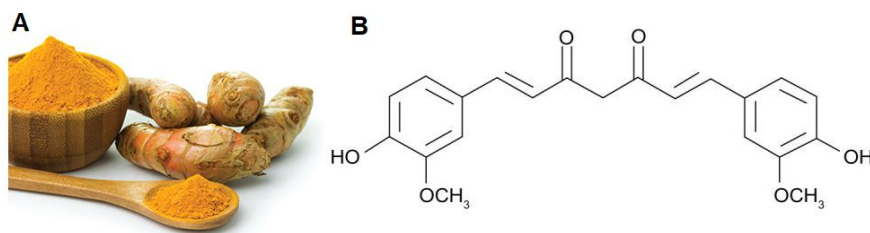
Uma vez que os efeitos colaterais são diversos e intensos e que a eficácia do tratamento convencional tem diminuído, pesquisadores de diversas partes do mundo têm avaliado diferentes terapias adjuvantes. Uma das linhas de pesquisa, talvez a mais promissora, inclui o uso de substâncias antioxidantes presentes em frutas, verduras e legumes, sendo que uma planta merece destaque: o açafrão-da-terra (*Curcuma longa*). Trata-se de um tempero comum na culinária indiana rico em curcumina. As propriedades anticarcinogênicas da curcumina têm sido demonstradas pela inibição da iniciação e promoção tumoral, em que a curcumina atua em diversas vias de sinalização, como fatores de transcrição e crescimento, assim como seus respectivos receptores, citocinas, enzimas e genes reguladores da proliferação celular e apoptose. O uso da curcumina no tratamento adjuvante de diferentes tipos de câncer, como colorretal, mama, pulmão e pâncreas, tem sido relatado com sucesso. A curcumina inibe a progressão do carcinoma de células escamosas (CCE) e previne o câncer de pele em camundongos (PHILLIPS, 2011).

A curcumina, uma substância extraída dos rizomas da planta *Curcuma longa* (Figura 9A e B), possui efeitos antineoplásicos, inibindo a iniciação tumoral (VALLIANOU, 2015) e a promoção tumoral (TOMEH, 2019), pois atua em uma ampla variedade de genes, fatores de crescimento e enzimas que regulam a proliferação celular e a apoptose (AGGARWAL, 2003) (Figura 10). A curcumina induz a liberação de citocromo C da mitocôndria, causando ativação da caspase 3 e clivagem da poli-(ADP-ribose)-polimerase-1 (PARP), que é um indicador de apoptose dependente de caspase-3 (KHAN, 2012). Ainda, a curcumina possui efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, cicatrizantes, hipoglicemiantes e antimicrobianos (PRASAD, 2014).

Considerando os efeitos benéficos da curcumina em várias doenças, seus efeitos têm sido amplamente estudados. A curcumina, isoladamente ou em combinação com outros agentes, é utilizada para prevenção e tratamento de várias formas de câncer em humanos, como câncer colorretal (CALIBASI-KOCAL, 2019), de pâncreas (BIMONTE, 2016), de mama (SONG, 2019) e próstata (TERMINI, 2020). As propriedades antineoplásicas da curcumina derivam, provavelmente, da sua ação pró-apoptótica, antiproliferativa, antioxidante

e anti-inflamatória (AGGARWAL, 2003; RAVINDRAN, 2009; SARKAR, 2010). SHEHZAD (2013) demonstrou o papel da curcumina na modulação da cascata de apoptose, a via de sinalização da proteína p53, o fator nuclear kB (NF-kB) e o ciclo da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK).

Figura 9 – (A) Rizomas de *Curcuma longa* e tempero culinário preparado pela moagem dos rizomas e (B) visão geral da molécula de curcumina.

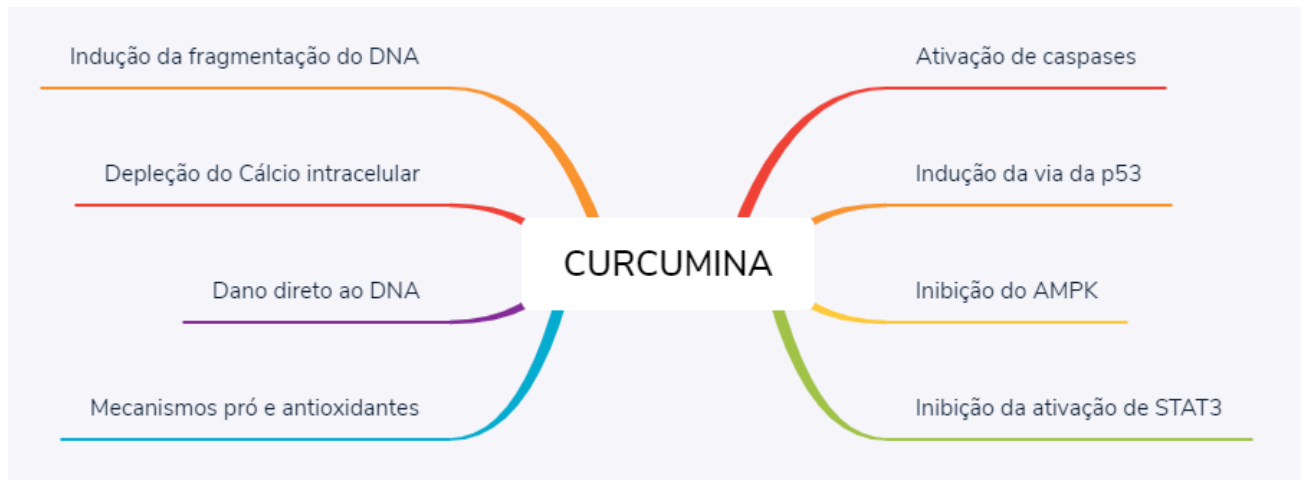


Fonte: Google Imagens

A curcumina inibe o crescimento e bloqueia a progressão tumoral do carcinoma de células escamosas (CCE) *in vivo* (PHILIPS, 2011) inibindo a proteína pS6, importante regulador do ciclo celular, por meio da administração oral em camundongos. A curcumina também aumenta o tempo de exposição ultravioleta (UV) necessário para ocorrência de câncer de pele *in vivo* e reduz a quantidade de neoplasmas de pele (PHILLIPS, 2013) em camundongos que receberam curcumina oral ou tópica, sugerindo que esta substância é eficaz na prevenção do câncer de pele.

Em adição, a curcumina atua no mecanismo antioxidante em células normais, mas promovendo geração de espécies reativas em células tumorais (SYNG-AI, 2004). A promoção de apoptose em células tumorais, mas não em células normais, deriva de mecanismos ainda não completamente elucidados. Além disso, a maioria das células tumorais expressam o NF-kB (SHISHODIA, 2005), que atua suprimindo a apoptose das células tumorais. A curcumina pode impedir a sobrevivência das células tumorais pela supressão do NF-kB.

Figura 10 – Mecanismos de indução de apoptose em células tumorais pela utilização de curcumina.



Fonte: RAVINDRAN, 2009 (adaptado)

Diante da alta malignidade dos melanomas em cães e gatos e resultados incentivadores da ação da curcumina em neoplasias de diversas origens., este estudo busca avaliar se esta substância tem efeitos positivos em cultivo celular de melanoma. Para isso utilizaremos a linhagem de melanoma humano SK-MEL-28 como modelo, em que iremos avaliar a viabilidade, a invasão e a migração celular, bem como marcadores de estresse oxidativo, atividade das ectonucleotidases e as vias apoptóticas. A fim de mensurar os efeitos sinérgicos da curcumina a um quimioterápico, utilizaremos a vimblastina, substância que atua prejudicando a replicação em células tumorais. Acreditamos que nossos resultados irão demonstrar que a curcumina tem grande potencial na abordagem integrativa do melanoma, representando um aliado no tratamento desse câncer tão agressivo. Essa primeira linha de pesquisa trará subsídios para uma pesquisa clínica futura, onde pacientes em tratamento com este tipo de tumor, poderão se beneficiar dos efeitos observados *in vitro*.

2 **CAPÍTULO I – MANUSCRITO I – CURCUMIN AND VINBLASTINE DISTURB ECTONUCLEOTIDES ENZYMES ACTIVITY AND PROMOTE ROS PRODUCTION IN HUMAN CUTANEOUS MELANOMA CELLS.**

Artigo submetido para: *Pharmacological Reports*.

Curcumin and vinblastine disturb ectonucleotides enzymes activity and promote ROS production in human cutaneous melanoma cells

Vinícius Leobet Lunkes^{*a}, Taís Vidal Palma^b, Charles Elias Assmann^b, Vitor Bastianello Mostardeiro^b, Maria Rosa Chitolina^b, Cinthia Melazzo de Andrade^{a,*}.

^a Postgraduate Program in Veterinary Medicine, Center for Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

^b Postgraduate Program in Biological Sciences: Biochemistry Toxicological, Department of Chemistry, Center for Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

*** Corresponding author: Vinícius Leobet Lunkes or Cinthia Melazzo de Andrade, Ph.D. Department of Small Animal Clinic, Center of Rural Sciences Federal University of Santa Maria-RS, Room 121, Veterinary Hospital Building, Roraima Avenue n° 1000, Santa Maria, RS 97105900, Brazil. Fax number: +55-55-3220-8814;**

Abstract

BACKGROUND: Cancer is a leading cause of death. Melanoma skin cancer originates in melanocytes and represents 80% of deaths associated with skin cancer. Vinblastine (VIN) is a chemotherapeutic agent used in treatment of cancer, impairing mitotic spindle, and tumoral development. Curcumin (CUR), a compound extracted from the rhizomes of the *Curcuma longa* plant, has beneficial effects preventing development and

progression of cancer, modulating immune response, and oxidative stress. The expression of purinergic receptors, ecto-enzymes and adenosine modulates inflammatory response against cancer.

METHODS: Activity of enzymes and markers of cell damage in oxidative stress, generation of reactive oxygen species (ROS), and activity of ecto-enzymes in the melanoma cell line were investigated. Human melanoma cell line was treated with curcumin (40 μ M), vinblastine (VIN) (20 nM), or a combination of both for 24h. Oxidative stress enzymes and byproducts were measured and compared against the activity of ecto-enzymes.

RESULTS: There was a marked increase in ROS production in every group, but an increase in protein carbonylation was only detected in vinblastine group. Our results show inhibition of extracellular ADP hydrolysis by CUR, evidenced by a significant decrease in ADP substrate remotion. VIN possibly increased adenosine formation, demonstrated by an increase of ADP substrate remotion. VIN (alone or combined with CUR) reduced activity of ADA, thus increasing concentration of adenosine in the tumoral microenvironment.

CONCLUSION: CUR increased ROS generation in melanoma cells, and disrupted purinergic signaling cascade. so it may be a promising adjuvant for melanoma treatment, cancer with high incidence, and lethality.

Keywords: Melanoma; Curcumin; Skin; Enzymes.

Abbreviations

ADA: Adenosine deaminase

ADP: Adenosine diphosphate

AMP: Adenosine monophosphate

ATP: Adenosine triphosphate

CAT: Catalase

CUR: Curcumin

DCFH: Dichlorofluorescin

MDA: Malondialdehyde

ROS: Reactive oxygen species

SOD: Superoxide dismutase

TBARS: Thiobarbituric acid reactive substance

VIN: Vinblastine

Introduction

Cancer is a leading cause of death, responsible for more than 10 million deaths in 2019 [1]. It develops through a series of successive mutations in cellular genes in such a way that cancer cells form [2]. Melanoma skin cancer originates in melanocytes and represents 80% of deaths associated with skin cancer [3], and results from a multifactorial process in which there is genetic, phenotypic, and environmental predisposition [4]. Vinblastine (VIN) is a natural compound from *Catharanthus roseus*, known as Madagascar periwinkle, used in treatment of melanoma and other tumours, targeting cellular tubulin [5], impairing mitotic spindle and tumoral development.

Inflammation is an important risk factor of cancer development [6]. Since oxidative stress and inflammation are linked, when cellular antioxidant systems fail to maintain cell homeostasis, this may damage cell components, promote inflammation, and alter many pathways, like purinergic signaling [7].

The expression of purinergic receptors, along with ecto-enzymes and adenosine, modulates the inflammatory response against cancer. When ATP is present in the extracellular space of the tumor microenvironment, it is rapidly hydrolyzed by the enzyme CD39/NTPDase. In the sequence, AMP is hydrolyzed by ecto-5'-nucleotidase/CD73 to adenosine. Adenosine is mainly recognized as an immunosuppressive nucleotide and it is target to immune treatments following its inhibition [8]. Finally, adenosine is converted to inosine by the enzyme adenosine deaminase (ADA) [9]. Adenosine maintains an immunosuppressive environment and promotes further cell damage through reactive oxygen species (ROS) generated by inflammatory and cancerous cells.

ROS are highly reactive molecules, maintained at low levels by a balance between production and removal. ROS are involved in many physiologic and pathologic pathways, promoting apoptosis, cancer initiation, and damage of cellular proteins [10]. In this context, studies are analyzing the effects of natural substances in tumoral cells, and the possibility of being used as an adjuvant in cancer therapy in the future.

Curcumin, a compound extracted from the rhizomes of the *Curcuma longa* plant, has antineoplastic effects, inhibiting tumor initiation [11] and tumor promotion [12], as it acts in a wide variety of genes, growth factors and enzymes that regulate cell proliferation and apoptosis [13]. Furthermore, curcumin has antioxidant, anti-inflammatory [14], neuroprotective [15], anticancer and antimicrobial capabilities [16], among others, like modulation of ecto-enzymes [17]. It is unknown, however, whether CUR, alone or associated with

chemotherapeutic compounds, has any effect in melanoma cell lines, like SK-MEL-28, regarding ecto-enzymes and oxidative stress.

Considering the influence of oxidative stress and purinergic signaling in inflammatory conditions of melanoma, the present study was aimed to investigate the activity of enzymes and markers of cell damage in oxidative stress, generation of ROS, and activity of ecto-enzymes in melanoma cell lines treated with curcumin and/or vinblastine.

Materials and methods

Cell line and cell culture

Human melanoma cell line (SK-MEL-28 - ATCC® HTB-72™) was maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Life Technologies) plus 100 IU/mL of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin, and 10% cell culture tested fetal bovine serum. The cells were incubated in a cell culture incubator at 37°C, 5% CO₂ atmosphere, and 95% humidity. The culture medium was renewed 2 to 3 times per week.

Preparation of the CUR solution

A solution of 100 mM curcumin (CUR) (Sigma-Aldrich), diluted in dimethylsulfoxide (DMSO), was prepared to be used at different concentrations: 20,30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100µM. The maximum concentration of DMSO was less than 0.1%.

Cell viability by MTT assay

Cell viability was determined using the MTT assay [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] salt [18], employing CUR from 20 to 100 µM for 24h. Positive control (sodium hypochlorite 0.2% w/v) was defined as 100% death. The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of CUR was obtained through nonlinear regression and was used in subsequent treatments. To compare the effects of CUR to treatment, we used vinblastine (VIN) at 20 nM [19], and a combination of both. Unless specified otherwise, all cells were treated with CUR, VIN, or both, for 24 h.

E-NTPDase, E-5'-nucleotidase, and E-ADA assays

Twenty microliters of cell suspension (0.8-1.0 mg/mL of protein in saline - NaCl 0.9%) were added to the reaction mixture of E-NTPDase or E-5'-nucleotidase and preincubated for 10 min at 37 °C in a final volume of 200 µL. E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activities were determined by methods previously described [20,21]. Protein concentration, where needed, was measured according to Bradford's method [22]. Enzyme-specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

ADA activity was quantified spectrophotometrically [23]. The amount of ammonia produced was measured by absorption at 620 nm, and results were expressed in units per mg of protein.

Oxidative stress assays

Catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activity

CAT and SOD activities were determined in lysed cells. CAT activity was determined by the decomposition of H₂O₂ (3.4% v/v) at 240 nm [24]. SOD activity was quantified spectrophotometrically by determining the inhibition of auto-oxidation of epinephrine to adrenochrome at an alkaline pH at 480 nm in SK-MEL-28 cells [25]. Both assays used 10–40 µg of protein in each assay. The results were expressed in ηmoles/mg of protein relative to untreated control.

Levels of reactive oxygen species (ROS) by flow cytometry

2'-7'-Dichlorofluorescein (DCFH) level is based on deacetylation of the probe DCFH-DA, and its subsequent oxidation by ROS to DCFH, a highly fluorescent compound [26]. SK-MEL-28 cells (10 µL) were added to a medium containing Tris-HCl buffer (10 mM; pH 7.4) and DCFH-DA (1 mM). After DCFH-DA addition, the cells were incubated in the dark for 1 h until the start of flow cytometry (excitation at 488 nm and emission at 525 nm, and both slit widths were used at 1.5 nm).

Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) level

Lipid peroxidation was estimated by measuring TBARS and expressed in terms of malondialdehyde (MDA) content. SK-MEL-28 cells (200 µL) were incubated at 95 °C for 60 min in an acid medium containing 8.1% sodium dodecyl sulfate, 0.5 mL of acetic acid buffer (500 mM, pH 3.4) and 0.6% TBA. TBARS levels were measured at 532 nm, and absorbance was compared with the standard curve using MDA [27], and expressed in nmol of MDA per mg of protein.

Protein Carbonylation Level

Carbonylation of proteins was measured by the formation of hydrazone protein derivatives [28], using 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH), and expressed in nmol of carbonyl per mg of protein

Statistical analysis

Data were analyzed by Graph Pad Prism software (version 6.01) with one-way ANOVA, followed by Tukey's posthoc test. IC_{50} was calculated using nonlinear regression. Differences between mean values were considered significant at $p \leq 0.05$. Data are shown as mean values \pm SD, a representative for three independent experiments.

Results

CUR decreases viability of SK-MEL-28 cells

We evaluated antitumoral activity of CUR (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 μ M) in a human cutaneous melanoma cell line (SK-MEL-28) for 24 hours. After MTT assay, we obtained a cytotoxic concentration-response graph and identified that all tested CUR concentrations (Fig. 1a) decreased tumoral cell viability. However, only 40 μ M concentration decreased cell viability to 50% (nonlinear regression), thus being defined as 50% inhibitory concentration (IC_{50}) in 24 hours.

CUR modulates ecto-enzymes

We found modulation of ecto-enzymes by CUR at concentration of 40 μ M, and VIN at 20 nM. Figure 2 displays results of hydrolysis of ATP (Fig. 2A), ADP (Fig. 2B), AMP (Fig. 2C), and ADA activity (Fig. 2D). No differences regarding ATP and AMP hydrolysis (Fig. 2A and 2C). However, we found different outcomes for the remotion of ADP substrate (Fig. 2B). Whereas VIN increased the hydrolysis of the substrate ($F_{3,4}=61.09$, $p=0.0183$), CUR decreased its decomposition ($F_{3,4}=61.09$, $p=0.0042$). Regarding ADA activity, VIN ($F_{3,6}=8.6$, $p=0.0140$) and CUR+VIN ($F_{3,6}=8.6$, $p=0.0123$) decreased its activity (Fig. 2D) and possibly increased adenosine concentrations.

CUR produces ROS in SK-MEL-28 cells

Regarding oxidative assays (Figure 3), Catalase activity was increased ($F_{3,32}=3.431$, $p=0.0185$) in VIN-treated cells (Fig. 3A), while no statistical difference was observed in the other groups. SOD activity was increased ($F_{3,25}=7.496$, $p=0.0385$) in CUR-treated melanoma cells (Fig 3B), when compared to control cells,

while no statistical difference was detected in the other groups. Increase ($F_{3,38}=5.065$, $p=0.0218$) in protein damage of VIN-treated cells, detected through carbonylation assay (Fig. 3C). No statistical difference was detected in the TBARS assay (Fig. 3D).

There was an increase in the detection of ROS in VIN, CUR, and CUR+VIN groups (Fig. 3E). The highest increase was detected in VIN ($F_{3,14}=44.9$, $p=0.001$) followed by CUR ($F_{3,14}=44.9$, $p=0.001$) (Fig. 3F, G, and H), and CUR+VIN ($F_{3,14}=44.9$, $p=0.0028$).

Discussion

Melanoma is a multifactorial disease process associated with increased oxidative stress and inflammation. *In vivo* and *in vitro* studies demonstrate anti-tumor effects of curcumin against a wide variety of cancers, including of the colon, duodenum, esophagus, stomach, liver, breast, leukemia, oral cavity and prostate [29]. We investigated oxidative stress and activity of ecto-enzymes in SK-MEL-28 cell culture treated and untreated with CUR, VIN, or a combination of both.

CUR, VIN and CUR+VIN increased ROS generation in SK-MEL-28 cells. Even though a marked increase in ROS was detected, no alteration in lipid and protein damage indicators in the cell, other than cells treated with VIN, whose protein carbonylation increased significantly (Fig. 3C, $p=0.0218$). Protein carbonylation in neuroblastoma cells treated with garlic compound has been described [30], and associated with ROS increase after treatment. The cytoskeleton is a dynamic component of the cell as it is involved in the maintenance of cell shape, intracellular trafficking, cell division, cell migration, and adhesion, and it is one of the preferential targets of ROS due to the relatively high abundance of oxidizable residues of its protein constituents. Since vinblastine is known for its antitumoral interaction with cellular tubulin [19], we may hypothesize this protein interaction was involved in the increase of protein carbonylation levels detected

ROS are important molecules involved in cell proliferation and differentiation, whereas a high generation of ROS might damage cellular components [31], promote inflammation, and cause apoptosis. That being said, curcumin could be studied as adjuvant therapy for the treatment of cancer, since it induces apoptosis, generating ROS, and causing oxidative stress in cancer cells. The oxidative stress leads to inflammation at the tumoral microenvironment, thus interacting with purinergic signaling.

Cancer cells have increased ROS level, when compared to healthy cells [32]. Curcumin exerts its antitumoral effects either by scavenging or generating ROS, diminishing ROS at low concentrations or

increasing ROS at high concentrations. [33]. In our work, CUR increased ROS generation, and increased apoptosis (manuscript in preparation). Also, CUR has already been tested on healthy cells, where it didn't cause toxic effects [34].

Hydrolysis of ATP, ADP, and AMP is increased in the blood plasma of patients with prostate cancer when compared to healthy patients, thus producing adenosine [35], and causing immunosuppression [36], cancer cell proliferation, and apoptosis of healthy stromal cells, favoring angiogenesis [37]. VIN increased ADP hydrolysis (Fig. 2B), supposedly diminishing intracellular ADP and increasing AMP, and, therefore, adenosine. The possible increase in adenosine was reinforced by decrease in ADA activity of VIN treatments (Fig. 2D - alone or associated with CUR). An increase of extracellular concentrations of adenosine is linked to tumor progression, chemotaxis, migration, invasion, and metastasis formation [38]. As paradoxical as it seems, since we evaluated the effects during 24 h, further studies are needed to evaluate the effect during longer times. CUR, on the other side, reduced hydrolysis of ADP (Fig. 2B), disrupting the purinergic signaling cascade, and reducing the concentration of AMP (and, by extension, adenosine). This would reduce the immunosuppressive tumoral microenvironment.

High ATP hydrolysis might lead to the formation of large amounts of adenosine, therefore developing immunosuppression [39]. In our work, VIN increased hydrolysis of ADP and reduced ADA activity. This way, VIN might have increased adenosine in the tumoral microenvironment and favored immunosuppression.

Long-lasting extracellular ATP levels were detected after surgical remotion of melanoma, developing a chronic inflammatory microenvironment [40]. In our work, the use of CUR disrupted the purinergic cascade, reducing hydrolysis of ADP, and possibly reducing adenosine concentration in the tumoral microenvironment,

The accumulation of ROS can alter mitochondrial membrane potential and cause apoptosis [41]. Even though no changes in cell damage markers (MDA and carbonyl proteins) were detected, it is possible to imply that the increase in ROS caused inflammation and impaired purinergic signaling in cells treated with CUR. Other studies detected an alteration of oxidative markers using CUR [42,43]. Since we evaluated CUR for 24h, we suppose there was not enough time for a detectable alteration of markers.

In conclusion, CUR increased ROS generation in melanoma cells, and disrupted the purinergic signaling cascade. This increase in ROS may lead to OS and inflammation. In addition, VIN increased the production of ROS and increased adenosine accumulation in cells. CUR has important anti-immunosuppressive effects, so it might be a promising candidate for melanoma treatment, cancer with high incidence and lethality. Further studies are needed to evaluate the dynamics of these enzymes for longer times.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Funding Statement

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Author contributions (mandatory) for all authors

- Substantial contributions to the conception or design of the work: VLL, TVP, CMA.
- Acquisition, analysis, and interpretation of data for the work: VLL, TVP, CEA, VBM, MRC, VMM, and CMA.
- Drafting the work or revising it critically for important intellectual content: VLL, TVP, and CMA.
- Final approval of the version to be published: VLL, and CMA.
- Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved: VLL, and CMA.

References

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209–49.
- [2] Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:776–81.
- [3] Pal HC, Hunt KM, Diamond A, Elmets CA, Afaq F. Phytochemicals for the management of melanoma. *Mini Rev Med Chem* 2016;16:953–79.
- [4] Potrony M, Badenas C, Aguilera P, Puig-Butille JA, Carrera C, Malvehy J, et al. Update in genetic susceptibility in melanoma. *Ann Transl Med* 2015;3:210.

- [5] Mhaidat NM, Alzoubi KH, Khabour OF, Alawneh KZ, Raffee LA, Alsatari ES, et al. Assessment of genotoxicity of vincristine, vinblastine and vinorelbine in human cultured lymphocytes: a comparative study. *Balkan J Med Genet* 2016;19:13–20.
- [6] Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and cancer: Triggers, mechanisms, and consequences. *Immunity* 2019;51:27–41.
- [7] Cumpstey A, Feelisch M. Free Radicals in Inflammation. *Inflammation - From Molecular and Cellular Mechanisms to the Clinic*, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2017, p. 695–726.
- [8] Elias Assmann C, Stefanello N, Bianchin Bottari N, Baldissarelli J, Rosa Chitolina Schetinger M, Maria Melchior Morsch V, et al. Crosstalk between the purinergic and immune systems: Implications for the glutathione antioxidant system in health and disease. In: Bagatini MD, editor. *Glutathione System and Oxidative Stress in Health and Disease*, Londres, England: IntechOpen; 2020.
- [9] Sek K, Mølck C, Stewart GD, Kats L, Darcy PK, Beavis PA. Targeting adenosine receptor signaling in cancer immunotherapy. *Int J Mol Sci* 2018;19:3837.
- [10] Zou Z, Chang H, Li H, Wang S. Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for cancer therapy. *Apoptosis* 2017;22:1321–35.
- [11] Huang MT, Wang ZY, Georgiadis CA, Laskin JD, Conney AH. Inhibitory effects of curcumin on tumor initiation by benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis* 1992;13:2183–6.
- [12] Conney AH, Lysz T, Ferraro T, Abidi TF, Manchand PS, Laskin JD, et al. Inhibitory effect of curcumin and some related dietary compounds on tumor promotion and arachidonic acid metabolism in mouse skin. *Adv Enzyme Regul* 1991;31:385–96.
- [13] Aggarwal BB, Sethi G, Baladandayuthapani V, Krishnan S, Shishodia S. Targeting cell signaling pathways for drug discovery: an old lock needs a new key. *J Cell Biochem* 2007;102:580–92.
- [14] Araújo CC, Leon LL. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:723–8.
- [15] Sethi P, Jyoti A, Hussain E, Sharma D. Curcumin attenuates aluminium-induced functional neurotoxicity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;93:31–9.
- [16] De R, Kundu P, Swarnakar S, Ramamurthy T, Chowdhury A, Nair GB, et al. Antimicrobial activity of curcumin against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:1592–7.

- [17] Jaques JA dos S, Rezer JFP, Gonçalves JF, Spanevello RM, Gutierrez JM, Pimentel VC, et al. The effect of curcumin in the ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of cigarette smoke-exposed rats: SYNAPTOSOMAL ENZYME ACTIVITIES AND CURCUMIN. *Cell Biochem Funct* 2011;29:703–7.
- [18] Palma TV, Lenz LS, Bottari NB, Pereira A, Schetinger MRC, Morsch VM, et al. Berberine induces apoptosis in glioblastoma multiforme U87MG cells via oxidative stress and independent of AMPK activity. *Mol Biol Rep* 2020;47:4393–400.
- [19] Selimovic D, Badura HE, El-Khattouti A, Soell M, Porzig BBOW, Spernger A, et al. Vinblastine-induced apoptosis of melanoma cells is mediated by Ras homologous A protein (Rho A) via mitochondrial and non-mitochondrial-dependent mechanisms. *Apoptosis* 2013;18:980–97.
- [20] Lunkes GI, Lunkes D, Stefanello F, Morsch A, Morsch VM, Mazzanti CM, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb Res* 2003;109:189–94.
- [21] Heymann D, Reddington M, Kreutzberg GW. Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. *J Neurochem* 1984;43:971–8.
- [22] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [23] Bottari NB, Pillat MM, Schetinger MRC, Reichert KP, Machado V, Assmann CE, et al. Resveratrol-mediated reversal of changes in purinergic signaling and immune response induced by *Toxoplasma gondii* infection of neural progenitor cells. *Purinergic Signal* 2019;15:77–84.
<https://doi.org/10.1007/s11302-018-9634->
- [24] Spitz DR, Oberley LW. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem* 1989;179:8–18.
- [25] McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244:6049–55.
- [26] Keller A, Mohamed A, Dröse S, Brandt U, Fleming I, Brandes RP. Analysis of dichlorodihydrofluorescein and dihydrocalcein as probes for the detection of intracellular reactive oxygen species. *Free Radic Res* 2004;38:1257–67.
- [27] Jentsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:251–6.

- [28] Martins CC, Bagatini MD, Simões JLB, Cardoso AM, Baldissarelli J, Dalenogare DP, et al. Increased oxidative stress and inflammatory markers contrasting with the activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway in patients with metabolic syndrome. *Clin Biochem* 2021;89:63–9. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2020.12.007>.
- [29] Fujii T, Minagawa T, Shimizu T, Takeguchi N, Sakai H. Inhibition of ecto-ATPase activity by curcumin in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *J Physiol Sci* 2012;62:53–8.
- [30] Aquilano K, Vigilanza P, Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. Tau dephosphorylation and microfilaments disruption are upstream events of the anti-proliferative effects of DADS in SH-SY5Y cells. *J Cell Mol Med* 2010;14:564–77.
- [31] Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:579–91.
- [32] Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, Thayyullathil F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radic Biol Med* 2017;104:144–64. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.004>.
- [33] Chen J, Wanming D, Zhang D, Liu Q, Kang J. Water-soluble antioxidants improve the antioxidant and anticancer activity of low concentrations of curcumin in human leukemia cells. *Pharmazie* 2005;60:57–61.
- [34] Syng-Ai C, Kumari AL, Khar A. Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2. *Mol Cancer Ther* 2004;3:1101–8.
- [35] Gardani CFF, Cappellari AR, de Souza JB, da Silva BT, Engroff P, Moritz CEJ, et al. Hydrolysis of ATP, ADP, and AMP is increased in blood plasma of prostate cancer patients. *Purinergic Signal* 2019;15:95–105.
- [36] Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol* 2012;33:231–7.
- [37] Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer* 2013;13:842–57.
- [38] Mandapathil M. Adenosine-mediated immunosuppression in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *HNO* 2016;64:303–9.

- [39] Manica A, Da Silva AM, Cardoso AM, Moreno M, Leal DB, Dutra Da Silva A, et al. High levels of extracellular ATP lead to chronic inflammatory response in melanoma patients. *J Cell Biochem* 2018;119:3980–8.
- [40] Mânica A, da Silva Rosa Bonadiman B, Cardoso AM, Paiz A, Siepko C, de Souza JVG, et al. The signaling effects of ATP on melanoma-like skin cancer. *Cell Signal* 2019;59:122–30.
- [41] Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev* 2014;94:909–50.
- [42] Moradi-Marjaneh R, Hassanian SM, Rahmani F, Aghaee-Bakhtiari SH, Avan A, Khazaei M. Phytosomal curcumin elicits anti-tumor properties through suppression of angiogenesis, cell proliferation and induction of oxidative stress in colorectal cancer. *Curr Pharm Des* 2018;24:4626–38. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190110145151>.
- [43] Larasati YA, Yoneda-Kato N, Nakamae I, Yokoyama T, Meiyanto E, Kato J-Y. Curcumin targets multiple enzymes involved in the ROS metabolic pathway to suppress tumor cell growth. *Sci Rep* 2018;8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20179-6>.

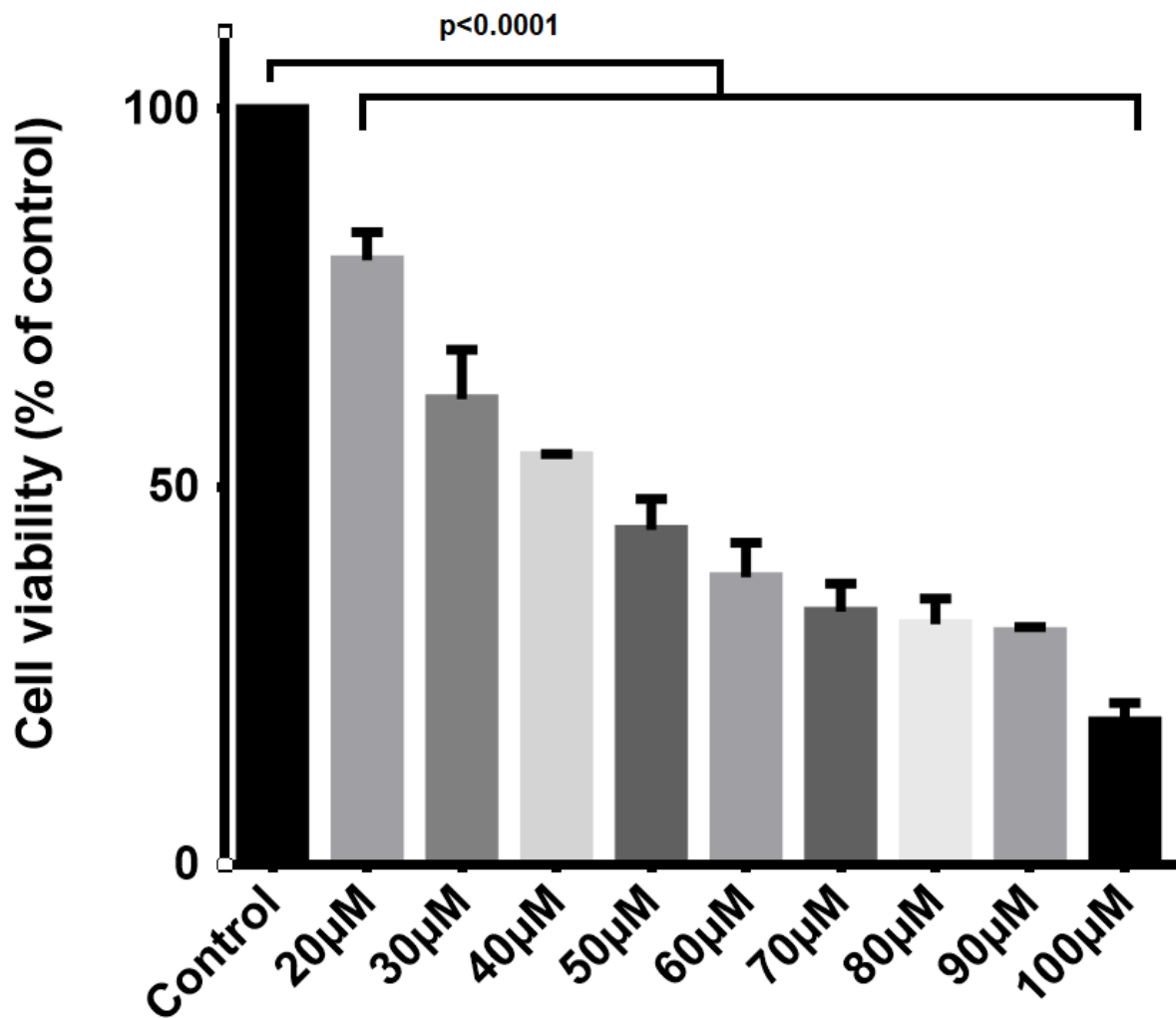


Fig. 1. MTT assay demonstrated decreased viability of SK-Mel-28 cells after exposure to increasing concentrations of CUR (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 and 100 μM) for 24 h. 40 μM concentration was statistically different of 20 μM ($p=0.0001$), 50 μM ($p=0.035$), 60 μM ($p=0.0004$), and higher tested concentrations ($p=0.0001$). One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test: $F_{9, 23} = 121.4$; $n=33$. Data shown as mean \pm SD.

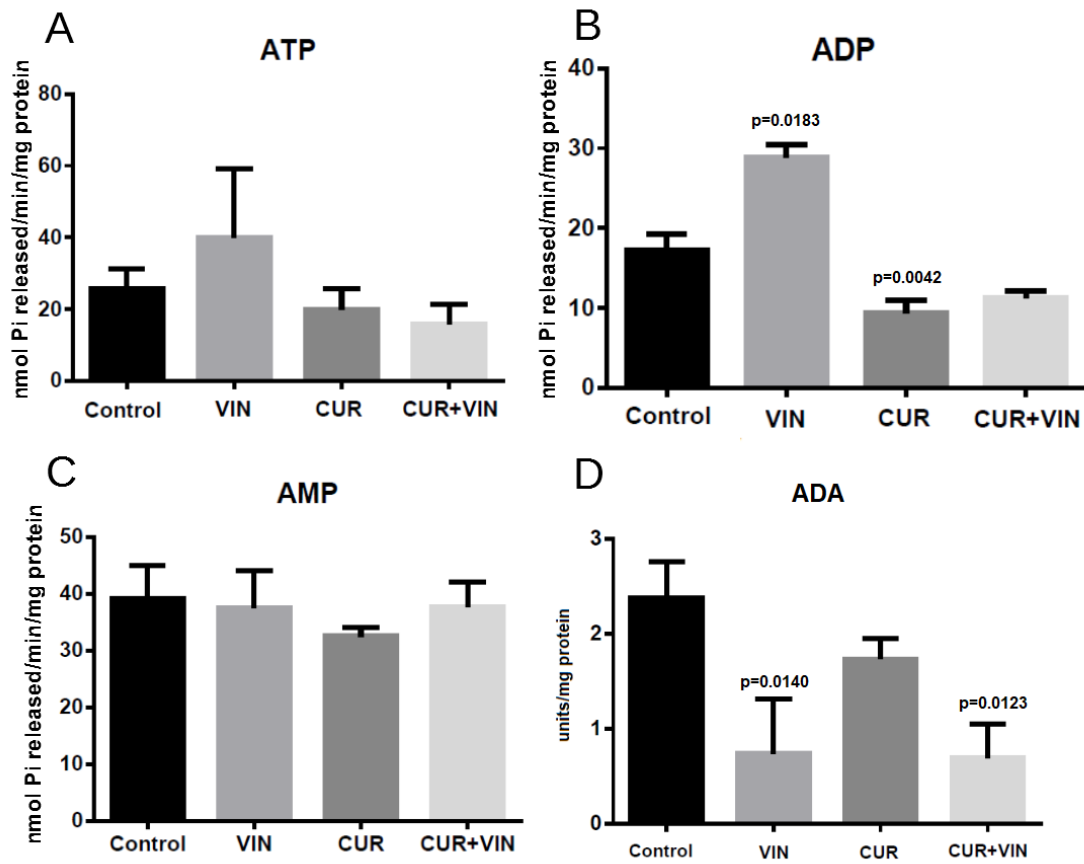


Fig. 2. ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis by E-NTPDase and E-5'- nucleotidase and adenosine deamination (D) in SK-MEL-28 cells after 24 h treatment with, 20 nM of vinblastine (VIN), 40 μ M curcumin (CUR), or a combination of both (CUR+VIN). Enzyme-specific activities reported as nmol of Pi released/min/mg of protein. Enzyme activities are reported as U/mg protein. Variables were expressed as mean \pm standard error of the mean (SD). Data are shown as mean \pm SD. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test (A - n=9; B - n=8; C - n=9; D - n=10).

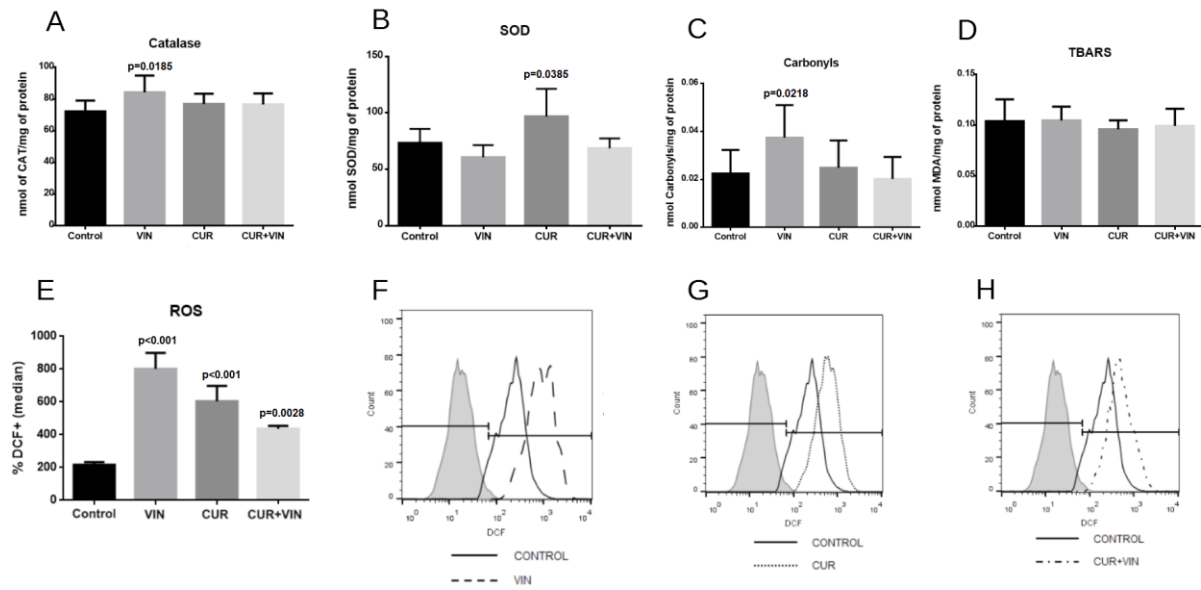


Fig. 3 (a) Catalase (CAT) and (b) SOD activities in SK-MEL-28 cells after exposure to 20 nM of vinblastine (VIN), 40 μ M curcumin (CUR), or a combination of both for 24 h. (c) Protein carbonylation, (d) TBARS, and (e) ROS production after 24 h treatment with, 20 nM of vinblastine (VIN), 40 μ M curcumin (CUR), and a combination of both (CUR+VIN). Histogram presentation of gated cells in DCFH assay of ROS quantification by flow cytometry in cells treated with CUR (F), VIN (G), and CUR+VIN (H) for 24 h. The continuous line represents untreated SK-MEL-28 cells (control). Data are shown as mean \pm SD, representative for three independent experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test

CAPÍTULO I – MANUSCRITO II – CURCUMIN AND VINBLASTINE INDUCE APOPTOSIS AND IMPAIR MIGRATION IN HUMAN CUTANEOUS MELANOMA CELLS.

Artigo aceito para publicação no periódico *Research, Society and Development*.

Curcumin and vinblastine induce apoptosis and impair migration in human cutaneous melanoma cells

Vinícius Leobet Lunkes*^a, Taís Vidal Palma^b, Charles Elias Assmann^b, Moisés Henrique Mastella^b, Vitor Bastianello Mostardeiro^b, Maria Rosa Chitolina^b, Vera Maria Morsch^b, Ivana Beatrice Manica Da Cruz^c, Micheli Mainardi Pillat^c, Cinthia Melazzo de Andrade^{a,*}

^a Postgraduate Program in Veterinary Medicine, Center for Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

^b Postgraduate Program in Biological Sciences: Biochemistry Toxicological, Department of Chemistry, Center for Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

* To whom correspondence should be addressed: Vinícius Leobet Lunkes or Cinthia Melazzo de Andrade, Ph.D. Department of Small Animal Clinic, Center of Rural Sciences Federal University of Santa Maria-RS, Room 121, Veterinary Hospital Building, Roraima Avenue n° 1000, Santa Maria, RS 97105900, Brazil. Fax number: +55-55-3220-8814;

Abstract

Cancer is an important cause of lethality, and melanoma skin cancer is associated with high metastasis and prognostic with metastatic disease is reserved, with less than 10% of survival. Curcumin (CUR), also known as diferuloylmethane, is a substance extracted from *Curcuma longa* rhizomes, and extensively studied in many diseases, producing a variety of effects. The traditional treatment includes the use of vinblastine (VIN), and it is associated with many side effects. The present study investigated the role of various cellular pathways concerning apoptosis, cell cycle enzymes in melanoma cell line SK-MEL-8, after treatment with CUR, VIN, or a combination of both, for 24 hours. After this, we performed cell cycle, apoptosis, wound healing assay, comet assay on cells, and evaluated nitrite accumulation (nitric oxide (NO[•]) byproduct). CUR increased cells in apoptosis and reduced the number of cells in the G1 phase of the cell cycle. VIN increased the production of nitrite, and cells in early apoptosis, mainly through the inducement of DNA damage. Cell migration was impaired in all tested groups. In conclusion, CUR has important effects, impairing cell migration, producing NO[•], and promoting apoptosis of tumoral cells. VIN also prejudicated cell migration and increased levels of NO[•]. This indicates CUR might be included as an adjuvant compound in the treatment of melanoma. CUR might be a novel compound to help treatment of melanoma, and further studies are needed, especially regarding the synergistic effect of CUR and VIN in the treatment of melanoma.

Keywords: Melanoma; Curcumin; Apoptosis; Migration.

Introduction

Cancer has a high worldwide incidence and lethality [1]. Melanoma skin cancer is associated with high metastasis and prognostic with metastatic disease is reserved, less than 10% survival [2]. With this in mind, it's important to evaluate adjuvant substances, that might help during the treatment. Curcumin (CUR), also known as diferuloylmethane, is a substance extracted from *Curcuma longa* rhizomes, and extensively studied in many cancer diseases [3]. It interacts with a high range of proteins and pathways, producing different effects, like inhibition of cell proliferation, invasion, and metastasis [4].

CUR causes tumoral inhibition by inducing cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer cells [5]. CUR also modulates production of nitric oxide (NO[•]) and DNA cell damage, as indicated by comet assay [6].

Nitric oxide is a free radical inorganic signaling molecule that is generated via multiple mechanisms, and in melanoma cell lines, the inducible NO[•] synthase (iNOS) is overexpressed [7,8]. Antitumor effects of NO[•] were also recorded in different human and animal tumors [9,10], as higher levels of NO[•] tend to be cytotoxic to cancer cells. This is achieved by the formation of peroxynitrite, which acts as an inducer of apoptosis and other toxic species during immune surveillance.

Vinblastine (VIN) is a chemotherapeutic agent used in treatment of melanoma and other diseases, inhibiting angiogenesis and targeting cellular tubulins [11], impairing tumoral development and reducing metastatic dissemination. Although vinblastine is a common drug used to treat many types of cancer, it is associated with many side effects, like nausea, vomiting, and headaches [12].

Considering the high incidence and lethality of melanoma, the necessity for new adjuvant substances is evident. Thus, the present study investigates the role of cellular pathways regarding apoptosis, cell cycle, DNA damage, cell migration, and NO[•] accumulation in melanoma cell line SK-MEL-28 treated with CUR and/or VIN.

Materials and methods

Cell line and cell culture

SK-MEL-28 human metastatic melanoma cell line (ATCC® HTB-72™) was maintained in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Life Technologies) culture medium plus 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 10% cell culture tested fetal bovine serum (FBS). The cells were incubated in a cell culture incubator at 37°C, 5% CO₂ atmosphere, and 95% humidity. The culture medium was renewed 2 to 3 times per week.

Preparation of the CUR solution

A previous study published by our group evaluated the concentration that caused 50 % inhibition of cell viability (IC₅₀) of curcumin as 40 µM, and therefore that concentration was used in subsequent assays. To compare the effects of CUR to treatment, we used vinblastine

(VIN) at 20 nM [13], and a combination of CUR and VIN (40 μ M and 20 nM, respectively). The quantity of DMSO in the medium was less than 0.1%.

Wound healing assay

SK-MEL-28 cells were cultured in a 12-well plate. After cells reached almost 100% confluency, the supernatant was removed, and yellow pipette tips were used to scratch the cell surface. The cells were washed with PBS to remove debris and treated with DMEM (negative control), CUR, VIN, and CUR+VIN for 24h. The scratched area was photographed with a microscope at 0 h and 24 h of treatment. The experiment was repeated twice. The quantification of the results represents three times for cell scratch assays. The area of the scratch of the negative control (DMEM) was set as 100%, and areas of scratches of treated wells were proportionally compared to control, using ImageJ software.

Cell cycle determination

SK-MEL-28 cells were cultured in 12-well plates (2×10^4 cells/well). After the treatment with DMEM (negative control), CUR, VIN, and CUR+VIN, supernatants were discarded, and cells were removed from the wells with a trypsin/EDTA solution (0.2%/0.02%). The action of the trypsin was neutralized with the addition of a culture medium with 10% FBS. Subsequently, the samples were centrifuged (1,500g), the supernatant was discarded, and the samples were then fixed and permeabilized by adding 75% ice-cold ethanol. After that, samples were centrifuged, and the pellet was resuspended with 500 μ L of DNA-staining solution with PBS (0.1% Triton, 0.5% Tween, 10 μ g/mL propidium iodide). The samples were incubated for 1 h and analyzed in a flow cytometer.

Evaluation of apoptosis by quantification of annexin and propidium iodide by flow cytometry

For apoptosis assays of SK-MEL-28 cells in the presence of CUR, VIN, or CUR+VIN cultured in 12-well plates (2×10^5 cells/well) were used. After the treatment period, the supernatant was discarded, the cells were removed from the wells with a trypsin/EDTA solution (0.2%/0.02%). The action of trypsin was neutralized with the addition of a medium with 10% FBS. Subsequently, cells were centrifuged, supernatants discarded, and cell pellets were resuspended with 200 μ L of binding buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2 and 1 μ L Annexin-V; BD Biosciences, CAT: 559763). The samples were incubated on ice for 30 min, plus propidium iodide and immediately analyzed in a flow cytometer.

Nitrite in supernatants

The accumulation of nitrite (a stable end product of NO[•]) in supernatants of control and treated (CUR, VIN, and CUR+VIN) cells was determined using the Griess reagent in 96-well plates. The supernatant was mixed with an equal volume of Griess reagent (1% sulphaniamide, 0.01% naphthyl ethylenediamine dihydrochloride, and 2.5% phosphoric acid). The color developed after 15 min incubation was measured at 540 nm. Absorbance in the untreated control was set to 100%, and absorbance in other wells was proportionally calculated to control.

Alkaline Comet Assay

The alkaline comet assay was performed [14] and subsequently stained with silver nitrate technique [15] Briefly, the samples were initially resuspended in 0.7% low melting point agarose and placed on glass slides previously covered with 1% agarose, and the slides were dipped into a lysis solution at 4 ° C. In the electrophoresis stage, the slides were placed in a horizontal vat and covered with a solution of 1 mM EDTA and 300 mM NaOH (pH> 13) for 20 min. Then, an electric current of 300 A at 25 V was applied for 20 min. After electrophoresis, the slides went through the stages of neutralization, fixation, and subsequent staining with silver nitrate. For the analysis, a standardized damage score was used, ranging from the lowest damage (0) to the maximum damage (4), and the results were expressed as a damage index relative to the control. The samples were processed in duplicates, and all slides were analyzed by at least two trained observers.

Statistical analysis

Data were analyzed by Graph Pad Prism software (version 6 Prism), one or two-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test. Differences between mean values were considered significant at $p \leq 0.05$. Data are shown as mean values \pm SD, a representative for three independent experiments.

Results

CUR and CUR+VIN impair migration of SK-MEL-28 cells

To verify if CUR and VIN could alter cell migration, a wound-healing assay was performed. CUR or VIN significantly reduced wound area (Figure 1), through inhibition of cell migration. The scratches were significantly ($p \leq 0.05$) wider in the CUR and VIN

treatments (Figure 1). These results suggest that curcumin significantly inhibited the migration of SK-MEL-28 cells.

CUR induces cell cycle arrest in the G1-phase of SK-MEL-28 cells

To determine whether treatments might influence the proliferation of SK-MEL-28, frequencies (%) of cells in different phases of the cell cycle were determined by flow cytometry (Figure 2A). CUR at a concentration of 40 μ M decreased percentages of cells in G1 compared to untreated controls. Percentages of cells in S and G2-phase did not change.

CUR and CUR+VIN induce apoptotic death in SK-MEL-28 cells

For evaluation of apoptosis-like cell death, Annexin V and Propidium Iodide (PI) were markers. Vinblastine caused an accumulation of cells in early apoptosis when compared to untreated controls. 40 μ M of CUR during 24 h in SK-MEL-28 cells promoted early apoptosis (Annexin+/PI- cells) compared to control samples. Also, there was an increase in cells in late apoptosis (Annexin+/PI+cells) in cells treated with CUR+VIN. Regarding cell death, there was a significant increase in dead cells in cells treated with CUR (40 μ M) (Figure 2B).

CUR and VIN increased accumulation of nitrite in cell culture medium

Since nitric oxide is a very unstable molecule, we evaluated the accumulation of nitrite in supernatants, since this substance is stable. After 24h of treatment with CUR, VIN or CUR+VIN, supernatants of these cells were collected and nitrite accumulation was measured and compared proportionally to untreated control cell supernatants. In this sense, CUR and VIN significantly increased nitrite in supernatants, compared to untreated controls (Figure 3A).

VIN and CUR+VIN increased DNA damage

To evaluate DNA damage in melanoma cells treated and untreated, a comet assay was performed. We detected a significant increase in DNA damage in cells treated with VIN and CUR+VIN (Figure 3B).

Discussion

In 2019, cancer was the second leading cause of death in the world, overcome only by cardiovascular disease [16]. In this context, cutaneous melanoma, despite its low incidence, is a malignant neoplasm with a high degree of metastasis, and low responsiveness to traditional

treatments. Recently, several substances used in traditional cookery are being studied as possible adjuvants in the treatment of cancer. Thus, curcumin (CUR), a compound extracted from the rhizomes of *Curcuma longa*, has been studied in tumor cell cultures of various origins in which it has reduced tumor cell viability and caused cell death by apoptosis, modulating cell signaling pathways [17], like in breast cancer, oral cancer, and skin cancer [18]. Our results indicate a possible beneficial effect of curcumin in the SK-MEL-28 melanoma cell line.

Studies in human oral [19], colorectal [20], and cervical [21] cancers have shown that CUR induces G2-phase cell cycle arrest. Our results show that CUR treatment resulted in the accumulation of cells in the G2/M phase with the reduction from the G0/G1 phase, so curcumin might have caused cell-cycle arrest at the G2/M phase, even though there was no statistical significance. Our results suggest that curcumin could block cells in the S phase, thus preventing DNA from replicating properly, and inhibiting tumor growth. It has been reported that anticancer agents can arrest the cancer cell cycle regulation at the G0/G1, S, or G2/M phase which leads to the induction of apoptosis [22], so we hypothesize that just as happened with VIN, CUR might have promoted the same cell cycle arrest effect in these cells.

To determine if CUR concentration was only preventing stopping the cell cycle, or also causing cell death, we performed an apoptosis assay by flow cytometry. We detected a significant increase in cells in late apoptosis when treated with 40 μ M CUR for 24 h (**** $p \leq 0.001$). Also, cells in early apoptosis increased too when treated with VIN. These results indicate cells died when treated with CUR or VIN.

There was an increase in cells in late apoptosis when treated with a combination of CUR and VIN, so we may hypothesize this combination would also be beneficial to cells. The beneficial effects of the combination of CUR and commonly used cancer therapies might be due to synergistic effects, promoting tumoral cell apoptosis through many pathways [23].

In our study, curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis when SK-MEL-28 cells were treated for 24 hours with 40 μ M of curcumin. Moreover, it induced cell cycle arrest and reduced tumoral cell migration. CUR and VIN impaired cell migration in the scratch assay. The same effect was detected in human osteosarcoma cells treated with vinblastine [24]. VIN impairs microtubule growth, necessary for cell migration [25]. CUR also impairs cell microtubule, inducing arrest at pause state [26]. This emphasizes the importance of the evaluation of CUR in the treatment of melanoma.

To verify if DNA damage could be involved in this apoptosis induction, we performed the alkaline comet assay. Previous studies indicate detrimental effects of VIN in DNA, thus favoring tumoral apoptosis [27]. VIN might have damaged DNA, thus promoting apoptosis.

Since nitric oxide (NO[•]) is an important substance in the tumoral microenvironment, we measured this substance next. NO[•] has a very short living and reacts with a wide array of substances, its measurement is challenging, so we measured one of its byproducts, the nitrite. NO[•] is a signaling molecule, and its importance relies on free radical formation and activation of signaling pathways [28]. Higher levels of NO[•] may induce DNA damage and cause apoptosis, but lower levels are linked to chemoresistance [29,30]. We detected an increase in nitrite production in cells treated with VIN and CUR. This might indicate an increase in the production of NO[•] (and its byproduct nitrate). We may hypothesize this increase might be toxic to cancerous cells, promoted DNA damage, and cell death.

In conclusion CUR has important effects, impairing cell migration, producing NO[•], and promoting apoptosis of tumoral cells. This indicates CUR might be evaluated as adjuvant compound in treatment of melanoma. In addition, VIN also impaired cell migration and increased levels of NO[•]. This synergistic effect of CUR and VIN can help in the treatment of melanoma.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 .

References

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209–49.
- [2] Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual: Melanoma Staging: *AJCC 8th Edition*. *CA Cancer J Clin* 2017;67:472–92.

- [3] Willenbacher E, Khan S, Mujica S, Trapani D, Hussain S, Wolf D, et al. Curcumin: New insights into an ancient ingredient against cancer. *Int J Mol Sci* 2019;20:1808.
- [4] Hassanalilou T, Ghavamzadeh S, Khalili L. Curcumin and gastric cancer: A review on mechanisms of action. *J Gastrointest Cancer* 2019;50:185–92.
- [5] Hu S, Xu Y, Meng L, Huang L, Sun H. Curcumin inhibits proliferation and promotes apoptosis of breast cancer cells. *Exp Ther Med* 2018. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6345>.
- [6] Longobardi C, Damiano S, Andretta E, Prisco F, Russo V, Pagnini F, et al. Curcumin modulates nitrosative stress, inflammation, and DNA damage and protects against ochratoxin A-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Antioxidants (Basel)* 2021;10:1239.
- [7] Joshi M, Strandhoy J, White WL. Nitric oxide synthase activity is up-regulated in melanoma cell lines: a potential mechanism for metastases formation. *Melanoma Res* 1996;6:121–6.
- [8] Grimm EA, Sikora AG, Ekmekcioglu S. Molecular pathways: inflammation-associated nitric-oxide production as a cancer-supporting redox mechanism and a potential therapeutic target. *Clin Cancer Res* 2013;19:5557–63.
- [9] Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review. *World J Surg Oncol* 2013;11:118.
- [10] Vahora H, Khan MA, Alalami U, Hussain A. The potential role of nitric oxide in halting cancer progression through chemoprevention. *J Cancer Prev* 2016;21:1–12.
- [11] Mhaidat NM, Alzoubi KH, Khabour OF, Alawneh KZ, Raffee LA, Alsatari ES, et al. Assessment of genotoxicity of vincristine, vinblastine and vinorelbine in human cultured lymphocytes: a comparative study. *Balkan J Med Genet* 2016;19:13–20. ,
- [12] Lee C-T, Huang Y-W, Yang C-H, Huang K-S. Drug delivery systems and combination therapy by using vinca alkaloids. *Curr Top Med Chem* 2015;15:1491–500.
- [13] Selimovic D, Badura HE, El-Khattouti A, Soell M, Porzig BBOW, Spernger A, et al. Vinblastine-induced apoptosis of melanoma cells is mediated by Ras homologous A protein (Rho A) via mitochondrial and non-mitochondrial-dependent mechanisms. *Apoptosis* 2013;18:980–97.
- [14] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184–91.
- [15] Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem* 2001;49:1183–6.
- [16] GLOBAL BURDEN OF DISEASE COLLABORATIVE NETWORK. GBD Results tool. Seattle, 2020. Available at: < <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool> >. Accessed: 9 jul. 2021.
- [17] Hu S, Xu Y, Meng L, Huang L, Sun H. Curcumin inhibits proliferation and promotes apoptosis of breast cancer cells. *Exp Ther Med* 2018. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6345>.
- [18] Paul S, Sa G. Curcumin as an adjuvant to cancer immunotherapy. *Front Oncol* 2021;11:675923.
- [19] Zhen L, Fan D, Yi X, Cao X, Chen D, Wang L. Curcumin inhibits oral squamous cell carcinoma proliferation and invasion via EGFR signaling pathways. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7:6438–46.
- [20] Pricci M, Girardi B, Giorgio F, Losurdo G, Ierardi E, Di Leo A. Curcumin and colorectal cancer: From basic to clinical evidences. *Int J Mol Sci* 2020;21:2364.

- [21] Ghasemi F, Shafiee M, Banikazemi Z, Pourhanifeh MH, Khanbabaie H, Shamshirian A, et al. Curcumin inhibits NF- κ B and Wnt/ β -catenin pathways in cervical cancer cells. *Pathol Res Pract* 2019;215:152556.
- [22] Garrett MD, Collins I. Anticancer therapy with checkpoint inhibitors: what, where and when? *Trends Pharmacol Sci* 2011;32:308–16.
- [23] Tan BL, Norhaizan ME. Curcumin combination chemotherapy: The implication and efficacy in cancer. *Molecules* 2019;24:2527.
- [24] Wang X, Decker CC, Zechner L, Krstin S, Wink M. In vitro wound healing of tumor cells: inhibition of cell migration by selected cytotoxic alkaloids. *BMC Pharmacol Toxicol* 2019;20:4.
- [25] Dhamodharan R, Jordan MA, Thrower D, Wilson L, Wadsworth P. Vinblastine suppresses dynamics of individual microtubules in living interphase cells. *Mol Biol Cell* 1995;6:1215–29.
- [26] Banerjee M, Singh P, Panda D. Curcumin suppresses the dynamic instability of microtubules, activates the mitotic checkpoint and induces apoptosis in MCF-7 cells: Curcumin suppresses microtubule dynamics. *FEBS J* 2010;277:3437–48.
- [27] Tiburi M, Reguly ML, Schwartzmann G, Cunha KS, Lehmann M, de Andrade HHR. Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2002;519:141–9.
- [28] Yarlagadda K, Hassani J, Foote IP, Markowitz J. The role of nitric oxide in melanoma. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2017;1868:500–9.
- [29] Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review. *World J Surg Oncol* 2013;11:118.
- [30] Vahora H, Khan MA, Alalami U, Hussain A. The potential role of nitric oxide in halting cancer progression through chemoprevention. *J Cancer Prev* 2016;21:1–12.

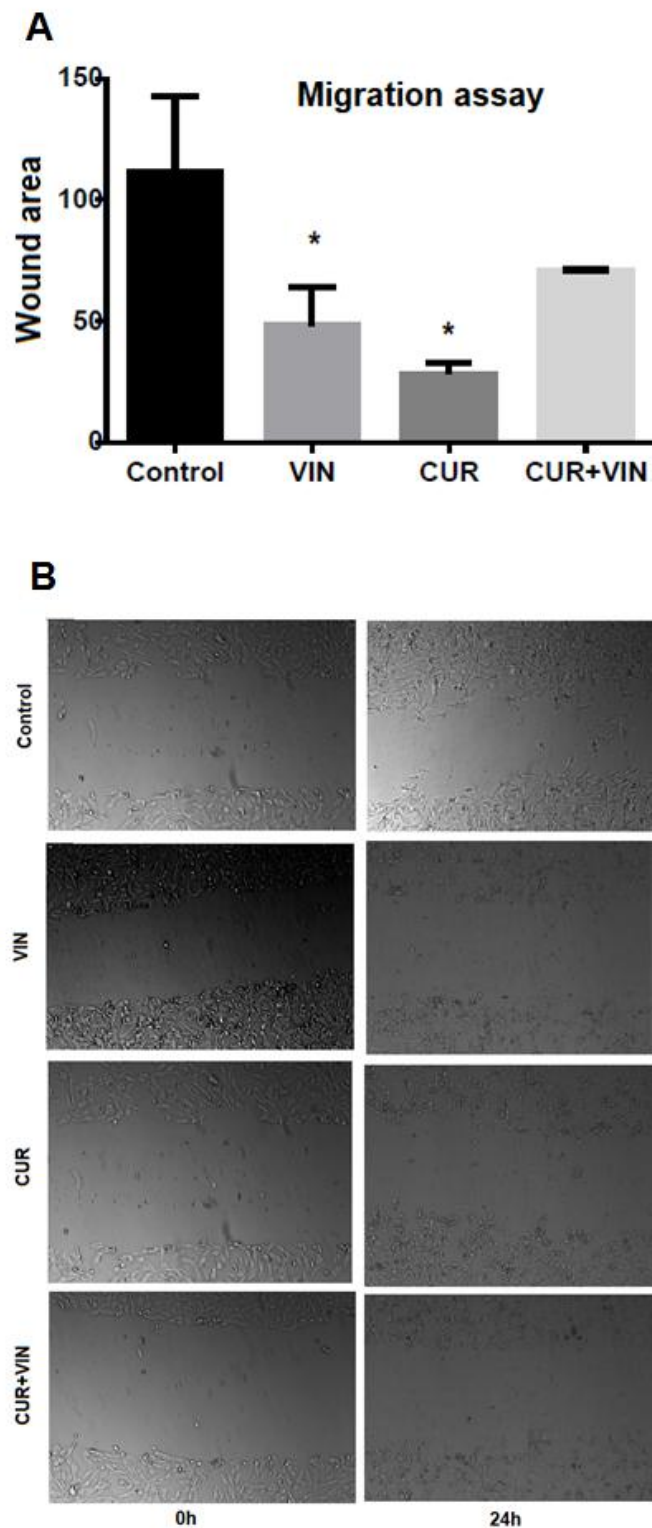


Figure1. (A) Wound healing assay demonstrated decreased migration of SK-Mel-28 cells after exposure to CUR (40 μ M) for 24 h, or VIN (20 nM). Data are shown as mean \pm SD, “*” represents a significant difference of $P \leq 0.05$. (B) Representative images of wound healing assay following exposure of CUR, VIN, and CUR+VIN on SK-MEL-28 cells for 24 hours. wound healing capacity. Magnification, x400.

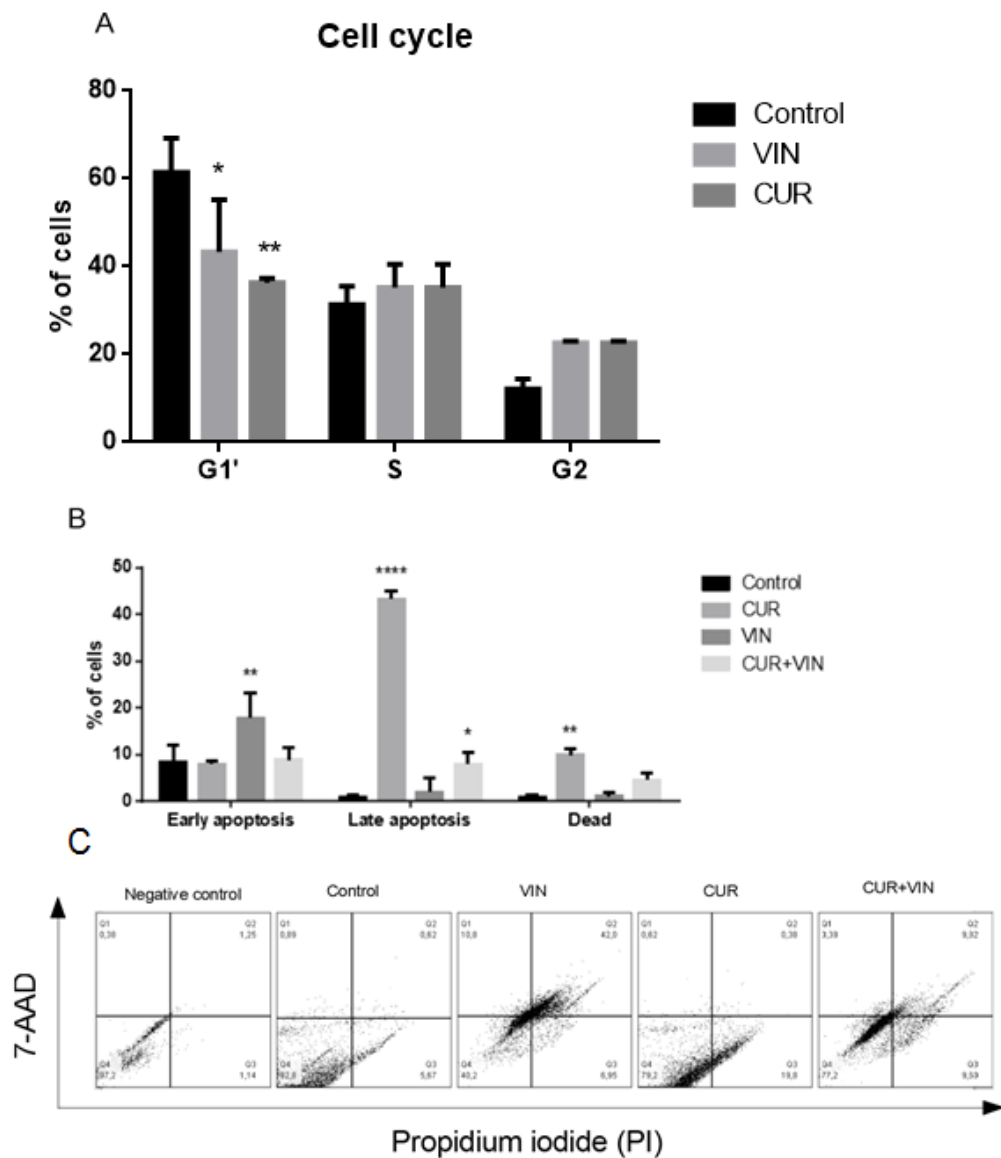


Figure 2 . (A) Cell cycle arrest effects of CUR, VIN, and CUR+VIN in SK-MEL-28 cells for 24 hours. Graphs represent the percentage of cell cycle distribution at the G1, S and G2 phases.. Data are presented as the mean \pm SD. “*” and “**” represent a significant difference of $p \leq 0.05$ and ≤ 0.01 , respectively. (B) Evaluation of apoptosis after 24 h of treatment with CUR, VIN, or CUR+VIN in SK-MEL-28 cells for 24 hours. Quantification by flow cytometry of the percentage of cells in apoptosis and cell death. (C) Dot-plot of the treatments' effects on cell apoptosis. . Data are shown as mean \pm SD, a representative for three independent experiments, “*”, “**”, and “****” represent a significant difference of $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, and $p \leq 0,001$, respectively.

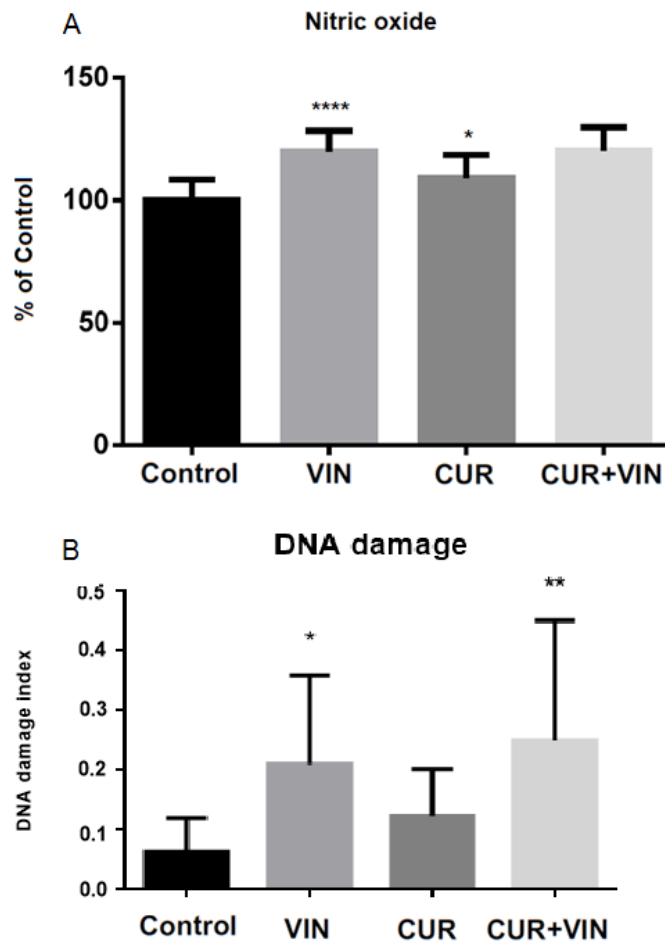


Figure 3. (A) Accumulation of nitrate in the supernatant of cells treated with CUR, VIN, or CUR+VIN for 24 hours. Data are shown as mean \pm SD, a representative for three independent experiments, “*” and “****” represent a significant difference of $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.001$, respectively (B) DNA damage of SK-MEL-28 cells treated with CUR, VIN, or CUR+VIN for 24 hours. Data are shown as mean \pm SD, a representative for three independent experiments, “*” and “**” represent a significant difference of $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.01$, respectively.

4 DISCUSSÃO

O câncer é uma doença que apresenta grande variabilidade de quadros clínicos e evoluções. Nesse sentido o melanoma se destaca, pois é uma neoplasia com alta malignidade e potencial de metástase. Assim, a busca por novas substâncias que auxiliem no tratamento tem sido alvo de muitos trabalhos.

A curcumina, que é uma destas substâncias, é extraída da cúrcuma e tem sido estudada em uma ampla gama de doenças humanas e animais, em que tem apresentado resultados promissores. A cúrcuma, também conhecida como açafraão-da-terra ou *turmeric* (em inglês), é um tempero tradicionalmente utilizado na culinária da Índia e Indonésia, sendo produzido a partir dos rizomas da planta *Curcuma longa* e caracteriza-se pela coloração amarelada. Em relação ao câncer, a curcumina está sendo estudada em várias situações, tanto como tumores de órgãos sólidos, como fígado e próstata, como em órgãos ocos, como intestino e estômago. Assim, aceita-se que a curcumina apresente uma ampla gama de efeitos benéficos ao organismo, como efeito apoptótico, antiproliferativo e antitumoral.

Nesse contexto, surge o questionamento: poderia a curcumina ser empregada como aliada ao tratamento do melanoma em pequenos animais? Considerando que não temos acesso a uma linhagem celular de melanoma canino, desenvolvemos este projeto de pesquisa para avaliar o efeito da adição da curcumina em células de melanoma humano da linhagem SK-MEL-28 em relação a vias de sinalização celular. A fim de comparar esse efeito com o tratamento realizado com medicamentos quimioterápicos, utilizamos a vimblastina, medicamento inibidor da mitose por interferência nos microtúbulos celulares. A vimblastina também é uma substância de origem natural, sendo extraída da planta conhecida como vinca-de-gato (*Catharanthus roseus*) e natural de Madagascar. A partir dessa planta podem ser extraídos vários agentes antineoplásicos, como a vimblastina e a vincristina, conhecidos coletivamente como alcaloides da vinca.

No MANUSCRITO I detectamos a inibição da hidrólise do ADP, mediada pela curcumina. A vimblastina, por sua vez, aumentou a hidrólise do ADP. Foi detectado aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas células em que houve adição de curcumina, vimblastina ou ambos. Nesse contexto, o aumento das ERO pode causar estresse oxidativo e promover o início da cascata da apoptose, por meio da ativação da via intrínseca. Assim,, mais estudos são necessários para elucidar quais os efeitos desse aumento das espécies reativas de oxigênio no microambiente tumoral.

No MANUSCRITO II observou-se que a curcumina induziu apoptose nos cultivos celulares, e reduziu o número de células na fase G1 da replicação celular. Por meio da análise dos sobrenadantes, observou-se aumento na concentração de nitrato, subproduto estável do óxido

nítrico (NO[•]), nas células que receberam CUR. O NO[•] é um importante mediador celular, cujo aumento tem sido associado à inibição da metástase tumoral. Nesse contexto, podemos dizer que a curcumina apresenta efeito antineoplásico e a via de sinalização do NO[•] pode estar envolvida. VANNINI (2015) cita diversas vias que são moduladas por altas concentrações de NO[•], como ativação de caspases e fragmentação de DNA (DUBEY, 2016; OLESON, 2016). A vimblastina (VIN), por sua vez, prejudicou a migração celular, além de promover danos ao DNA, detectado por meio do teste Cometa, e aumentou os níveis de NO[•].

Pode-se observar que a curcumina apresentou resultados positivos nos experimentos realizados. A curcumina promoveu apoptose das células e reduziu a quantidade de células em replicação. Tal efeito já era esperado, porque é descrito em outras linhagens de cultivo celular de tumores humanos previamente mencionados. Observamos também que a VIN apresentou esses efeitos. Os mecanismos que levaram a esses efeitos merecem maior elucidação. Em relação ao sistema purinérgico, observamos que a curcumina diminuiu a atividade das enzimas que removem o ADP, por sua vez, reduzindo a quantidade de AMP e, por consequência, adenosina no microambiente tumoral. Tal efeito é importante, porque a adenosina possui efeito imuossupressivo nas células tumorais. Mânica (2019) estudou a atividade de ectoenzimas séricas em pacientes com melanoma e verificou que o aumento na hidrólise do ATP pode levar ao aumento na adenosina, favorecendo o status imunossupressivo do melanoma.

O aumento da produção de ERO pode causar estresse oxidativo, promovendo danos aos componentes celulares e, por sua vez, causando apoptose pela ativação da via intrínseca. No manuscrito II, observamos a redução da migração celular pelo teste da arranhadura (*scratch assay*) e aumento de células apoptóticas. Podemos sugerir que esses efeitos estariam ligados.

Sabe-se que a curcumina apresenta baixa absorção, o que prejudicaria o uso de curcumina como adjuvante oral para o câncer. Nesse contexto, várias estratégias para aumentar a biodisponibilidade da substância têm sido desenvolvidas, como uso de nanocápsulas e nanoemulsões. NISHIHIRA (2019) desenvolveu nanopartículas contendo curcumina e capsaicina, e obtendo bons resultados em cultivos celulares *Vero*, parecendo “seguras para serem utilizadas e avaliadas para fins terapêuticos futuros”.

Apesar disso, é possível que o prazo estudado seja curto e a célula não tenha tempo para responder à adição de curcumina. Por isso, mais estudos são necessários a fim de verificar a influência de outros tempos de tratamento nos cultivos celulares, entretanto, os resultados encontrados são promissores e indicam que a curcumina pode ser aliada no tratamento do melanoma.

5 CONCLUSÕES

Baseados nos dados do Manuscrito I e II conclui-se que a curcumina atua nas diferentes vias de sinalização celular das células de melanoma humano SK-MEL-28 e pode ser considerada uma substância aliada ao tratamento convencional do melanoma. Podemos supor que a curcumina apresentaria resultados favoráveis em pacientes caninos e felinos que apresentam melanomas, considerando a aplicabilidade do melanoma canino como modelo do melanoma humano.

Os resultados deste estudo podem contribuir para que profissionais da área da saúde e pacientes tenham mais aliados no tratamento do melanoma, além de fornecer novos conhecimentos sobre o mecanismo de atuação da curcumina na invasão e migração celular, assim como a concentração desta substância, o que permitirá novos estudos utilizando-se a curcumina como agente adjuvante em diferentes doenças. Ainda, acredita-se que este estudo contribuirá para a ciência básica, pois objetiva gerar novos conhecimentos na área de tratamento dos processos cancerígenos, assim como ciência avançada, uma vez que os resultados deste estudo poderão ser empregados na modulação da invasão celular por uma substância natural como a curcumina. Desta forma, os resultados poderão nortear futuros estudos de nosso grupo de pesquisa, além de incentivar tanto alunos de pós-graduação quanto de graduação a se interessarem pela pesquisa científica e, com isso, dar seguimento a essa linha de pesquisa com substâncias naturais e ampliar os conhecimentos acerca deste tema de suma importância, que é o estudo de substâncias naturais como agente adjuvante para diferentes processos patológicos.

REFERÊNCIAS

- ABEL, E. L.; DIGIOVANNI, J. Environmental Carcinogenesis. In: **The Molecular Basis of Cancer**. [s.l.] Elsevier, 2008. p. 91–113. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978145574066600007X>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.1016/B978-1-4557-4066-6.00007-X .
- AGGARWALL, B.B.; KUMAR, A.; BHARTI, A.C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. **Anticancer Res.**, Nova Iorque, v. 23, n. 1, p. 363-398, 2003. Disponível em < <https://mdanderson.elsevierpure.com/en/publications/anticancer-potential-of-curcumin-preclinical-and-clinical-studies>>. Acesso em 12 Fev. 2020.
- AHMED, B.; VAN DEN OORD, J. J.. Expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in pigment cell lesions of the skin. **Br J Dermatol**, Oxford, v.142, n.3, p.432-40. 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10735946/>>. Acesso em: 9 jul. 2021. doi: 10.1046/j.1365-2133.2000.03352.x.
- ANAND, P. et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharm Res.**, Stuttgart, v. 25, n. 9, p. 2097–2116, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18626751/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.1007/s11095-008-9661-9.
- ANVEKAR, R. A. et al. Sensitization to the mitochondrial pathway of apoptosis augments melanoma tumor cell responses to conventional chemotherapeutic regimens. **Cell Death Dis**, Londres, v. 3, n. 11, p. e420, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23152056/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.1038/cddis.2012.161.
- AUBREY, B. J., et al. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression?. **Cell Death Differ.**, Londres, v.25, n.1, p.104-113, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29149101/>>. Acesso em: 9 jul. 2021. doi: 10.1038/cdd.2017.169.
- AZIZ, M. A., et al. Antioxidant Categories and Mode of Action. In: SHALABY, E. Antioxidants 29. ed. [s.l.]: InTechOpen, 2019. cap. 1. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/chapters/65225>>. Acesso em: 15 maio 2021.
- BARZDO, M. et al. Erroneous administration of vinblastine. **Pharm World Sci.**, Hague, v. 31, n. 3, p. 362–364, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19306070/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi:10.1007/s11096-009-9291-2.
- BIMONTE, S., et al. Curcumin AntiCancer Studies in Pancreatic Cancer. **Nutrients**, Basel, v.8, n.7. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27438851/>>. Acesso em: 9 set 2021. doi:10.3390/nu8070433.
- BISWAS, S. K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? **Oxid Med Cell Longev**, Austin, v.2016, p.5698931. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26881031/>>. Acesso em: 9 jul. 2021. doi: 10.1155/2016/5698931.

BOSCH, R., et al. Mechanisms of Photoaging and Cutaneous Photocarcinogenesis, and Photoprotective Strategies with Phytochemicals. **Antioxidants**, Basel, v.4, n.2, p.248-268, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26783703/>>. Acesso em: 9 set 2021. doi: 10.3390/antiox4020248.

BRASH, D. E. UV-induced Melanin Chemiexcitation: A New Mode of Melanoma Pathogenesis. **Toxicol Pathol**, Thousand Oaks, v.44, n.4, p.552-4. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26951162/>>. Acesso em: 9 jul. 2021. doi: 10.1177/0192623316632072.

BREM, R., et al. Oxidative stress induced by UVA photoactivation of the tryptophan UVB photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) inhibits nucleotide excision repair in human cells. **Sci Rep**, Londres, v.7, n.1, p.4310. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28655934/>>. Acesso em: 9 jul. 2021. doi:10.1038/s41598-017-04614-8.

BRUCH-GERHARZ, D., et al. Nitric oxide and its implications in skin homeostasis and disease - a review. **Arch Dermatol Res**, Berlim, v.290, n.12, p.643-51. 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9879832/>>. Acesso em: 9 jul. 2021. doi: 10.1007/s004030050367.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling. **Br. J. Pharmacol.**, Londres, v.147, p. S172-S181, 2006a. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1760723/>>. Acesso em: 9 dez. 2019. doi: 10.1038/sj.bjp.0706429.

BURNSTOCK, G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. **Pharmacol. Rev.**, Baltimore, v.58, n.1, p.58-86, 2006b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16507883/>>. Acesso em: 9 jul. 2019. doi: 10.1124/pr.58.1.5.

CALIBASI-KOCAL, G., et al. Curcumin effects on cell proliferation, angiogenesis and metastasis in colorectal cancer. **J BUON**, Nicósia, v.24, n.4, p.1482-1487. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31646795/>>. Acesso em: 9 set 2021.

CHAE, S. W., et al. Overexpressions of Cyclin B1, cdc2, p16 and p53 in human breast cancer: the clinicopathologic correlations and prognostic implications. **Yonsei Med. J.**, Seul, v.52, n.3, p.445-53, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3101063/>>. Acesso em: 9 jul. 2019. doi: 10.3349/ymj.2011.52.3.445.

CHAN, E. S., et al. Adenosine A2A receptors in diffuse dermal fibrosis: pathogenic role in human dermal fibroblasts and in a murine model of scleroderma. **Arthritis Rheum**, Atlanta, v.54, n.8, p.2632-42. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16871530/>>. Acesso em: 9 jul. 2021. doi:10.1002/art.21974.

CHEN, J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. **Cold Spring Harb Perspect Med**, Woodbury, v.6, n.3, p.a026104-a026104, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26931810/>>. Acesso em: 9 set 2021. doi: 10.1101/cshperspect.a026104.

CHENG, H., et al. Nitric oxide in cancer metastasis. **Cancer Lett**, Limerick, v.353, n.1, p.1-7. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25079686/>>. Acesso em: 9 jul. 2021. doi: 10.1016/j.canlet.2014.07.014.

CONTI, D. et al. How are dynamic microtubules stably tethered to human chromosomes? In: **Cytoskeleton - Structure, Dynamics, Function and Disease**. [s.l.] InTech, 2017. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/chapters/54949>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi:10.5772/intechopen.68321 .

COSTA, P. Neuroproteção do cassis (*Ribes nigrum* L.) e de sua associação com o Donepezil em modelo de amnésia induzida por escopolamina. 2019. xv, 162 f. Tese (Doutorado Bioquímica Toxicológica)–Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2019.

CZABOTAR, P. E., et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nat Rev Mol Cell Biol**, Londres, v.15, n.1, p.49-63, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24355989/>>. Acesso em: 9 fev. 2020. doi: 10.1038/nrm3722.

DAS, A., et al. MMP proteolytic activity regulates cancer invasiveness by modulating integrins. **Sci Rep**, Londres, v.7, n.1, p.14219. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29079818/>>. Acesso em: 9 jul. 2021. doi: 10.1038/s41598-017-14340-w.

DAY, M. J.; LUCKE, V. M. Melanocytic neoplasia in the cat. **J Small Anim Pract.**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 207–213, 1995. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7650915/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi:10.1111/j.1748-5827.1995.tb02898.x .

DOUKI, T.; KOSCHEMBAHR, A.V.; CADET, J. Insight in DNA Repair of UV-induced Pyrimidine Dimers by Chromatographic Methods. **Photochem Photobiol.**, Lausane, v. 93, n. 1, p. 207-215, 2017. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27935042/>>. Acesso em 12 Fev. 2021. doi: 10.1111/php.12685

DUBEY, M., et al. Nitric oxide-mediated apoptosis of neutrophils through caspase-8 and caspase-3-dependent mechanism. **Cell Death Dis**, Londres, v.7, n.9, p.e2348. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27584786/>>. Acesso em: 9 set 2021. doi: 10.1038/cddis.2016.248.

DUBIELZIG, R. R. Ocular neoplasia in small animals. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, Filadélfia, v. 20, n. 3, p. 837–848, 1990. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2194360/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.1016/s0195-5616(90)50064-9.

DUNAWAY, S., et al. Natural Antioxidants: Multiple Mechanisms to Protect Skin From Solar Radiation. **Front. Pharmacol.**, Lausane, v.9, p.392-392, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5928335/>>. Acesso em: 9 dez. 2019. doi: 10.3389/fphar.2018.00392.

EL-DEIRY, W. S. The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. **Oncogene**, Basingstoke, v.22, n.47, p.7486-7495, 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14576853/>>. Acesso em: 9 jul. 2019.

FEDAK, E. A., et al. Dynamics of the p53 response to ionizing and ultraviolet radiation. **bioRxiv**, Cold Spring Harbor, p.367995, 2018. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2018/07/12/367995.full.pdf>>. Acesso em: 9 set 2021. doi: 10.1101/367995.

FGUYER, S.; AFAQ, F; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, Copenhagen, v.19, n.2, p.56-72, 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12945805/>> . Acesso em: 9 jul. 2019.

FIGHERA, R. A. et al. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004). **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 4, p. 223–230, 2008. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/pvb/a/BrJYzqX85k8N4FvLWwcKKhJ/?lang=pt>>. Acesso em: 20 dez 2021.

FONSECA-ALVES, C. E. et al. Current status of canine melanoma diagnosis and therapy: Report from a colloquium on canine melanoma organized by ABROVET (Brazilian association of veterinary oncology). **Front Vet Sci.**, Lausanne v. 8, p. 707025, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34485435/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.3389/fvets.2021.707025.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE COLLABORATIVE NETWORK. GBD Results tool. Seattle, 2020. Disponível em: <<http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>>. Acesso em: 9 jul. 2021.

GILLARD, M. et al. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. **Pigment Cell Melanoma Res.**, Londres, v. 27, n. 1, p. 90–102, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24112648/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.1111/pcmr.12170 .

GIULIANI, A. L., et al. Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules. **Immunol Lett**, Amsterdã, v.205, p.16-24, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30439478/>> Acesso em: 9 set 2021. doi: 10.1016/j.imlet.2018.11.006.

GIULIANI, A. L., et al. Ectonucleotidases in Acute and Chronic Inflammation. **Front Pharmacol**, Lausane, v.11, p.619458, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33613285/>>. Acesso em: 9 set 2021. doi:10.3389/fphar.2020.619458.

GOTO, N., et al. Detection of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by near-infrared spectroscopy and aquaphotomics. **Sci Rep**, Bethesda, v.5, n.11808, 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep11808>>. Acesso em: 9 jul. 2021. doi: 10.1038/srep11808.

HALLIWELL, B., CLEMENT, M.V; LONG, L.H.. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.486, n.1, p.10-13, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11108833/>>. Acesso em: 9 jul. 2019. doi: 10.1016/S0014-5793(00)02197-9.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., eds. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Oxford University Press, pp. 187–267, 2007

HAYWARD, N. K. et al. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. **Nature**, Londres, v. 545, n. 7653, p. 175–180, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28467829/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi:10.1038/nature22071 .

HERLYN, M.; FUKUNAGA-KALABIS, M. What is a good model for melanoma? **J Invest Dermatol.**, Baltimore, v. 130, n. 4, p. 911–912, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20231823/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.1038/jid.2009.441 .

IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS.. Solar and ultraviolet radiation. In: IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS.

Radiation. 100. ed. Lyon, França: IARC, 2009. cap.

2. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304366/>>. Acesso em: 15 maio 2021.

IGHODARO & AKINLOYE. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alex. J. Med.**, Alexandria, v. 54, n. 4, 287-293, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090506817301550>>. Acesso em: 12 fev. 2020. doi: 10.1016/j.ajme.2017.09.001

JUNGER, W.G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nat Rev Immunol** , Londres, v.11, n.3, p.201-212, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21331080/>>. Acesso em: 9 jul. 2021. doi: 10.1038/nri2938.

KASTENHUBER, E. R.; LOWE, S. W. Putting p53 in Context. **Cell**, Cambridge, v. 170, n. 6, p. 1062–1078, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28886379/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.1016/j.cell.2017.08.028.

KHAN, M. A., et al. Oxidative stress induced by curcumin promotes the death of cutaneous T-cell lymphoma (HuT-78) by disrupting the function of several molecular targets. **Mol Cancer Ther**, Filadélfia, v.11, n.9, p.1873-83, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22653966/>>. Acesso em: 9 jul. 2019. doi: 10.1158/1535-7163.mct-12-0141.

KIMURA, H.; H. ESUMI. Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. **Acta Biochim Pol**, Varsóvia, v.50, n.1, p.49-59. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12673346/>>. Acesso em: 9 jul. 2021.

KIMURA, C.K; GÁRATE, A.P.; DAGLI, M.L.Z. Retrospective study of neoplasms in domestic animals: a survey between 1993 and 2002 of the Service of Animal Pathology, Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo, Southeast Brazil. **Braz J Vet Pathol**, Botucatu, v. 5, n. 2, p. 60–69, 2012. Disponível em: <[https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/brazilian-journal-veterinary-pathology/5-\(2012\)-2/retrospective-study-of-neoplasms-in-domestic-animals-a-survey-between-/](https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/brazilian-journal-veterinary-pathology/5-(2012)-2/retrospective-study-of-neoplasms-in-domestic-animals-a-survey-between-/)>. Acesso em: 20 dez 2021.

KOKOLAKIS, G., et al. Ambivalent Effects of Tumor Necrosis Factor Alpha on Apoptosis of Malignant and Normal Human Keratinocytes. **Skin Pharmacol Physiol**, Basel, v.34, n.2, p.94-102, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33730739/>>. Acesso em: 9 set 2021. doi: 10.1159/000513725.

KURUTAS, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutr J**, Londres, v.15, n.1, p.71-71, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27456681/>>. Acesso em: 9 set 2021. doi:10.1186/s12937-016-0186-5.

LAI, H., et al. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene and Early Onset Breast Cancer. **Cancer Biol. Ther.**, Filadélfia, v.1, n.1, p.31-36, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12170762/>> Acesso em: 9 dez. 2019. doi: 10.4161/cbt.1.1.37.

LANKHORST, S.; JAN DANSER, A.H.; VAN DEN MEIRACKER, A.H.. Endothelin-1 and antiangiogenesis. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, Bethesda, v.310, n.3, p.R230-4. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26511523/>>. Acesso em: 9 jul. 2021. doi: 10.1152/ajpregu.00373.2015.

LIU, H.; Y. XIA. Beneficial and detrimental role of adenosine signaling in diseases and therapy. **J Appl Physiol (1985)**, Bethesda, v.119, n.10, p.1173-1182, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26316513/>>. Acesso em: 9 set 2021. doi:110.1152/jappphysiol.00350.2015.

MACHADO, G. A. C. et al. Incidence of skin tumors in dogs in Salvador, Bahia state, Brazil (2007-2016). **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 11, p. 2139–2145, 2018. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/pvb/a/VWYRbsSH8wDhnYPg7jkmdbd/?lang=en>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.1590/1678-5150-PVB-5686 .

MARKS, F.; FÜRSTENBERGER, G.; MÜLLER-DECKER, K. Tumor promotion as a target of cancer prevention. **Recent Results Cancer Res.**, Berlin, v. 174, p. 37–47, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17302183/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.1007/978-3-540-37696-5_3 .

MÂNICA, A., et al. The signaling effects of ATP on melanoma-like skin cancer. **Cell Signal**, Oxford, v.59,n. 7, p.122-130, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30926387/>>. Acessado em 12 Jun. 2021. doi: 10.1016/j.cellsig.2019.03.021.

MANCEBO, S. E.; S. Q. WANG. Skin cancer: role of ultraviolet radiation in carcinogenesis. **Rev Environ Health**, Berlin, v.29, n.3, p.265-73, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25252745/>>. Acesso em: 9 set 2021. doi:10.1515/reveh-2014-0041.

MASSI, D., et al. Inducible nitric oxide synthase expression in melanoma: implications in lymphangiogenesis. **Mod Pathol**, Baltimore, v.22, n.1, p.21-30. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18660796/>>. Acesso em: 9 jul. 2021. doi: 10.1038/modpathol.2008.128.

MELNIKOVA, V. O.; ANANTHASWAMY, H. N. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. **Mutat Res**, Amsterdã, v. 571, n. 1–2, p. 91–106, 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15748641/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.11.015.

MINAMI, A., et al. Cell Cycle Regulation via the p53, PTEN, and BRCA1 Tumor Suppressors. In: BULGIN, D. *New Aspects in Molecular and Cellular Mechanisms of Human Carcinogenesis*. 29. ed. [s.l.]: InTechOpen, 2016. cap. 2. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/chapters/48843>>. Acesso em: 15 maio 2021.

MITCHISON, T. J. The proliferation rate paradox in antimetabolic chemotherapy. **Mol Biol Cell.**, Bethesda, v. 23, n. 1, p. 1–6, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22210845/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.1091/mbc.E10-04-0335 .

MOCHIZUKI, H. et al. BRAF mutations in canine cancers. **PloS one**, San Francisco, v. 10, n. 6, p. e0129534, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26053201/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.1371/journal.pone.0129534.

MOUDI, M. et al. Vinca alkaloids. **Int J Prev Med.**, Isfahan, v. 4, n. 11, p. 1231–1235, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24404355/>>. Acesso em: 20 dez 2021.

MULLENDERS, L. H. F. Solar UV damage to cellular DNA: from mechanisms to biological effects. **Photochem Photobiol Sci**, Cambridge, v.17, n.12, p.1842-1852, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30065996/>>. Acesso em: 9 jul. 2021. doi:10.1039/c8pp00182k.

MÜLLER, W. E. G., et al. Inorganic Polyphosphates As Storage for and Generator of Metabolic Energy in the Extracellular Matrix. **Chem Rev**, Easton, v.119, n.24, p.12337-12374, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31738523/>>. Acesso em: 9 set 2021. doi:10.1021/acs.chemrev.9b00460.

NISHIHARA, V. S. K. **Desenvolvimento de nanopartículas contendo curcumina e capsaicina, e avaliação de suas potenciais atividades biológicas in vitro e in vivo..** 2019. xv, 177 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Nanociências) – Universidade Franciscana, Santa Maria, RS, 2019.

NISHIYA, A. et al. Comparative Aspects of Canine Melanoma. **Vet Sci.**, Basel, v. 3, n. 1, p. 7, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29056717/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.3390/vetsci3010007 .

OFOEDU, C.E., et al. Hydrogen Peroxide Effects on Natural-Sourced Polysacchrides: Free Radical Formation/Production, Degradation Process, and Reaction Mechanism-A Critical Synopsis. **Foods**, Basel. v. 10, n. 4, p. 699, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33806060/>>. Acessado em 12 Jun. 2021. doi: 10.3390/foods10040699.

O'SULLIVAN, S., et al. Nitric oxide-matrix metalloproteinase-9 interactions: biological and pharmacological significance--NO and MMP-9 interactions. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdã, v.1843, n.3, p.603-17. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24333402/>>. Acesso em: 9 jul. 2021. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.12.006.

OZAKI, T.; A., NAKAGAWARA. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. **Cancers**, Basel, v.3, n.1, p.994-1013, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24212651/>>. Acesso em: 9 set 2021. doi: 10.3390/cancers3010994.

OLESON, B. J., et al. Nitric Oxide Suppresses β -Cell Apoptosis by Inhibiting the DNA Damage Response. **Mol Cell Biol**, Washington, v.36, n.15, p.2067-77. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27185882/>>. Acesso em: 9 set 2021. doi:10.1128/MCB.00262-16

PEI, J., et al. Sublethal dose of irradiation enhances invasion of malignant glioma cells through p53-MMP 2 pathway in U87MG mouse brain tumor model. **Radiat Oncol**, Londres, v.10, p.164. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26245666/>>. Acesso em: 9 jul. 2021. doi: 10.1186/s13014-015-0475-8.

PFEIFER, G.P.; BESARATINIA,A. UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. **Photochem Photobiol Sci**. Cambridge, v.11, v. 1, p.90-97. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21804977/>>. Acesso em: 9 jul. 2021. doi: 10.1039/c1pp05144j.

PHAM, D. D. M.; GUHAN, S.; TSAO, H. KIT and melanoma: Biological insights and clinical implications. **Yonsei Med J.**, Seul, v. 61, n. 7, p. 562–571, 2020. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32608199/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi:10.3349/ymj.2020.61.7.562 .

PHILLIPS, J. M., et al. Curcumin inhibits skin squamous cell carcinoma tumor growth in vivo. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, Herndon, v.145, n.1, p.58-63, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21493306>>. Acesso em: 9 dez. 2019. doi: 10.1177/0194599811400711.

PHILLIPS, J., et al. Curcumin inhibits UV radiation-induced skin cancer in SKH-1 mice. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, Herndon, v.148, n.5, p.797-803, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23386626>>. Acesso em: 9 dez. 2019. doi: 10.1177/0194599813476845.

PIEROTTI, M. A.; SOZZI, G.; CROCE, C. M. **Mechanisms of oncogene activation**. Shelton, CT: B.C. Decker, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12538/>>. Acesso em: 20 dez 2021.

PIEROULI, K. et al. Introductory chapter: Gene profiling in cancer in the era of metagenomics and precision medicine. In: **Gene Expression Profiling in Cancer**. [s.l.] IntechOpen, 2019. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/chapters/65735>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.5772/intechopen.84462.

PRASAD, S., et al. Curcumin, a component of golden spice: from bedside to bench and back. **Biotechnol Adv**, Oxford, v.32, n.6, p.1053-1064, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24793420/>>. Acesso em: 9 set 2021. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.04.004.

PROUTEAU, A.; ANDRÉ, C. Canine melanomas as models for human melanomas: Clinical, histological, and genetic comparison. **Genes**, Basel, v. 10, n. 7, p. 501, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31262050/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.3390/genes10070501 .

RAMOS-VARA, J. A. et al. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. **Vet Pathol.**, Basel, v. 37, n. 6, p. 597–608, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11105949/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.1354/vp.37-6-597.

RAHAT, M. A.; B. HEMMERLEIN. Macrophage-tumor cell interactions regulate the function of nitric oxide. **Front Physiol**, Lausanne, v.4, p.144. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23785333/>>. Acesso em: 9 jul. 2021. doi: 10.3389/fphys.2013.00144.

RAVINDRAN, J.; PRASAD, S.; AGGARWAL, B.B. Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively?. **AAPS J**. Nova Iorque, v. 11, n. 3, p. 495-510, 2009. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/19590964/>>. Acesso em 12 Fev. 2020. doi: 10.1208/s12248-009-9128-x

RECK, A.; KESSLER, M. Melanocytic tumours of the nasal planum in cats: 10 cases (2004-2019). **J Small Anim Pract.**, Oxford, v. 62, n. 2, p. 131–136, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33244779/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.1111/jsap.13265.

REDZA-DUTORDOIR, M.; D. A. AVERILL-BATES. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdã, v.1863, n.12, p.2977-2992, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27646922/>>. Acesso em: 9 set 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>.

RESENDE, L. et al. Current insights into canine cutaneous melanocytic tumours diagnosis. In: **Melanoma - Current Clinical Management and Future Therapeutics**. [s.l.] Intech, 2015. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/chapters/47737>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.5772/59480.

RIBEIRO, T. A. et al. Epidemiological profile of canine neoplasms in São Luís/MA: a retrospective study (2008-2015). **Res., Soc. Dev.**, Itabira, v. 9, n. 12, p. e8291210496, 2020. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/10496>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.33448/rsd-v9i12.10496.

SAGRILLO, M. R. **Efeito do tucumã (*Astrocaryum aculeatum*, Meyer) na citoproteção causada pelo estresse oxidativo e na modulação de células de leucemia promielocítica aguda**. 2014. xv, 95 f. Tese (Doutorado Farmacologia)–Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.

SAITO, M., et al. Adenosine suppresses CW2 human colonic cancer growth by inducing apoptosis via A(1) adenosine receptors. **Cancer Lett.**, Limerick, v.290, n.2, p.211-215, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19822392/>>. Acesso em: 9 jul. 2019. doi: 10.1016/j.canlet.2009.09.011.

SALVESTRINI, V., et al. Extracellular ATP induces apoptosis through P2X7R activation in acute myeloid leukemia cells but not in normal hematopoietic stem cells. **Oncotarget.**, Albany, v.24, n.8, p.5895-5908, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5351599/>>. Acesso em: 9 jul. 2019. doi: 10.18632/oncotarget.13927.

SANTOS, T. S. DOS et al. Presença de pets e sua relação com seus tutores. **Res., Soc. Dev.**, [s.l.] v. 10, n. 5, p. e37910514885, 2021. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/14885>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.33448/rsd-v10i5.14885.

SARKAR, F.H. et al. Lesson learned from nature for the development of novel anti-cancer agents: implication of isoflavone, curcumin, and their synthetic analogs. **Curr. Pharm. Des.** Amsterdam, v.16, n. 16, p. 1801-1812, 2010. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/20345353/>> Acesso em 12 Fev. 2020. doi: 10.2174/13816121079120895 6.

SMITH, S. H.; GOLDSCHMIDT, M. H.; MCMANUS, P. M. A comparative review of melanocytic neoplasms. **Vet Pathol.**, Basel, v. 39, n. 6, p. 651–678, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12450197/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.1354/vp.39-6-651.

STOHS, S. J. The role of free radicals in toxicity and disease. **J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.**, Londres, v. 6, n. 3-4, p. 205–228, 1995. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8852268/>>. Acesso em: 9 jul. 2019. doi: 10.1515/jbcpp.1995.6.3-4.205.

SHARIFI-RAD, J., et al. Turmeric and Its Major Compound Curcumin on Health: Bioactive Effects and Safety Profiles for Food, Pharmaceutical, Biotechnological and Medicinal Applications. **Front Pharmacol**, Lausanne, v.15, n. 11, p.01021, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33041781/>>. Acessado em 12 Jun. 2021. doi: 10.3389/fphar.2020.01021.

SHEHZAD, A.; LEE, J.; LEE, Y.S.. Curcumin in various cancers. **Biofact**. Nova Iorque, v.39, n. 1, p. 56-68, 2013. Disponível em < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23303705/> > Acesso em 12 Fev. 2020. doi: 10.1002/biof.1068

SHISHODIA, S., et al. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kappa B activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. **Biochem. Pharmacol.**, Los Angeles, v.70, n.5, p.700-713, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16023083>>. Acesso em: 9 dez. 2019. doi: 10.1016/j.bcp.2005.04.043.

SYNG-AI, C.; KUMARI, L; KHAR, A. Effect of curcumin on normal and tumor cells: Role of glutathione and bcl-2. **Mol. Cancer. Ther.**, Filadélfia, v.3, n.9, p.1101-1108, 2004. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15367704/>>. Acesso em: 9 jul. 2019.

SONG, X., et al. Molecular targets of curcumin in breast cancer (Review). **Mol Med Rep**, Atenas, v.19, n.1, p.23-29. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30483727/>>. Acesso em: 9 set 2021. doi:10.3892/mmr.2018.9665.

STODDART, R. W. The Generation of Cancer: Initiation, promotion, progression and the multiple influences of the environment. **Nutr Health**, Boston, v. 2, n. 3–4, p. 153–162, 1983. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/026010608300200405>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.1177/026010608300200405.

TAYLOR, W. R.; G. R. STARK. Regulation of the G2/M transition by p53. **Oncogene**, Basingstoke, v.20, n.15, p.1803-15, 2001. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11313928/>>. Acesso em: 9 jul. 2019. doi: 10.1038/sj.onc.1204252.

TERMINI, H. et al. Curcumin against Prostate Cancer: Current Evidence. **Biomolecules**, Basel, v.10, n. 10, p. 1536, 2020. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33182828/>>. Acesso em 12 Fev. 2020. doi: 10.3390/biom10111536.

TOMEH, M. A.; HADIANAMREI, R.; ZHAO, X.. A Review of Curcumin and Its Derivatives as Anticancer Agents. **Int J Mol Sci**, Basel, v.20, n.5, p.1033, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30818786/>>. Acesso em: 9 set 2021. doi: 10.3390/ijms20051033.

UEDA, K.; UEDA, A.; OZAKI, K. Cutaneous malignant melanoma in two rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **J Vet Med Sci.**, Tóquio, v. 80, n. 6, p. 973–976, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29681558/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.1292/jvms.18-0081.

VACCA, A. et al. Antiangiogenesis is produced by nontoxic doses of vinblastine. **Blood**, Nova Iorque, v. 94, n. 12, p. 4143–4155, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10590059/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: blood.V94.12.4143.

VALLIANOU, N. G., et al. Potential Anticancer Properties and Mechanisms of Action of Curcumin. **Anticancer Res**, Atenas, v.35, n.2, p.645-651, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25667441/>>. Acesso em: 9 set 2021.

VAN DER LINDE-SIPMAN, J. S. et al. Cutaneous malignant melanomas in 57 cats: identification of (amelanotic) signet-ring and balloon cell types and verification of their origin by immunohistochemistry, electron microscopy, and in situ hybridization. **Vet Pathol.**, Basel, v. 34, n. 1, p. 31–38, 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9150543/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.1177/030098589703400105.

VANNINI, F.; KASHFI, K.; NATH, N.. The dual role of iNOS in cancer. **Redox Biol**, Amsterdã, v.6, p.334-343, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26335399/>>. Acesso em: 9 jul. 2021. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.009.

VASCONCELOS, S.M.L., et al. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. **Quím. Nova**, São Paulo, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000500046> >. Acesso em: 9 set 2021. doi: 10.1590/S0100-40422007000500046

WATSON, M.; HOLMAN, D.M.; MAGUIRE-EISEN, M. Ultraviolet Radiation Exposure and Its Impact on Skin Cancer Risk. **Semin Oncol Nurs**, Filadélfia, v.32, n.3, p.241-254, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27539279/>>. Acesso em: 9 set 2021. doi: 10.1016/j.soncn.2016.05.005.

WEI, B.-R. et al. Synergistic targeted inhibition of MEK and dual PI 3K/ mTOR diminishes viability and inhibits tumor growth of canine melanoma underscoring its utility as a preclinical model for human mucosal melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res**. Oxford, v. 29, n. 6, p. 643–655, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27463366/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.1111/pcmr.12512.

WONG, K. et al. Cross-species genomic landscape comparison of human mucosal melanoma with canine oral and equine melanoma. **Nat Commun.**, Londres, v. 10, n. 1, p. 353, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30664638/>>. Acesso em: 20 dez 2021. doi: 10.1038/s41467-018-08081-1 .

XIONG, S., et al. Mitochondria-mediated apoptosis in mammals. **Protein & Cell**, Heidelberg, v.5, n.10, p.737-749, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13238-014-0089-1>>. Acesso em. doi: 10.1007/s13238-014-0089-1.

YARLAGADDA, K., et al. The role of nitric oxide in melanoma. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer**, Amsterdã, v.1868, n. 2, p.500-509, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28963068/>>. Acessado em 12 Jun. 2021. doi: 10.1016/j.bbcan.2017.09.005.

YEGUTKIN, G. G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, Boca Ratón, v.49, n.6, p.473-97, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25418535/>>. Acesso em: 9 set 2021. doi:10.3109/10409238.2014.953627.