

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Patologia

Emerson Soares Veloso

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL
E SEUS EFEITOS EM DIFERENTES MODELOS DE MELANOMA**

Belo Horizonte
2022

Emerson Soares Veloso

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL
E SEUS EFEITOS EM DIFERENTES MODELOS DE MELANOMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Patologia – área de concentração em Patologia Investigativa.

Orientador: Enio Ferreira

Coorientadora: Helen Lima Del Puerto

Belo Horizonte
2022

043

Veloso, Emerson Soares.

Avaliação in vitro e in vivo da transição epitélio-mesenquimal e seus efeitos em diferentes modelos de melanoma [manuscrito] / Emerson Soares Veloso. – 2022.

84 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Enio Ferreira. Coorientadora: Helen Lima Del Puerto.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Experimentação Animal. 3. Linhagem Celular Tumoral. 4. Metástase Neoplásica. 5. Metformina. 6. Neoplasias. I. Ferreira, Enio. II. Del Puerto, Helen Lima. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

ATA DE DEFESA DE TESE N° 451 DE EMERSON SOARES VELOSO

Realizou-se, no dia 04 de agosto de 2022, às 14 horas, por videoconferência, plataforma online, a defesa de Tese, intitulada *"Avaliação in vitro e in vivo da transição epitélio-mesenquimal e seus efeitos em diferentes modelos de melanoma"*, apresentada por *Emerson Soares Veloso*, número de registro 2018684030, graduado no curso de Ciências Biológicas, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: **Profa. Dra. Istéfani Luciene Dayse da Silva - Universidade Federal Fluminense/RJ**; **Prof. Dr. Diego Carlos dos Reis - Yale University**; **Profa. Dra. Karine Araújo Damasceno - Fiocruz/BA**; **Residente Pós-Doutorado Dra. Kátia Michelle Freitas - FaFar/UFMG**; **Profa. Helen Lima Del Puerto, ICB/UFMG – COORIENTADORA**; e **Prof. Dr. Enio Ferreira, ICB/UFMG - ORIENTADOR**.

A Comissão considerou a Tese:

Aprovado

Reprovado

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 04 de agosto de 2022.

* De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Doutor só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Tese, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Doutorado.



Documento assinado eletronicamente por **Enio Ferreira, Professor do Magistério Superior**, em 05/08/2022, às 17:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helen Lima Del Puerto, Professora do Magistério Superior**, em 06/08/2022, às 14:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Istéfani Luciene Dayse da Silva, Usuária Externa**, em 22/08/2022, às 13:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Kátia Michelle Freitas, Usuária Externa**, em 24/08/2022, às 11:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karine Araujo Damasceno, Usuária Externa**, em 09/11/2022, às 20:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diego Carlos dos Reis, Usuário Externo**, em 30/11/2022, às 12:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1621657** e o código CRC **C04F7A46**.



Este trabalho foi realizado no Laboratório do Comportamento Celular do Departamento de Patologia Geral – Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Minas Gerais, com apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.

Dedico este trabalho aqueles que tanto se dedicaram para que hoje eu estivesse aqui (ou em qualquer outro lugar onde quisesse estar).
Meus pais, Nair e Gervásio.

AGRADECIMENTOS

Ao universo, (a vida e tudo mais!), por guiar meus caminhos até este momento e tantos outros que estão por vir.

Aos meus pais, Nair e Gervásio, que com toda sua luta me proporcionaram a estrutura necessária para me transformar no profissional que hoje sou e são sempre minhas maiores inspirações para continuar em busca dos meus objetivos.

Ao meu namorado, Davi, pelo suporte em todos os momentos, em especial naqueles em que nem mesmo eu acreditava no meu potencial, seguimos sempre *Juntos* construindo essa história que certamente não é só um gif!

Ao meu querido orientador, Enio, que nestes quase 10 anos me ensinou não somente sobre ciência e patologia e foi fundamental na minha formação pessoal e profissional. Uma honra, e enorme privilégio, ser seu orientando!

A minha coorientadora, Helen, fundamental para a execução deste trabalho, em especial todo o mundo do cultivo celular e biologia molecular que me propus explorar e não seria possível sem você.

Aos meus Amados amigos encontrados no LCC, Bárbara, Bruna, Camila, Felipe e Thaís. A pós-graduação não é fácil, nas circunstâncias atuais menos ainda, mas ter a companhia e amizade de vocês tornou esta árdua jornada tolerável. Nem que seja a base do deboche e ironia!

Aos meus queridos amigos Gustavo, Ivy, Peter, Luiz, Clara, Lílian, Nayane e Anderson, que sempre me apoiam e trazem momentos de alegria. Nem sempre puder estar presente nos últimos tempos, mas prometo ir em todos os encontros que ainda não conseguimos marcar!

A todos do Laboratório do Comportamento Celular, que orgulhosamente vi “nascer”. Dizem que o que torna um ambiente especial são as pessoas que o habitam, e com certeza este laboratório é um ambiente tão bom de se trabalhar devido a vocês. Agradeço especialmente a Marina, Vitor, Sara e Bhanca cuja ajuda foi essencial durante os experimentos.

Ao Instituto de Ciências Biológicas e a UFMG, que foram minha segunda (e as vezes primeira) casa nos últimos anos. Uma instituição de excelência que me proporcionou a oportunidade e os meios para minha formação e desenvolvimento.

A todos os professores que tive. Do ensino básico, técnico, superior e pós, todos vocês foram responsáveis pela minha construção.

A todos os cientistas, em especial os colegas brasileiros, por persistirem em busca do conhecimento e melhorias para a sociedade até mesmo quando não somos reconhecidos.

A Hipócrates, Aristóteles, Newton, Einstein, Marie Curie, Rosalind Franklin, Galton, Mendel, Virchow e tantas outras “estrelas” da ciência que marcaram a história. E em especial, a Darwin!

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro que viabilizou este trabalho.

Muito obrigado!

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”

George Bernard Shaw

RESUMO

O melanoma é a neoplasia maligna originária dos melanócitos, sendo a mais agressiva e com maior taxa de mortalidade dentre as neoplasias cutâneas. A homeostase dos melanócitos é controlada pela interação com os queratinócitos mediada pela expressão de E-caderina. A transição epitélio-mesenquimal (TEM), processo associado a progressão em neoplasias epiteliais, é caracterizada pela mudança de um fenótipo epitelial para mesenquimal, com a redução de expressão de E-caderina e aumento de N-caderina. Nos melanomas a ocorrência e papel da TEM, apesar de observada com algumas similaridades, permanece em discussão devido a origem embriológica não-epitelial dos melanócitos e a alta heterogeneidade histológica e molecular dos melanomas. Os mecanismos de regulação da TEM são amplamente estudados, devido a seu importante papel na progressão neoplásica, tendo sido sugerido que a metformina tem potencial de inibição da sua ocorrência. Assim, neste trabalho investigamos os efeitos da metformina sobre a TEM nas linhagens celulares de melanoma humano A-375 e melanoma murino B16-F10 bem como a relação entre marcadores associados a TEM e a formação de metástases em modelo experimental *in vivo* de melanoma em camundongos C57BL/6. Para os experimentos *in vitro* as linhagens foram cultivadas, tratadas com 0mM (controle), 0,5mM ou 5mM de metformina, e avaliada a viabilidade celular, pelo ensaio de MTT, expressão gênica de marcadores da TEM e de diferenciação celular por RT-qPCR, avaliação do potencial invasivo e migratório pelos ensaios de matrigel e cicatrização de feridas. Para avaliação da colonização pulmonar as células B16-F10 cultivadas e tratadas *in vitro* foram inoculadas via veia caudal em camundongos C57BL/6 que foram acompanhados por 20 dias. Os animais foram eutanasiados e os focos metastáticos no pulmão avaliados, bem como a expressão imuno-histoquímica de E-caderina, N-caderina, ZEB1, ZEB2, Twist, Vimentina, Nanog, Sox10 e CDC47 nas áreas de metástases pulmonares. Nos ensaios *in vitro*, o tratamento com a metformina não impactou a viabilidade celular em 24 horas de tratamento, porém no tempo de 48 horas o tratamento com 5mM reduziu significativamente o metabolismo celular em ambas as linhagens em relação aos respectivos controles. A expressão gênica de *CDH1*, *CDH2*, *Snail*, *ZEB1*, *ZEB2*, *OCT3/4*, *Nanog* e miR200-c não apresentou alterações significativas com as concentrações utilizadas em nenhuma das linhagens estudadas, já o potencial migratório de ambas as linhagens foi reduzido frente ao tratamento com as duas concentrações da metformina. No modelo *in vivo*, observou-se formações metastáticas em apenas 10% (1/10) dos animais que receberam as células tratadas com 5mM de metformina enquanto nos que receberam células sem tratamento prévio ou tratadas apenas com 0,5mM 100% dos animais apresentaram desenvolvimento de metástases pulmonares. Além disso as formações observadas no grupo que recebeu células tratadas com 5mM de metformina eram menores do que as observadas nos outros grupos. Observou-se ainda a redução da expressão proteica de N-caderina, vimentina, CDC47, ZEB2 e Sox10 nas metástases de células previamente tratadas com 5mM. Os resultados indicam que as proteínas envolvidas na TEM, aparentemente, possui papel importante na migração e desenvolvimento de metástases em modelos experimentais de melanoma, evidenciado pela inibição farmacológica com metformina.

Palavras-chave: Experimentação Animal. Linhagem Celular Tumoral. Metástase Neoplásica. Metformina. Neoplasias.

ABSTRACT

Melanoma is the malignant neoplasm originating from melanocytes, being the most aggressive and with the highest mortality rate among skin neoplasms. Melanocyte homeostasis is controlled by the interaction with keratinocytes mediated by E-cadherin expression. Epithelial-mesenchymal transition (EMT), a process associated with progression in epithelial neoplasms, is characterized by the change from an epithelial to mesenchymal phenotype, with a reduction in E-cadherin and an increase in N-cadherin expression. In melanomas, the occurrence and role of EMT, although observed with some similarities, remains under discussion due to the non-epithelial embryological origin of melanocytes and the high histological and molecular heterogeneity of melanomas. The regulatory mechanisms of EMT are widely studied, due to its important role in neoplastic progression, and it has been suggested that metformin has the potential to inhibit its occurrence. Thus, in this work we investigated the effects of metformin on EMT in human melanoma A-375 and murine melanoma B16-F10 cell lines as well as the relationship between EMT-associated markers and the formation of metastases in an *in vivo* experimental model of melanoma in C57BL/6 mice. For the *in vitro* experiments, the cell lines were cultivated, treated with 0mM (control), 0.5mM or 5mM metformin, and cell viability was evaluated by the MTT assay, gene expression of EMT markers and cell differentiation by RT-qPCR, assessment of invasive and migratory potential by matrigel and wound healing assays. To evaluate lung colonization, B16-F10 cells cultured and treated *in vitro* were inoculated via the caudal vein into C57BL/6 mice that were followed for 20 days. The animals were euthanized and the metastatic foci in the lung were evaluated, as well as the immunohistochemical expression of E-cadherin, N-cadherin, ZEB1, ZEB2, Twist, Vimentin, Nanog, Sox10 and CDC47 in the areas of lung metastases. In *in vitro* assays, treatment with metformin did not impact cell viability at 24 hours of treatment, but at 48 hours, treatment with 5mM significantly reduced cell metabolism in both cell lines in relation to the respective controls. The gene expression of CDH1, CDH2, Snail, ZEB1, ZEB2, OCT3/4, Nanog and miR200-c did not show significant changes with the concentrations used in any of the studied cell lines, since the migratory potential of both cell lines was reduced against the treatment with the two concentrations of metformin. In the *in vivo* model, metastatic formations were observed in only 10% (1/10) of the animals that received cells treated with 5mM of metformin, while in those that received cells without previous treatment or treated with only 0.5mM, 100% of the animals showed development of lung metastases. In addition, the formations observed in the group that received cells treated with 5mM metformin were smaller than those observed in the other groups. A reduction in the protein expression of N-cadherin, vimentin, CDC47, ZEB2 and Sox10 was also observed in the metastases of cells previously treated with 5mM. The results indicate that proteins involved in TEM apparently play an important role in the migration and development of metastases in experimental models of melanoma, as evidenced by pharmacological inhibition with metformin.

Keywords: Animal Experimentation. Cell Line, Tumor. Metformin. Neoplasm Metastasis. Neoplasms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1) Delineamento experimental	39
Figura 2) Ensaio de cicatrização de feridas com células A-375	71
Figura 3) Ensaio de cicatrização de feridas com células B16-F10	72
Figura 4) Expressão imuno-histoquímica de N-caderina, vimentina e Sox10	73
Figura 5) Expressão imuno-histoquímica de Twist, ZEB1, ZEB2 e Nanog	73
Figura 6) Carta de aprovação do CEUA/UFMG	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes RT-PCR	36
Tabela 2. Primers utilizados na RT-qPCR	37
Tabela 3. Reagentes RT-qPCR	37
Tabela 4. Reagentes imuno-histoquímica	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
AJCC	Do inglês “ <i>American Joint Committee on Cancer</i> ”
Akt/PKB	Proteína quinase B
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ATCC	Do inglês “ <i>American Type Culture Collection</i> ”
BCL-2	Do inglês “ <i>B cell lymphoma 2</i> ”
CAM’s	Moléculas de adesão celular
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<i>CDH1</i>	Gene da Caderina 1
<i>CDH2</i>	Gene da Caderina 2
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CETEA/CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Dióxido de carbono
CSC’s	Do inglês “ <i>cancer stem cells</i> ”
Ct	Do inglês “ <i>Cycle Threshold</i> ”
DAB	3’3-diaminobenzidina
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DMEM	Do inglês “ <i>Dulbecco’s Modified Eagle Medium</i> ”
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Enzima Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
EMT	Do inglês “ <i>epithelial-mesenchymal transition</i> ”
ERK	Do inglês “ <i>extracelular signal-regulated kinases</i> ”
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FBS	Do inglês “ <i>fetal bovine serum</i> ”
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GTP	Trifosfato de guanosina

GTPase	Enzima hidrolase de GTP
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina-eosina
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IHC	Do inglês “ <i>immunohistochemistry</i> ”
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
Kg	Quilograma
KLF4	Do inglês “ <i>Krüppel- like factor 4</i> ”
LCC	Laboratório do Comportamento Celular
LKB1	Do inglês “ <i>Liver kinase B1</i> ”
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEK	Quina ativadora da MAP quinase
mg	Miligrama
miRNA	micro-RNA ou micro ácido ribonucleico
mL	Mililitro
Mm	Milimetro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensafeiro
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
Nanog	Do inglês “ <i>Nanog homeobox</i> ”
NF1	Neurofibrina 1
Ng	Nanograma
nm	Nanometro
OCT3/4	Fator de transcrição de ligação ao octâmero 3/4
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RAF	Quinase serina/treonina
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Enzima ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
RTKs	receptor de tirosina-quinase

RT-PCR	Transcrição reversa com reação em cadeia da polimerase
RT-qPCR	Transcrição reversa com reação em cadeia da polimerase quantitativa
SD	Do inglês “ <i>standard deviation</i> ”
SFB	Soro fetal bovino
TEM	transição epitelial-mesenquimal
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
un	Unidade
ZEB1	Do inglês “ <i>Zinc-Finger E-box Binding 1</i> ”
ZEB2	Do inglês “ <i>Zinc-Finger E-box Binding 2</i> ”

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1. O Melanócito	18
2.2. Melanoma	20
2.2.1. Epidemiologia	20
2.2.2. Fatores de risco e carcinogênese	20
2.2.3. Caracterização histológica e estadiamento clínico.....	23
2.3. Modelos para estudo de melanoma	25
2.4. Progressão neoplásica e Transição epitélio-mesenquimal	27
2.4.1. Transição epitélio-mesenquimal e a linhagem melanocítica.....	30
2.5. Metformina.....	31
3. JUSTIFICATIVA e HIPÓTESE.....	32
4. OBJETIVOS	33
4.1. Objetivo geral.....	33
4.2. Objetivos específicos	33
5. MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1. Linhagens celulares.....	33
5.2. Descongelamento e expansão das linhagens celulares	34
5.3. Tratamento com metformina.....	34
5.4. MTT	35
5.5. Extração de RNA e transcrição reversa	35
5.6. PCR em tempo real - RT-qPCR	36
5.7. Ensaio de invasão - Matrigel.....	37
5.8. Ensaio de migração – cicatrização de feridas.....	38
5.9. Aspectos éticos do estudo <i>in vivo</i>	38

5.10. Inoculação das células B16-F10 em camundongos C57BL/6.....	39
5.11. Avaliação histopatológica e mensuração das metástases	40
5.12. Imuno-histoquímica.....	40
5.13. Análise Estatística	41
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÕES	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
9. ANEXOS	71
9.1. Ensaio de Cicatrização de feridas.....	71
9.2. Gráficos da expressão imuno-histoquímica.....	73
9.3. Aprovação Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG)	74
9.4. Produção científica	75

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o câncer de pele é o mais frequentemente diagnosticado, representando 30% das neoplasias malignas registradas. O melanoma, apesar de representar apenas 3% dessas neoplasias, possui grande importância clínica, pois é reconhecida como uma das principais causas de morte por câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; INCA, 2020). Esse tipo neoplásico, que é caracterizado pela proliferação anormal de melanócitos, pode acometer além da pele sítios como mucosas, trato uveal dos olhos e leptomeninges (SCHATTON; FRANK, 2008).

A homeostase dos melanócitos não neoplásicos é regulada principalmente pela interação com as células epiteliais de revestimento cutâneo, mediada pela molécula de adesão E-caderina (HSU et al., 1996). Durante a progressão dos melanomas, a perda da interação com células epiteliais é uma das etapas importantes para a aquisição de propriedades invasivas pelas células neoplásicas (ROBERT et al., 2006). Associado a reduzida expressão de E-caderina em melanócitos neoplásicos, pode ser observado também o ganho de expressão de N-caderina, que facilita a migração celular e resistência a apoptose (KUPHAL; BOSSERHOFF, 2012), características compatíveis com a ocorrência do processo de transição epitélio-mesenquimal (TEM) (HAO et al., 2012; KREIZENBECK et al., 2008).

A TEM consiste em uma série de alterações celulares, genótípicas e fenotípicas, que permitem a aquisição de características mesenquimais em células epiteliais, como o favorecimento de processos invasivos e/ou migratórios e que ocorre tanto em contextos fisiológicos como patológicos (NIETO et al., 2016). Nos contextos patológicos, destaca-se as neoplasias, onde a TEM desempenha importante papel na progressão e favorecimento da formação de metástases sendo que a compreensão de suas etapas, dos mecanismos de sinalizações celulares envolvidos e dos genes relacionados podem auxiliar tanto na caracterização prognóstica quanto na busca por novos alvos terapêuticos (GLOUSHANKOVA; ZHITNYAK; RUBTSOVA, 2018; NIETO et al., 2016).

Em melanomas, fenótipos similares a TEM, com redução da expressão de E-caderina e aumento de N-caderina, têm sido explorados, contudo, devido a origem embriológica dos melanócitos remeter a crista neural e estas células não serem consideradas tipicamente epiteliais ainda se debate o real papel deste processo na progressão dos melanomas (ARAZARENA; WELLBROCK, 2017). A diversidade histológica e molecular do melanoma também faz com

que os mecanismos associados a TEM em outras neoplasias nem sempre sejam compatíveis aos observados nesta neoplasia (KIM et al., 2013).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O MELANÓCITO

Os melanócitos figuram entre os tipos celulares com maior caracterização genética, principalmente devido a seu papel fundamental na pigmentação da pele, olhos e cabelo (BENNETT; LAMOREUX, 2003). Os estudos sobre pigmentação, e indiretamente sobre os melanócitos, remontam pelo menos até o início do século passado quando o biólogo francês Lucien Cuénot descreveu, a partir do cruzamento de camundongos albinos e pigmentados, a aplicabilidade da Lei de Mendel também no Reino Animalia (CUÉNOT, 1902).

A origem embriológica dos melanócitos remete a crista neural, onde durante o período embrionário tem-se a diferenciação e proliferação dos melanoblastos (LUCIANI et al., 2011; RAWLES, 1947), que em seguida delaminam da crista neural e iniciam um processo migratório ao longo da via dorsolateral em direção à derme (ERICKSON; GOINS, 1995; WILKIE; JORDAN; JACKSON, 2002). Em sequência tem-se a passagem dos melanoblastos da derme para a epiderme (LI et al., 2011), onde com a interação e estímulo pelos queratinócitos ocorre a diferenciação em melanócitos (STEEL; DAVIDSON; JACKSON, 1992; WILKIE; JORDAN; JACKSON, 2002).

Curiosamente, parte da população de melanoblastos permanece na derme, com atividade proliferativa e translocação para epiderme constante (LUCIANI et al., 2011). A população de melanoblastos pode ser encontrada também em folículos capilares e desempenhar papel de célula tronco melanocítica (NISHIMURA et al., 2002). Discute-se ainda a existência de mecanismos de controle da transição derme-epiderme dos melanoblastos, visto que mesmo em modelos experimentais com aumento do número de melanoblastos dérmicos a população de melanócitos não é alterada (VAN RAAMSDONK et al., 2004).

Na epiderme os melanócitos localizam-se na camada basal e apresentam morfologia ovoide a fusiforme, menores que os queratinócitos, com citoplasma amplo e processos dendríticos projetados para a camada espinhosa da epiderme (JIMBOW et al., 1976; SEIJI; FITZPATRICK, 1961). Estima-se uma razão de melanócitos/queratinócitos na camada basal de 1:5, sendo que por meio dos dendritos cada melanócito pode interagir com 30-40

queratinócitos das camadas superiores da epiderme, constituindo a “unidade de melanina epidérmica” (HAASS; HERLYN, 2005). Além da epiderme os melanócitos podem ser encontrados ainda em folículos capilares, trato uveal dos olhos e cóclea (CHATTON; FRANK, 2008).

A principal função atribuída aos melanócitos é a síntese de melanina, denominada melanogênese, um processo que consiste em uma série de reações oxidativas que gera diversas espécies reativas de oxigênio com atividade citotóxica (KOGA; NAKANO; TERO-KUBOTA, 1992; MASTORE; KOHLER; NAPPI, 2005; NAPPI; VASS, 1996; SIMON et al., 2009). O que elucida a necessidade da sua ocorrência em uma região isolada da célula, o melanossomo, organela citoplasmática cuja origem é associada tanto ao retículo endoplasmático (BASRUR et al., 2003) quanto ao complexo de Golgi ou endossomos (RAPOSO et al., 2001) e que apresenta o aparato enzimático necessário para a melanogênese (CHI et al., 2006; HU et al., 2007).

O processo de produção da melanina envolve 4 estágios de maturação dos melanossomos e conta com a ação da enzima tirosinase sobre a tirosina, que gera por diferentes vias a eumelanina (marrom a preta) e/ou a feomelanina (amarela a vermelha) (ITO; WAKAMATSU; OZEKI, 2000; LAMOREUX; WAKAMATSU; ITO, 2001). O melanossomo em seu estágio final de maturação, preenchido por melanina, migra pelos dendritos dos melanócitos e é liberado no citoplasma dos queratinócitos, onde é degradado e libera a melanina que forma uma espécie de cápsula perinuclear protegendo o núcleo da ação de raios ultravioleta (ANDO et al., 2012).

A interação melanócito/queratinócito, mediada por moléculas de adesão como a E-caderina (HSU et al., 1996), vai além da produção de melanina e estímulo a diferenciação ainda na fase embrionária. Nas fases adultas, o queratinócito é um dos principais tipos celulares responsáveis pela produção de fatores mitogênicos que regulam a proliferação dos melanócitos (HIROBE, 2011).

A proliferação dos melanócitos, após estabelecidos na epiderme, pode ser dividida em 4 fases: (1) dissociação, onde perdem a adesão aos queratinócitos adjacentes e membrana basal, além de reduzirem os dendritos; (2) divisão; (3) migração; (4) reassociação e extensão dos dendritos, onde se aderem novamente aos queratinócitos e membrana basal (HAASS; HERLYN, 2005).

2.2. MELANOMA

2.2.1. EPIDEMIOLOGIA

O câncer de pele representa o grupo de neoplasias com maior número de diagnósticos mundialmente, sendo no ano de 2020 estimados mais de 1,5 milhão de novos casos (ARNOLD et al., 2022). Essa lesão apresenta uma crescente incidência nas últimas décadas (LOMAS; LEONARDI-BEE; BATH-HEXTALL, 2012; MERRILL et al., 2015), e pode ser classificada em câncer de pele não-melanoma (carcinoma basocelular e carcinoma escamocelular, que acometem os queratinócitos), ou câncer de pele do tipo melanoma, que acomete os melanócitos.

Embora o melanoma represente o câncer de pele com menor frequência, se configura como a neoplasia de pele mais agressiva e que possui atualmente as maiores taxas de crescimento de sua incidência dentre outras neoplasias (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Tem sido descrito em crianças, adolescentes e jovens adultos um aumento de 250% em sua incidência nos últimos 40 anos (MITSIS et al., 2015). A incidência de melanoma é ainda cerca de 20 vezes maior em indivíduos brancos em relação aos indivíduos afro-americanos, sendo o risco de desenvolvimento de melanoma de 2,5% para brancos, 0,5% para hispânicos e 0,1% para afro-americanos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Além da pele, principal sítio onde é observado, o melanoma pode acometer também as mucosas, trato uveal dos olhos e leptomeninges (SCHATTON; FRANK, 2008).

Em 2020, o número estimado de novos casos de melanoma foi de 325.000 e de 57.000 óbitos no mundo, com as maiores incidências observadas na Austrália e Nova Zelândia e nos países do Norte e Leste Europeu (ARNOLD et al., 2022). Segundo os últimos dados epidemiológicos disponibilizados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) no Brasil em 2020 ocorreram 1923 óbitos em decorrência do melanoma (INCA, 2022) e para o triênio 2020-2022 foram estimados 8.450 novos casos/ano (INCA, 2019).

2.2.2. FATORES DE RISCO E CARCINOGENÊSE

Alguns dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de melanoma são pele e olhos claros, queimaduras solares/exposição excessiva a radiação solar, nevos melanocíticos e sardas, histórico familiar de melanoma e predisposição genética (INCA, 2015; LEBOIT et al., 2006).

Uma possível subclassificação dos melanomas os distingue de acordo com o envolvimento da exposição à radiação solar, estratificando-os em 2 subgrupos: 1) em pele com dano cronicamente induzido por radiação solar e 2) em pele sem danos induzidos por radiação solar (CANDIDO et al., 2014). As lesões do primeiro grupo estão associadas a sítios anatômicos com alta exposição solar (cabeça, pescoço, região dorsal de membros superiores), com sinais macro e microscópicos de exposição solar prolongada como a degeneração de fibras elásticas da derme (elastose solar), manifestação em indivíduos com mais de 55 anos e alta carga mutacional associada a radiação ultravioleta, especialmente nos genes $BRAF^{nonV600}$, $NRAS$ e NFI (neurofibrina 1) (BASTIAN, 2014; CURTIN et al., 2005). Enquanto as lesões do segundo grupo são associadas a indivíduos mais jovens (menos de 55 anos), áreas com menor exposição solar e sem sinais de elastose solar, menor carga mutacional, sendo as mutações encontradas principalmente no $BRAF^{V600}$ (BASTIAN, 2014; CURTIN et al., 2005).

De maneira geral a carcinogênese dos melanomas pode envolver nevos melanocíticos comuns/benignos, displásicos, melanoma *in situ* e melanoma invasivo. Uma lesão inicial genérica (nevo melanocítico comum adquirido) se manifesta pela proliferação focal e limitada de células benignas. O surgimento de proliferação anormal e citologia aberrante em meio a proliferação de células benignas caracteriza um nevo displásico. Com o crescimento expansivo, porém limitado a epiderme, e autonomia da proliferação celular tem-se o melanoma *in situ*, com crescimento horizontal. A incrementação de propriedades invasivas, com acometimento de camadas inferiores da derme e hipoderme caracteriza o melanoma invasivo, com crescimento vertical. E por fim, a manutenção de características favoráveis a migração e estabelecimento em sítios secundários configura o melanoma metastático (CLARK et al., 1984). Entretanto a complexidade que envolve os diferentes sítios anatômicos possíveis, subtipos de melanoma e a participação (ou não participação) de danos causados por exposição solar, fazem com que modelos idealizados de progressão neoplásica linear nem sempre retratem a realidade.

O melanoma sem associação a danos por radiação solar pode ter como precursores melanócitos susceptíveis a mutação $BRAF^{V600E}$, que leva a formação de nevos comuns (PATTON et al., 2005), progredindo para melanoma *in situ*, especialmente com padrão de crescimento pagetoide representado pela presença de células neoplásicas isoladas ou em ninhos em camadas superiores a basal da epiderme (VIROS et al., 2008), e subsequente melanoma invasivo, ou ainda melanócitos com outras cargas mutacionais (herdadas ou adquiridas) que levam a formação de nevos displásicos e seguem o mesmo caminho de progressão (SHAIN; BASTIAN, 2016).

Nos melanomas com associação a danos por radiação solar, os melanócitos podem acumular alterações que “dispensam” a formação dos nevos, promovendo o crescimento do melanoma *in situ* com padrão de crescimento lentiginoso (SHITARA et al., 2014). Essa lesão é caracterizada pela presença de melanócitos neoplásicos isolados, e não em ninhos, na camada basal da epiderme, que eventualmente podem adquirir características invasivas. É possível ainda que melanócitos com cargas mutacionais pré-existentes (herdadas ou adquiridas), ao sofrerem danos pela radiação solar, promovam proliferações melanocíticas que darão origem a melanomas invasivos (SHAIN; BASTIAN, 2016).

Uma das principais vias envolvidas na proliferação celular, e frequentemente alterada nos melanomas, é a via das proteínas quinase ativada por mitógeno/quinase regulada por sinais extracelulares (MAPK/ERK). Nesta via, a ligação de uma molécula de sinalização extracelular, como os fatores de crescimento, a receptores de tirosina-quinase (RTKs) promove a ativação de GTPases da família RAS (HRAS, KRAS ou NRAS) através da ligação com o GTP. A RAS ativada interage com as quinases citoplasmáticas de serina/treonina da família RAF (ARAF, BRAF, CRAF), promovendo a fosforilação e dimerização da RAF, que passa então a ter atividade quinase e fosforila proteínas quinase da família MEK (MEK1 e MEK2). A MEK ativada tem atividade quinase dupla, o que permite a dupla fosforilação das proteínas ERK, etapa essencial para que ERK seja ativada e possa translocar para o núcleo, onde, além de desempenhar papel de fator de transcrição, tem também ação ativadora sobre outros fatores de transcrição, sendo estimulada a expressão de genes que promovem a proliferação celular (BUROTTO et al., 2014; DANKNER et al., 2018; MCCAIN, 2013).

A mutação $BRAF^{V600E}$, mais frequente nos melanomas, é caracterizada pela substituição de uma timina por uma adenosina no nucleotídeo 1796, o que leva a alteração no códon 600, do aminoácido valina pelo ácido glutâmico (DAVIES et al., 2002). Essa alteração promove a interação entre os aminoácidos codificados pelos códons V600E e K507, levando a um efeito fosfomimético onde a conformação da proteína mutada é similar a proteína dimerizada, que é a forma ativa (LAVOIE; THERRIEN, 2015). Assim a mutação $BRAF^{V600E}$ ativa a parte final da cascata de sinalização MAPK/ERK mesmo na ausência da ligação de fatores de crescimento à célula, o que aumenta a sua capacidade proliferativa (GARNETT; MARAIS, 2004).

As principais mutações observadas em *NRAS* ocorrem nos códons 61, 12 e 13 (CURTIN et al., 2005) e promovem alterações conformacionais que levam tanto a uma ativação constante da proteína ($NRAS^{Q61R/K/L}$) quanto a insensibilização da proteína aos sinais inibitórios de sua

função (*NRAS*^{G12D} e *NRAS*^{G13D}) (FEDORENKO; GIBNEY; SMALLEY, 2013). Em ambos os casos a partir destas mutações ocorre o estímulo constante para a sequência da via MAPK/ERK e consequente proliferação (DROSTEN et al., 2010; MUÑOZ-COUSELO et al., 2017).

A neurofibromina 1, codificada pelo gene *NF1*, é responsável dentre outras funções pela conversão das proteínas GTPases da família RAS do seu estado ativo para o inativo (KLOSE et al., 1998). Mutações no gene *NF1* podem resultar em proteínas truncadas, não-funcionais ou expressão reduzida o que prejudica a inativação das proteínas RAS e leva a ativação exacerbada da via MAPK, promovendo a proliferação celular (LARRIBÈRE; UTIKAL, 2016).

2.2.3. CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E ESTADIAMENTO CLÍNICO

O melanoma representa tanto a neoplasia de pele associada a maior mortalidade, quanto a que oferece um maior desafio ao patologista para realização do diagnóstico, devido a heterogeneidade histológica que pode apresentar entre os diferentes subtipos (SMOLLER, 2006).

Uma caracterização “basal” dos padrões encontrados envolve a presença, na epiderme e/ou derme papilar, de ninhos de melanócitos, apresentando anisocitose e pleomorfismo celular, com morfologia fusiforme ou epitelióide, citoplasma abundante e núcleos alongados ou ovalados e nucléolos evidentes. Pode ser observada ainda a presença de melanócitos neoplásicos em camadas da epiderme superiores a basal, configurando o crescimento pagetoide. A atividade desmoplásica, presença de fibras colágenas entremeando as células neoplásicas, também pode ser observada, principalmente nos casos de morfologia fusiforme. Em casos de crescimento mais acentuado, o crescimento vertical, a massa de células neoplásicas pode comprometer camadas mais profundas, como a derme reticular e hipoderme (KIBBI; KLUGER; CHOI, 2016).

A partir da caracterização histopatológica o melanoma pode ser classificado em 4 subtipos: 1) extensivo superficial: subtipo mais prevalente, associado a exposição solar intermitente e nevos melanocíticos, sendo observados ninhos de melanócitos epitelióides na junção dermoepidérmica e crescimento pagetoide; 2) lentigo maligno: associado a exposição solar crônica e elastose solar, é composto por proliferação de melanócitos atípicos em padrão lentiginoso, inicialmente isolados e posteriormente em ninhos na junção dermoepidérmica, pode apresentar ulcerações durante a fase de crescimento vertical; 3) nodular: apresenta-se como lesão elevada, com crescimento vertical e raros componentes *in situ*, sendo o principal

subtipo invasor e frequentemente ulcerados; 4) lentiginoso acral: subtipo mais comum em afrodescendentes, asiáticos e hispânicos, possui evolução lenta e acomete regiões de pele glabra e adjacentes dos dedos, palmas e plantas, apresenta proliferação de melanócitos atípicos hiperpigmentados, descontínuos e em padrão pagetoide (BRADFORD et al., 2009; DUNCAN, 2009; MARKOVIC et al., 2007).

Existem ainda variantes histológicas não usuais, com baixa frequência e morfologia incomum, dentre elas o melanoma de células balonizadas, onde as células neoplásicas apresentam amplo citoplasma claro provavelmente devido a processos degenerativos dos melanosomos, lipídeos ou glicogênio; melanoma mixóide, que apresenta arquitetura lobular, com células neoplásicas pequenas, estreladas, fusiformes ou grandes e epitelióides dispostas isoladas, em cordões ou como estruturas pseudoglandulares; e melanoma de células em anel de sinete, apresentação mais observada em metástases mas que também pode ocorrer nos tumores primários.

Dois importantes parâmetros para avaliação e prognóstico do melanoma podem ser obtidos a partir da avaliação histopatológica, o nível de Clark e o índice de Breslow. Na classificação proposta por Clark e colaboradores em 1969, o tumor é estratificado nos seguintes níveis: I) crescimento intraepidérmico; nível II) invasão da derme papilar; nível III) comprometimento da junção derme papilar/derme reticular; nível IV) invasão da derme reticular; nível V) invasão do tecido subcutâneo, sendo observado que quanto maior o nível do tumor menor a sobrevida do paciente (CLARK et al., 1969). A avaliação proposta por Alexander Breslow em 1970 consiste na mensuração, em milímetros, da espessura do tumor, que é determinada pela distância entre a superfície da pele e a célula neoplásica mais profunda, parâmetro que também apresentou importância prognóstica e se correlaciona com os níveis de Clark (BRESLOW, 1970). Atualmente o índice de Breslow é mais utilizado, sendo o nível de Clark adotado apenas em tumores com espessura <1mm (BALCH et al., 2001).

Além da classificação histológica e parâmetros de Clark e Breslow outra importante ferramenta para avaliação prognóstica é o estadiamento clinicopatológico segundo o sistema TNM, padronizado pelo *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, na oitava edição do *AJCC Cancer Staging Manual*.

Na categoria T (tumor), avalia-se o tamanho da lesão e a presença de úlceras, sendo T1a se <0,8mm sem ulceração, T1b se <0,8mm com úlceras, ou entre 0,8-1,0mm com ou sem úlceras; T2: se >1 a 2mm; T3: se >2 a 4mm e T4: se >4mm. As categorias T2, T3 e T4 recebem

ainda a subclassificação adicional “a” quando sem úlceras, ou “b” quando ulcerados (GERSHENWALD et al., 2017). A classificação sobre o estado ulcerativo da lesão se faz importante visto que a sobrevivência de pacientes com tumores ulcerados é semelhante à de pacientes com tumores não ulcerados em um estágio acima no que se refere ao tamanho da lesão (INTHOUT et al., 2012).

Na categoria N se avalia o número de linfonodos que realizam a drenagem linfática da região acometidos por metástases, sendo N0: ausência de metástases linfonodais; N1: 1 linfonodo acometido; N2: 2 a 3 linfonodos; N3: 4 ou mais linfonodos. Além disso tem-se a subclassificação em “a” quando metástases clinicamente indetectáveis (diagnóstico realizado apenas pela biópsia) ou em “b” quando metástases clinicamente detectáveis (BALCH et al., 2010). Já na categoria M avalia-se a presença (M1) ou ausência (M0) de metástases a distância, com a subclassificação a depender do sítio acometido pela metástase, sendo M1a para metástase em pele distante, tecidos moles incluindo músculo e linfonodos não-regionais; M1b para pulmão; M1c para outros órgãos exceto sistema nervoso central e M1d para sistema nervoso central (GERSHENWALD et al., 2017).

2.3. MODELOS PARA ESTUDO DE MELANOMA

Com a necessidade de melhor compreensão sobre o comportamento biológico do melanoma modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* são utilizadas tanto para avaliação da eficácia de drogas com potencial antineoplásico quanto na elucidação de prováveis mecanismos envolvidos na biologia tumoral.

O estudo de linhagens celulares de melanoma humano teve início em 1914, com as primeiras tentativas praticadas por Montrose T. Burrows em New York. Contudo, os primeiros relatos de cultivos realizados com sucesso datam de 1966 por Brown e colaboradores, e 1967 com o estabelecimento de 8 linhagens por Romsdahl e Hsu (GERNER; KITAMURA; MOORE, 1975). O estudo de linhagens provenientes de animais de experimentação também se iniciou neste período, com linhagens derivadas de hamster sendo estabelecidas em 1957 e 1961, e derivadas de camundongos em 1966 (GERNER; KITAMURA; MOORE, 1975).

As linhagens celulares humanas são obtidas a partir do isolamento e cultivo de células neoplásicas de tumores espontâneos, criando assim uma ampla diversidade de linhagens de melanoma disponíveis, com diferentes genótipos e fenótipos. Dentre as principais linhagens humanas utilizadas atualmente encontram-se: 1205 Lu, A-375, MeWo e Sk-Mel e suas

sublinhagens. As linhagens murinas são derivadas tanto de tumores espontâneos quanto induzidos, sendo as principais a linhagem K1735 (induzida por radiação ultravioleta em camundongos C3H), Cloudman S91-M3 (desenvolvimento espontâneo em camundongos DBA/2) e B16 (desenvolvimento espontâneo em camundongos C57BL/6).

A linhagem A-375 foi isolada em 1973 por Donald J. Giard, a partir do melanoma cutâneo de uma mulher de 54 anos (GIARD et al., 1973). Apesar de ser originada de um tumor primário a linhagem A-375 é considerada altamente agressiva, visto sua capacidade de gerar metástases pulmonares quando xenotransplantada para camundongos imunocomprometidos (CLARK et al., 2000). Geneticamente ela também é considerada um bom modelo para estudo do melanoma por apresentar a mutação *BRAF*^{V600E}, que é encontrada em mais de 50% dos melanomas metastáticos (PARMENTER et al., 2014).

A linhagem B16 é o principal modelo singênico de melanoma utilizado atualmente (KUZU et al., 2015). Essa linhagem foi obtida por Isaias J. Fidler em 1973 a partir da coleta de células de um tumor subcutâneo primário de camundongo C57BL/6, que foram então cultivadas *in vitro* e denominadas B16F0, após expansão foram inoculadas por via intravenosa em outros camundongos e a partir dos nódulos metastáticos formados no pulmão novas células foram coletadas, a linhagem B16F1. Estes procedimentos foram repetidos até se obter a linhagem B16-F10, que apresenta alta capacidade metastática e agressividade (FIDLER, 1973; NICOLSON; BRUNSON; FIDLER, 1978). As células B16-F10 não apresentam mutações em nenhum dos três principais genes mutados nos melanomas, *Braf*, *Nras* e *Nf1*, mas sim no *TP53*, fato provavelmente relacionado ao fato desta neoplasia espontânea não ser associada com exposição à radiação ultravioleta (ZHONG et al., 2020), sendo de certa forma equivalente aos melanomas em pele sem danos induzidos por radiação solar, que possuem menor carga mutacional e um modelo de estudo para os melanomas TP53 mutantes ou triplo-negativos (AKBANI et al., 2015).

As células B16-F10 são utilizadas em dois principais modelos, o de metástases espontâneas, com inoculação subcutânea das células, e de metástases experimentais, com inoculação intravenosa (POSTE et al., 1980). Apesar do modelo de metástases espontâneas apresentar maior similaridade com a clínica, o modelo de metástases experimentais é mais utilizado devido à sua maior reprodutibilidade e menor tempo necessário para desenvolvimento de metástases (NAKAMURA et al., 2002).

2.4. PROGRESSÃO NEOPLÁSICA E TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL

As células epiteliais e mesenquimais apresentam diferenças tanto morfológicas quanto funcionais e proteômicas. O epitélio funciona como barreira de permeabilidade, definindo órgãos e tecidos, sendo assim composto geralmente por uma única camada de células, que se dispõe uniformemente, apresentam polaridade basal-apical, diferentes complexos de adesão e comunicação celular, como junções aderentes e comunicantes, desmossomas e zônulas oclusivas, que garantem a integridade e rigidez do epitélio como estrutura (HUANG; GUILFORD; THIERY, 2012). Já as células mesenquimais são associadas a formação dos tecidos conjuntivos e não apresentam processos de organização ou adesão celular tão estruturados quanto as células epiteliais, apresentam morfologia fusiforme e não possuem polaridade basal-apical (SHOOK; KELLER, 2003). As diferenças estruturais entre as células epiteliais e mesenquimais impactam na capacidade migratória de cada tipo celular. Por estarem fortemente aderidas as células epiteliais se movimentam em blocos ou camadas, enquanto as células mesenquimais tem um potencial mais dinâmico de migração, podendo migrar de maneira mais individualizada (LEE et al., 2006).

Os primeiros relatos sobre o potencial de células epiteliais adquirirem características mesenquimais foram realizados por Gary Greenburg e Elizabeth Hay em 1982 ao observarem essas alterações fenotípicas em células tanto embrionárias quanto já bem diferenciadas (GREENBURG; HAY, 1982), levando a proposição da ocorrência da “transformação epitelial-mesenquimal” (HAY, 1995), termo que ao longo dos anos foi substituído por transição epitélio-mesenquimal (TEM), para retratar a plasticidade e dinamicidade do fenômeno.

A TEM é desencadeada em resposta a fatores de sinalização que estimulam a expressão de fatores de transcrição, mi-RNAs e reguladores epigenéticos e pós-traducionais que por sua vez irão promover alterações genotípicas e fenotípicas que conferem as células epiteliais características de células mesenquimais, favorecendo processos migratórios, invasivos e resistência a apoptose (FORONI et al., 2012; NIETO et al., 2016; SIGURDSSON et al., 2011; THIERY et al., 2009). A TEM é associada a fenômenos tanto fisiológicos, como desenvolvimento embriológico e cicatrização de feridas, quanto patológicos como processos fibróticos e neoplásicos (NIETO et al., 2016).

Para a ocorrência da TEM uma das principais alterações que a célula sofre é a alteração do padrão de adesão celular, permitindo que alterações morfológicas e de capacidade migratória ocorram. A adesão celular ocorre pela ligação intercelular ou célula-matriz e é mediada por

moléculas de adesão celular (CAM's), que são glicoproteínas transmembranares com domínio extracelular cálcio-dependente, como as caderinas, integrinas, selectinas, mucinas e a superfamília de imunoglobulinas (GUAN, 2015).

No contexto da TEM essa alteração da adesão celular é caracterizada principalmente pela “*cadherin switch*”, que é a redução da expressão de marcadores epiteliais, como a E-caderina e aumento da expressão de marcadores mesenquimais, como a N-caderina (HAO et al., 2012). As caderinas são responsáveis pela adesão celular a partir da interação homofílica entre proteínas de células adjacentes, sendo a E-caderina expressa em células epiteliais e a N-caderina em células mesenquimais (ALIZADEH; SHIRI; FARSINEJAD, 2014).

A E-caderina (caderina 1, caderina epitelial, CAM120/80 ou CD324) é codificada pelo gene *CDH1*, ortólogo em humanos e camundongos, localizado no braço longo do cromossomo 16 (16q22.1) em humanos e no cromossomo 8 em camundongos. Em ambas as espécies o gene apresenta 16 éxons, sendo a proteína humana composta por 882 aminoácidos e a murina por 884. A E-caderina apresenta 5 regiões (EC1-EC5) que funcionam como sítio de ligação para íons de Ca^{2+} e proteínas do citoesqueleto (PRIEST; SHAFRAZ; SIVASANKAR, 2017).

A N-caderina (caderina 2, caderina neural ou CD325) é codificada pelo gene *CDH2*, também ortólogo em humanos e camundongos, localizado no cromossomo 18 em camundongos e no braço curto do cromossomo 18 em humanos (18q12.1), apresentando 17 e 19 éxons em camundongos e humanos, respectivamente. A proteína em ambas as espécies é composta por 906 aminoácidos e apresenta 5 sítios de ligação para íons de Ca^{2+} e proteínas do citoesqueleto (SHAPIRO et al., 1995).

A TEM em células neoplásicas acomete principalmente as células da frente tumoral promovendo maior capacidade invasiva e migração via circulação sanguínea e linfática que favorece a formação de metástases distantes. Após implantadas, por vezes, estas células retomam ao seu perfil epitelial por meio da transição mesenquimal-epitelial para adesão e crescimento (ACLOQUE et al., 2009; WANG; ZHOU, 2011).

A ocorrência da “*cadherin switch*” é um dos fenômenos que favorece a progressão neoplásica, sendo que a redução da expressão de E-caderina favorece a invasão estromal podendo ser considerada um marcador de malignidade em diferentes neoplasias (BERX; ROY, 2001; FURUKAWA et al., 1997). O aumento da expressão de N-caderina, além de também facilitar a invasão ao promover a adesão a células endoteliais é responsável ainda pela ativação

de vias anti-apoptóticas, como a Akt/PKB, e inativação de vias pró-apoptóticas associada a proteína *B cell lymphoma 2* - BCL-2 (LI; SATYAMOORTHY; HERLYN, 2001).

Devido ao aspecto transiente da TEM diversos autores têm observado a ocorrência da TEM “parcial”, onde nem sempre as células ao passarem por este processo adquirem características completas de células mesenquimais, gerando células com fenótipo híbrido entre o status epitelial e mesenquimal (JORDAN; JOHNSON; ABELL, 2011; NIETO et al., 2016; YU et al., 2013).

Células neoplásicas que passem pela TEM parcial e mantenham características epiteliais e mesenquimais, o fenótipo híbrido, podem apresentar ainda outras vantagens, permitindo por exemplo que as células migrem de maneira individualizada ou coletiva (ARMSTRONG et al., 2011; GARG, 2017). Na migração celular coletiva as células mantêm a interconectividade, atividade de citoesqueleto coordenada, polaridade celular coletiva, além de maior resistência a apoptose (ETIENNE-MANNEVILLE, 2014; MROZIK et al., 2018), o que aumenta o risco de formação de metástases (GROSSE-WILDE et al., 2015) e representa pior prognóstico (GRIGORE et al., 2016).

A regulação da expressão de moléculas relacionadas a TEM é mediada principalmente por fatores de transcrição, que atuam inibindo a expressão de genes do perfil epitelial e estimulando genes do perfil mesenquimal. Os principais fatores de transcrição envolvidos na TEM pertencem as famílias *Zinc-Finger E-box Binding* (ZEB1 e ZEB2), *Snail* (Snail, Slug, Smuc) e *Basic Helix-Loop-Helix* (Twist1 e Twist2) (DENECKER et al., 2014; PEINADO; OLMEDA; CANO, 2007). Os fatores de transcrição ZEB1 e ZEB2 já foram associados ao estímulo da TEM em diversas neoplasias, incluindo os melanomas (ASHRAFIZADEH et al., 2020).

A desdiferenciação celular promovida pela TEM associada aos mecanismos moleculares envolvidos na sua regulação conectam este fenômeno as *cancer stem cells* (CSC's) (LORET et al., 2019; TANABE et al., 2020). As CSC's são células que permanecem na fase estacionária do ciclo celular e apresentam resistência a radioterapia e quimioterapia, capacidade de autorenovação e diferenciação, além de alta capacidade metastática mesmo estando em reduzido número na população de células neoplásicas (ISHIWATA, 2016; SATO et al., 2016). Estas células apresentam ainda a expressão de marcadores responsáveis pela manutenção das características de “*stem cells*”, os *stemcells factors*, dentre eles *sex determining region Y-box* (SOX2, SOX9 e SOX10), *Octamer-binding transcription factor 4* (Oct3/4), *Krüppel-like factor 4* (KLF4), *v-myc avian*

myelocytomatosis viral oncogene homolog (c-Myc), *hes family bHLH transcription factor 1 (Hes1)* e *Nanog homeobox (NANOG)* (VLASHI; PAJONK, 2015). A resistência a quimioterápicos observada nos melanomas é associada a presença de CSCs (SHIBUE; WEINBERG, 2017; SZTILLER-SIKORSKA et al., 2012).

2.4.1. TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL E A LINHAGEM MELANOCÍTICA

A TEM fisiológica que ocorre durante a embriogênese é um dos fenômenos que auxilia na migração dos melanoblastos da crista neural para a derme, onde após estabelecidos eles irão migrar para a epiderme e se diferenciar em melanócitos (TUCKER, 2004). A expressão de E-caderina em melanócitos maduros em seu estado fisiológico é amplamente retratada na literatura (FANG; HERLYN, 2006; KIM et al., 2013), visto o papel desta proteína na interação com os queratinócitos e manutenção da homeostase (NISHIMURA et al., 1999). A expressão de N-caderina nos melanócitos em seu estado fisiológico continua em discussão, mas já existem evidências de que os melanócitos saudáveis também podem expressar N-caderina (KIM et al., 2013).

Existem trabalhos demonstrando que a linhagem A-375 não possui, comparativamente, expressão de E-caderina enquanto a expressão de N-caderina é alta (AMSCHLER et al., 2019). Na linhagem B16-F10, tanto a expressão de E-caderina quanto de N-caderina já foram observadas (LIANG et al., 2015; PARK et al., 2014).

A TEM em melanócitos neoplásicos é um dos fenômenos associados a progressão dos melanomas (ALONSO et al., 2007; KRENGEL et al., 2004), mas ainda controverso devido a heterogeneidade celular intrínseca do melanoma e a sua origem não epitelial, fazendo com que as modificações relacionadas a TEM nos melanomas não sigam os mesmos padrões observados em outras neoplasias (KIM et al., 2013). Acredita-se que a redução da expressão de E-caderina reduz a interação melanócito/queratinócito, permitindo a proliferação desordenada e invasão das células neoplásicas (HAASS; HERLYN, 2005; ROBERT et al., 2006). A ocorrência da “*cadherin switch*” é observada nos melanomas principalmente na transição da fase de crescimento horizontal (não-invasivo) para vertical (invasivo) (KUPHAL; BOSSERHOFF, 2012; MILLER; MIHM, 2006), etapa que confere pior prognóstico ao paciente. (KREIZENBECK et al., 2008; TUCCI et al., 2007).

2.5. METFORMINA

A metformina pertence à classe das biguanidas, que são derivadas da guanidina, extraída da planta *Galega officinalis* (WERNER; BELL, 1922), e é considerada um agente normoglicemiante, sendo que sua primeira utilização no tratamento da diabetes data de 1957 na França (STERNE, 1957). Atualmente estima-se que cerca 450 milhões de pessoas vivam com diabetes no mundo, sendo que destas aproximadamente 70% fazem uso diário da metformina (GOMES et al., 2019). Este medicamento figura ainda na lista de medicamentos essenciais da OMS (BAILEY, 2017) e do Brasil, garantindo sua distribuição gratuita aos pacientes (BRASIL, 2020).

Estudos epidemiológicos conduzidos por Evans e colaboradores na Escócia demonstraram que pacientes diabéticos tratados com metformina possuíam menor risco para o desenvolvimento de neoplasias em comparação a pacientes diabéticos tratados com outros medicamentos (EVANS et al., 2005). A mortalidade em decorrência do câncer em pacientes diabéticos tratados com metformina também foi demonstrada como sendo menor do que nos pacientes diabéticos sob outros tratamentos (BOWKER et al., 2006). A partir destas observações alguns grupos de pesquisa começaram a investigar a potencial ação antineoplásica da metformina, existindo atualmente mais de 250 ensaios clínicos que abordam estes efeitos em diferentes neoplasias, e diferentes resultados favoráveis demonstrando o aumento da sobrevida dos pacientes e/ou redução de massa tumoral especialmente quando do uso da metformina em combinação com outros agentes antineoplásicos (BUCZYŃSKA et al., 2022; SARAEI et al., 2019)

Diversos estudos apontam a capacidade da metformina de inibir o crescimento, a sobrevivência e formação de metástases em diferentes tipos tumorais, como neoplasias da mama, fígado, pâncreas, rins, pulmão, ósseas, endometriais e colorretais (PODHORECKA; IBANEZ; DMOSZYŃSKA, 2017), sendo seus efeitos considerados diretos quando derivam da ativação de vias que levam a alteração da expressão gênica, ou indiretos quando relacionados a alteração da disponibilidade energética e/ou resistência periférica a insulina (LV; GUO, 2020).

Um dos efeitos associados a metformina é a inibição da TEM em neoplasias colorretais, endometriais, hepáticas e de tireoide, observado tanto *in vitro* quanto *in vivo* (HAN et al., 2015; QIANG et al., 2019; WANG; WU; HU, 2018; ZHANG; WANG, 2019; ZHANG et al., 2019). Wang e colaboradores observaram inclusive que pacientes diabéticos com câncer colorretal em uso de metformina apresentaram tumores com menor frequência de TEM (maior expressão de

E-caderina e menor de vimentina), e menor comprometimento de linfonodos por metástases em relação àqueles que não usavam metformina, além disso o uso de metformina também foi associado a maior tempo de sobrevida livre de doença e sobrevida global (WANG; WU; HU, 2017). Os efeitos da metformina sobre a TEM também foram observados *in vitro* em linhagens humanas e murinas de melanoma, reduzindo inclusive a motilidade, migração e invasão das células neoplásicas (CEREZO et al., 2013; LIANG et al., 2015; PEPPICELLI et al., 2015, 2016).

Dentre os mecanismos de ação da metformina tem-se sua atuação na mitocôndria sobre o complexo I da cadeia respiratória inibindo a respiração celular, o que promove o desbalanceamento energético da célula e culmina na ativação do gene supressor de tumor *LKB1* e da AMPK (SALVATORE et al., 2020), que dentre outras funções inibe a mTOR, complexo capaz de estimular diferentes vias que estimulam a proliferação celular e é associada a processos carcinogênicos (HASANVAND, 2022; ZOU et al., 2020). Existem evidências também de que a metformina, isoladamente, pode inibir perfis migratórios de células neoplásicas *BRAF* e *NRAS* mutantes, ação que é potencializada com o uso de outros inibidores da via MAPK (RYABAYA et al., 2019), sendo estas importantes vias na progressão do melanoma e indução da expressão dos fatores de transcrição indutores da TEM (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014).

3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A compreensão da biologia e progressão tumoral sempre se faz necessária, em especial ao se tratar de neoplasias altamente agressivas como o melanoma. Mesmo sendo um fenômeno reconhecidamente ligado a progressão tumoral em diversos contextos o papel e regulação da TEM nos melanomas ainda não é totalmente esclarecido, visto que este tipo celular apesar de compartilhar características com as células epiteliais não pode ser considerado um tipo de célula epitelial, assim apesar de já ser relatada na linhagem melanocítica sua associação com a progressão neoplásica permanece em discussão. Compreender este importante mecanismo da progressão tumoral pode facilitar o desenvolvimento de novas terapias. Desta forma, neste trabalho, pretendeu-se avaliar a ocorrência e efeitos da TEM em modelo de melanoma *in vitro* e *in vivo*, e os efeitos da droga metformina sobre esse fenômeno. Sugere-se que a transição epitélio-mesenquimal ocorre no melanoma, sendo responsável pela disseminação metastática e, que a mesma pode ser inibida por ação da metformina, como já observado em outros tipos de neoplasias epiteliais malignas.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão gênica e proteica de marcadores envolvidos na transição epitélio-mesenquimal (TEM) e sua relação com a formação de metástases em modelos *in vitro* de melanoma humano (células A-375) e murino (células B16-F10) e, *in vivo* de melanoma murino, a partir da sua inibição por tratamento *in vitro* com metformina.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a viabilidade celular das linhagens A-375 e B16-F10 submetidas ao tratamento com 0,5 mM e 5 mM de metformina;
2. Investigar os efeitos *in vitro* do tratamento com 0,5 mM e 5 mM metformina em células A-375 e B16-F10, sobre a migração e invasão celular;
3. Avaliar a expressão gênica dos marcadores de transição epitélio-mesenquimal: E-caderina, N-caderina, ZEB1, ZEB2, Snail e miR-200c e dos marcadores de indiferenciação celular OCT3/4 e Nanog por RT-qPCR em células A-375 e B16-F10 submetidas ao tratamento com 0,5 mM e 5 mM de metformina;
4. Quantificar e mensurar as metástases pulmonares em camundongos C57BL/6 após a inoculação de células B16-F10 submetidas ao tratamento prévio *in vitro* com 0,5 mM e 5 mM de metformina.
5. Avaliar a expressão proteica tecidual dos marcadores de transição epitélio-mesenquimal: E-caderina, N-caderina, ZEB1, ZEB2, Twist, Vimentina; de diferenciação: Sox-10 e Nanog; e de proliferação celular: CDC47, nas metástases pulmonares de camundongos C57Bl/6 inoculados com as células B16-F10 submetidas ao tratamento prévio por 24 horas com 0,5 mM e 5 mM de metformina.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. LINHAGENS CELULARES

Foram utilizadas as células A-375 de melanoma humano de sítio primário, gentilmente cedidas pelo pesquisador Adam Underwood da Universidade de Walsh (North Canton/Ohio/EUA); e as células B16-F10 de melanoma metastático oriunda de camundongos

C57BL/6, gentilmente cedidas pela pesquisadora Adriana Abalen Martins Dias do Laboratório de Inflamação e Câncer do ICB/UFMG, ambas provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA). Após a expansão e antes do congelamento do estoque das células, elas foram testadas para micoplasma (PCR), e só foram estocadas após resultado negativo para micoplasma.

As células foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A), e 1% de penicilina sódica + estreptomicina (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A), e mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ no Laboratório do Comportamento Celular (LCC). Para realização dos experimentos as células foram utilizadas quando apresentavam cerca de 70% de confluência.

5.2. DESCONGELAMENTO E EXPANSÃO DAS LINHAGENS CELULARES

Para expansão e realização dos experimentos, alíquotas das linhagens celulares previamente congeladas e armazenadas a -80°C foram descongeladas, transferidas para tubo Falcon com 5 mL de meio DMEM e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, em seguida procedeu-se com o descarte do sobrenadante, ressuspensão com 10 mL de meio completo e transferência para placa de 100 mm, que foram incubadas em estufa nas condições já descritas. Durante esta fase de expansão o crescimento das células foi acompanhado diariamente, com troca do meio a cada 24 horas.

Após as células atingirem confluência de 70-80% retirou-se o meio e as células foram lavadas com 5 mL de PBS estéril por 2 vezes. Foram adicionados então 2 mL de tripsina a 0,25% (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A) e as placas incubadas por 2 minutos em estufa 37 °C. Com o desprendimento da monocamada de células adicionou-se 5 mL de meio completo para inativação da tripsina e as células foram centrifugadas e ressuspensas em DMEM. Para contagem das células 50 µL de meio foram retirados e utilizou-se a câmara de Neubauer e azul de tripan. Após a contagem realizou-se o plaqueamento em placas e volumes necessários para cada experimento.

5.3. TRATAMENTO COM METFORMINA

Ao realizar o plaqueamento para os experimentos, em triplicata e em três experimentos independentes, utilizou-se DMEM com SFB a 5% e 1% de penicilina sódica + estreptomicina.

Para o MTT utilizou-se placas de 96 poços, sendo plaqueadas 5.000 células por poço, e para a extração de RNA placas de 12 poços, com 75.000 células por poço. Após 24 horas do plaqueamento, nas placas/poços do controle foi realizada apenas a troca do DMEM e nas placas/poços dos tratados foi adicionada DMEM com SFB a 5% e 1% de penicilina sódica + estreptomicina contendo a metformina diluída nas concentrações de 0,5 mM e 5 mM. Nas placas de 96 poços foram adicionados 100 µL de DMEM e nas de 12 poços 500 µL. A escolha das concentrações de metformina a serem utilizadas foi baseada na literatura (CEREZO et al., 2013; LIANG et al., 2015).

5.4. MTT

Para avaliar possíveis efeitos da metformina sobre a viabilidade celular utilizou-se o ensaio de MTT. Decorridas 24 e 48 horas da adição da metformina o meio foi retirado e adicionou-se 100 µL de 3-(4,5-dimethylthi-azol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 10% diluído em DMEM. A placa foi então envolta em papel alumínio e incubada por 4 horas em estufa 37 °C. Após findado o tempo de incubação procedeu-se com a retirada do MTT e adição de dimetilsulfóxido (DMSO) para lise das células e liberação do cristal de formazan oriundo da metabolização do MTT. A leitura da absorbância foi realizada em aparelho leitor de microplacas (SpectraMax 190 absorbance microplate reader, Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA.) em 570 nm. Com a obtenção dos valores de absorbância foi realizado a correção com a subtração da leitura do branco e determinação do percentual de viabilidade celular sendo o valor de absorbância encontrado para o controle a base determinada como 100%.

5.5. EXTRAÇÃO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA

Para avaliar a expressão gênica de *CDH1*, *CDH2*, *ZEB1*, *ZEB2*, *SNAIL*, *OCT3/4*, do miR-200c e do normalizador *GAPDH* realizou-se a extração do RNA total das células A-375 e B16-F10 controle (sem tratamento) e tratadas 24 horas após a adição da metformina nas concentrações de 0,5 mM e 5 mM.

O meio foi retirado dos poços seguido da adição de 1000 µL de Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) ao primeiro poço da triplicata, seguido de diversas “lavagens” com o próprio Trizol para remoção de todas as células, o volume foi então transferido para o segundo poço da triplicata e o processo anterior repetido até a coleta do terceiro poço. Ao final, o volume total de 1000 µL foi transferido para *ependorfs* de 2 mL

(Livre de DNase e RNase) e armazenado em gelo. Procedeu-se com a extração do RNA total de acordo com o protocolo do reagente Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A integridade e concentração do RNA foram avaliadas por meio da quantificação em NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA).

Para síntese do cDNA realizou-se a transcrição reversa com o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), sem modificações, com volume final da reação de 20 µL. O mix foi então submetido a incubação de 10 minutos a 25 °C seguido de 2 horas a 37 °C e por fim 5 minutos a 85 °C no termociclador MiniAmp™ Plus Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, EUA). As condições da reação estão especificadas na Tabela 1.

Tabela 1. Reagentes RT-PCR. Descrição da concentração e quantidade dos reagentes utilizados para realização da transcrição reversa. *As concentrações de RNA após a extração e quantificação eram variáveis sendo assim pipetado volume variável entre as amostras para corresponder ao total de 500 ng. **A quantidade de água tratada com DEPC utilizada variou de acordo com a quantidade de amostra, para normalizar o volume final em 20 µL.

MIX	Volume
10X RT Buffer	2 µL
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 µL
10X RT Random Primers	2 µL
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µL
RNase Inhibitor	1 µL
Água tratada com DEPC	3,2 µL
Amostra (500 ng)	*
Água tratada com DEPC	**
Volume final	20 µL

5.6. PCR EM TEMPO REAL - RT-QPCR

Após realização da transcrição reversa o cDNA gerado foi submetido à PCR em tempo real utilizando-se o kit SYBR Green® PCR Master Mix Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e os primers descritos na Tabela 2. As amostras (50 ng de cDNA) foram aplicadas em placas de 96 poços (ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em duplicata, e com os reagentes em concentrações e quantidade de acordo com descrito na Tabela 3, com volume final de 20 µL.

A reação de PCR em tempo real, realizada no equipamento QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), seguiu o ciclo termal: estágio 1) um ciclo de 50 °C/2 minutos; estágio 2) um ciclo de 95 °C/10 minutos; estágio 3) 40 ciclos de 95 °C/15 segundos e 58 °C/1 minuto, estágio 4) um ciclo de 95 °C/10 minutos e pôr fim a realização

da curva de Melting a 60 °C/1 minuto, para determinação da especificidade dos fragmentos amplificados.

Tabela 2. Primers utilizados na RT-qPCR Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação de PCR para a amplificação específica dos genes alvos.

Espécie	Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Homo sapiens sapiens</i>	<i>GAPDH</i>	TGGGTGTGAACCATGAGAAG	GAGTCCTTCCACGATACCAAAG
	<i>CDH1</i>	CCCTTCACAGCAGAACTAAC	CACCTCTAAGGCCATCTTTG
	<i>CDH2</i>	GGACCGAGAATCACCAAATG	CGTTCCTGTTCCACTCATAG
	<i>ZEB1</i>	GGGAGGATGACAGAAAGGAA	GCATCTGACTCGCATTTCATC
	<i>ZEB2</i>	CCATCTGATCCGCTCTTATC	CCTGTGTCCACTACATTGTC
	<i>SNAIL</i>	AGCTGCAGGACTCTAATC	GAGTCCCAGATGAGCATT
	<i>miR200c</i>	GTCTTACCCAGCAGTGTTTG	TACCCGGCAGTATTAGAGAC
	<i>OCT3/4</i>	GGAGGAAGCTGACAACAATG	CTCACTCGGTTCTCGATACT
<i>Mus musculus</i>	<i>Gapdh</i>	GTGGAGTCTACTGGTGTCTT	GGTTCACACCCATCACAAAC
	<i>Cdh1</i>	CATCATTGAGAGGGAGACAG	GACACGGCATGAGAATAGAG
	<i>Cdh2</i>	CTGACTGAGGAGCCTATGAA	CAGTCTCTTCTGCCTTTG
	<i>Zeb1</i>	CCAGCAGACCAGACAGTATT	TCTGAGTCACACTCGTTGTC
	<i>Zeb2</i>	GCCACGAGAAGAATGAAGAG	CTCCTTGGGTTAGCATTGTTG
	<i>Snail</i>	CAACTATAGCGAGCTGCAGGA	GTACCAGGAGAGAGTCCCAGAT
	<i>miR200c</i>	GTCTTACCCAGCAGTGTTTG	TACCCGGCAGTATTAGAGAC
	<i>Oct3/4</i>	GATCACTCACATCGCCAATC	CCCTGTAGCCTCATACTCTT

Tabela 3. Reagentes RT-qPCR. Descrição da concentração e quantidade dos reagentes utilizados para RT-qPCR.

MIX	Volume
SYBR Green®	10 µL
Primer Foward (10 mM) (concentração final de 1 mM)	0,2 µL
Primer Reverse (10 mM) (concentração final de 1 mM)	0,2 µL
Amostra (50 ng)	2 µL
Água tratada com DEPC	7,6 µL
Volume final	20 µL

5.7. ENSAIO DE INVASÃO - MATRIGEL

Para avaliar os efeitos do tratamento com metformina sobre a capacidade invasiva das células A-375 e B16-F10 foi utilizado o ensaio de matrigel com o kit Corning® Biocoat™ Matrigel® Invasion Chamber - 354480 (Discovery Labware, Inc., Two Oak Park, Bedford, MA, USA), seguindo as instruções do fabricante. As células foram plaqueadas na densidade de $2,5 \times 10^4$ células/poço na câmara superior com DMEM sem soro + 1% de penicilina sódica/estreptomicina e metformina nas concentrações de 0 (sem adição de metformina), 0,5 mM e 5 mM. Na câmara inferior foi adicionado DMEM suplementado com 5% de SFB, como

quimioatraente. A placa foi incubada a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Decorrido o tempo de incubação as células não invasivas ainda localizadas na câmara superior foram removidas com cotonete e as células que invadiram o matrigel, se fixando no lado inferior da câmara foram fixadas com metanol por 10 minutos e coradas com cristal violeta 0,1% por 10 minutos. Os poços foram então analisados com uso do aparelho Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader (Biotek, Winooski, VT, USA), e capturadas imagens de 5 campos aleatórios por poço. As imagens capturadas foram utilizadas para contagem do número de células invasivas e padronizadas para 100%, de acordo com o número de células encontrada no controle.

5.8. ENSAIO DE MIGRAÇÃO – CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Para avaliar os efeitos do tratamento com metformina sobre a capacidade migratória das células foi realizado o ensaio de cicatrização de feridas (*wound healing assay*) utilizando o sistema Ibidi Culture-Insert 2 Well (Ibidi, Martinsried, Germany), um inserto de silicone que permite a divisão do poço em dois compartimentos. O inserto foi posicionado nos poços de uma placa de 24 poços em que foram plaqueadas 12,5X10³ células A-375 por compartimento ou 7,5X10³ células B16-F10 por compartimento utilizando DMEM suplementado com 5% de SFB. Após 24 horas o inserto foi removido e o poço gentilmente lavado com PBS estéril para remoção de debris celulares e células não aderidas. Em seguida foi adicionado aos poços DMEM sem soro + 1% de penicilina/estreptomicina, 10 µg/mL de mitomicina e metformina nas concentrações de 0, 0,5 mM ou 5 mM. Dois pontos da ferida foram então fotografados com 0, 12, 24, 30 e 36 horas e a área da ferida calculada no software ImageJ (version 1.51j8, National Institute of Health, MD, USA). O percentual de fechamento da ferida foi calculado de acordo com a fórmula abaixo adaptada de Rotzer e colaboradores (RÖTZER et al., 2016).

$$\text{Fechamento da ferida (\%)} = \left[\frac{A_{t=0h} - A_{t=\Delta h}}{A_{t=0h}} \right] \times 100$$

A_{t=0h}: area da ferida em t=0h
A_{t=Δh}: area da ferida no tempo de interesse

5.9. ASPECTOS ÉTICOS DO ESTUDO *IN VIVO*

A segunda fase, com modelo *in vivo*, foi realizada de acordo com os princípios éticos para uso de animais em experimentação e com aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CETEA/CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo 143/2019).

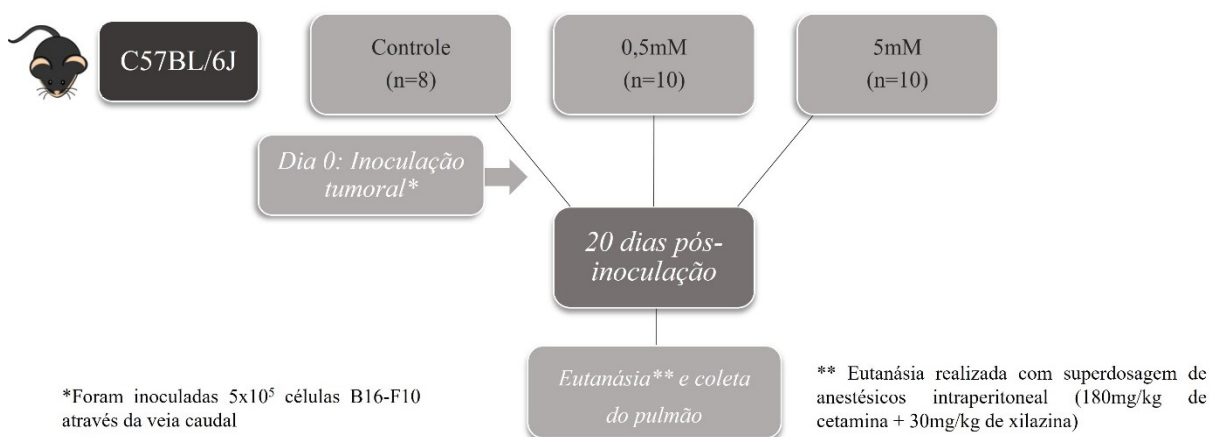
5.10. INOCULAÇÃO DAS CÉLULAS B16-F10 EM CAMUNDONGOS C57BL/6

Para avaliação da implantação e formação de metástases em modelo *in vivo*, as células após processo de tripsinização foram plaqueadas em garrafas de cultivo T75 com 15 mL de DMEM. Ao atingirem confluência de 70-80% retirou-se o meio, seguido de lavagem das garrafas com PBS estéril e adição de DMEM com SFB 5%. Decorridas 24 horas foi realizada a adição da metformina nas concentrações 0,5 mM, 5 mM ou não adição de metformina (grupo controle), com adição do volume correspondente em meio com SFB 5%. Após 24 horas de tratamento as células foram removidas da placa por meio de raspagem, coletadas em tubo Falcon 15 mL, centrifugadas, o sobrenadante descartado e ressuspensas em PBS estéril, uma alíquota foi retirada para contagem em câmara de Neubauer com azul de tripan.

A inoculação foi realizada em 28 camundongos C57BL/6, fêmeas, com 5 semanas de idade através da veia caudal com 5×10^5 células B16-F10 tratadas (5 mM ou 0,5 mM) ou não tratadas (grupo controle) com metformina. Para a inoculação os animais foram estratificados nos seguintes grupos: grupo 1) controle (n=8); grupo 2) tratamento 0,5 mM (n=10); e grupo 3) tratamento 5 mM (n=10).

Os animais foram então acondicionados novamente no biotério, mantidos em ciclo de claro/escuro de 12 horas com água e ração *ad libitum* e monitorados diariamente. Decorridos 20 dias da inoculação os animais foram eutanasiados utilizando-se superdosagem de anestésicos (180 mg/kg de cetamina + 30 mg/kg de xilazina, via intraperitoneal) e foi realizada coleta do pulmão (Figura 1).

Figura 1) Delineamento experimental. Estratificação dos grupos utilizados, com o número de animais de cada grupo, tempo de duração do protocolo experimental e método de eutanásia.



5.11. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MENSURAÇÃO DAS METÁSTASES

Após eutanásia e coleta do pulmão dos camundongos as amostras foram fixadas em formol neutro e tamponado a 10%, avaliadas macroscopicamente com a clivagem do pulmão e coleta de todas as lesões visíveis além de ao menos 1 fragmento de cada lóbulo pulmonar, incluídas em parafina, confeccionadas lâminas histológicas de 4 micrometros, com auxílio de micrótomo e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina. Sob análise de microscopia óptica avaliou-se a histologia pulmonar bem como a presença de células neoplásicas seja isoladas ou em ninhos para se determinar a formação de metástases pulmonares. Posteriormente, foi realizada a captura das imagens histológicas em aumento de 4x, 10x e 40x para mensuração, em milímetros, da área pulmonar total e área comprometida por metástases, permitindo assim o cálculo do percentual de área pulmonar afetada pelas metástases. A mensuração foi realizada no software SPOT 3.4.5 após calibração realizada com o auxílio de lâmina milimetrada com captura nas mesmas condições citadas anteriormente.

5.12. IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para imuno-histoquímica, realizada com o kit Novolink (Novolink Polymer Detection System; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK), foram preparados cortes histológicos de 4 micrometros em lâminas gelatinizadas, que foram então submetidos a bateria de álcool etílico com concentrações decrescentes para hidratação do tecido, seguido da recuperação antigênica em calor úmido (banho-maria a 98 °C por 20 minutos) ou calor úmido pressurizado (Pascal® Pressure Cooker, Dako Cytomation, Glostrup, DNK, por 2 minutos a 125°C) com *Target Retrieval Solution Citrate* - pH 6,0 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). Para bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas por três tempos de 5 minutos em solução de H₂O₂ 10% em álcool metílico. O bloqueio das proteínas endógenas foi realizado por 15 minutos seguido da incubação com o anticorpo primário de acordo com diluição e tempo especificados na Tabela 4. Em seguida adicionou-se o anticorpo secundário e polímero por 30 minutos cada e para marcação do complexo anticorpo primário/secundário utilizou-se o cromógeno 3'3-diaminobenzidina por 3 minutos. Após a incubação no DAB os cortes foram contra-corados com hematoxilina por 10 segundos e Giemsa (1;5) por 30 minutos, lavados em solução de ácido hidrocloreídrico (1:100), álcool absoluto e álcool isopropílico. A contra-coloração com Giemsa foi utilizada para permitir a diferenciação entre o pigmento melânico, que adquire tonalidade esverdeada, da reação cromogênica, com coloração amarronzada.

Tabela 4. Reagentes imuno-histoquímica. Anticorpos primários, fabricantes e padronização utilizadas no estudo imuno-histoquímico.

Anticorpo	Fabricante	Clone	Recuperação antigênica	Diluição	Tempo de incubação
E-caderina	Invitrogen	4A2C7	Banho-maria	1:100	16h
N-caderina	Dako	6G11	Banho-maria	1:50	16h
Vimentina	Santa Cruz	Vim3B4	Banho-maria	1:500	16h
ZEB1	Sigma-Aldrich	Policlonal	Banho-maria	1:400	1h
ZEB2	Sigma-Aldrich	Policlonal	Pascal®	1:200	1h
Nanog	Abcam	Policlonal	Banho-maria	1:100	16h
Twist	Abcam	Policlonal	Banho-maria	1:400	16h
Sox-10	Abcam	Policlonal	Banho-maria	1:400	16h
CDC47	Neomarks	47DC141	Banho-maria	1:400	1h

A interpretação da marcação imuno-histoquímica foi realizada em microscopia óptica convencional, em aumento de 40x (Olympus – BX41). A marcação de E-caderina, N-caderina e Sox-10 foi avaliada nas células neoplásicas e classificadas segundo o percentual de células marcadas: 0 (ausência de marcação), 1 (<25%), 2 (25-50%), 3 (50-75%), 4 (>75%). A expressão de Sox-10 também foi categorizada com base em sua intensidade, sendo 0: negativo, 1: fraco, 2: moderado 3 e: forte. A expressão de vimentina foi classificada com base no percentual de células neoplásicas positivas em 0: negativo; 1: <5%; 2: 5 a 25%; 3: 25 a 50% e 4: >50%. A expressão dos fatores de transcrição (Twist, ZEB1 e ZEB2) foi determinada, semiquantitativamente, como o percentual de células marcadas, e para CDC47 e Nanog foi realizada quantificação de 500 células neoplásicas e determinação do percentual de células positivas (VELOSO et al., 2020).

5.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da expressão gênica foram normalizados com o gene de referência GAPDH por meio do método ΔCt (Ct do gene alvo – Ct do gene normalizador), e a expressão gênica relativa avaliada através do *fold change* com os dados de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os resultados quantitativos foram comparados por meio dos testes one-way ANOVA, one-sample t test ou t-test e seus equivalentes a depender da normalidade dos dados. Relações entre as variáveis qualitativas foram investigadas com o teste exato de Fisher. O software utilizado foi o GraphPad Prism v8 e foram consideradas como significativas resultados cuja probabilidade de significância do teste foi de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão serão apresentados sob formato de artigo, intitulado “*Epithelial–mesenchymal transition inhibition by metformin reduces melanoma lung metastasis in a murine model*” publicado no periódico *Scientific Reports*, que é classificado como Qualis A1 na área de avaliação Medicina III da CAPES e possui fator de impacto nos últimos 2 anos de 4,996.

DOI: 10.1038/s41598-022-22235-8

VELOSO, E. S. et al. Epithelial-mesenchymal transition inhibition by metformin reduces melanoma lung metastasis in a murine model. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 17776, 22 out. 2022. <https://rdcu.be/cYT2u>



OPEN Epithelial–mesenchymal transition inhibition by metformin reduces melanoma lung metastasis in a murine model

Emerson Soares Veloso, Bárbara Andrade de Carvalho, Felipe Henrique de Souza Silva, Thaís Salviana Ribeiro, Bruna Mendes Lima, Camila Pereira Almeida, Vítor Henrique Soares Romão da Silva, Sara Aparecida Rocha, Marina Rios de Araújo Campos, Helen Lima Del Puerto & Enio Ferreira[✉]

Melanoma is an aggressive cancer with fast metastatic spread and reduced survival time. One common event during the neoplastic progression is the epithelial–mesenchymal transition (EMT), which enhances invasiveness, cell migration, and metastasis. In this study, we investigated the effects of metformin at EMT in melanoma cell lines B16-F10 and A-375, in vitro, and the impact of EMT downregulation on melanoma progression in vivo. The metformin cells treatment reduces the migration potential in vitro and reduced the development of pulmonary metastases and the expressions of N-cadherin, vimentin, ZEB1, and ZEB2 at the metastases site, in vivo. These results indicate that metformin can promote EMT downregulation impairing the metastatic potential of melanoma cells.

Despite representing only 3% of cases of skin cancer, malignant melanoma presents significant clinical relevance by being recognized as one of the main causes of cancer death^{1,2}. An important step during melanoma progression is the loss of interaction between melanocytes and keratinocytes, mediated by adhesion molecules such as E-cadherin³.

Epithelial–mesenchymal transition (EMT) is a process that allows cells to change between epithelial to mesenchymal phenotypes, which eventually promotes dedifferentiation and increases the capacity for cell invasion and migration. Initially reported in a physiological context during the embryonic period EMT has also been associated with neoplastic progression^{4,5}. One of the changes promoted by EMT is the modification in cell adhesion mediated by cadherin switch, downregulated E-cadherin, and upregulated N-cadherin⁶. Although the melanocyte is not an epithelial cell, but neuroectodermal, there is evidence that EMT-like changes occur in melanoma and may be associated with neoplastic progression^{7,8}.

EMT regulation is a complex process that involves the participation of transcriptional and translational regulators, such as EMT-inducing transcription factors (SNAIL, ZEB, and TWIST families) and miRNA200c (associated with the maintenance of epithelial differentiation)^{9–11}.

Metformin, a normoglycemic agent, has been epidemiologically associated with a lower risk for cancer development and mortality^{12,13}. Clinical trials and experimental studies have demonstrated the antineoplastic action of metformin and its ability to inhibit the formation of metastases in several neoplasms^{14,15}. One of its effects is the inhibition of EMT with consequent reduction of motility, migration, and invasion of neoplastic cells, reported in vitro and in vivo including in melanomas^{16,17}.

Despite the existing data on the role of EMT in cancer, its clear picture is yet to be elucidated in melanoma metastasis. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of chemical inhibition of EMT with metformin on the expression of EMT-related markers and metastatic capacity in models of melanoma.

Results

Metformin affects cell viability in A-375 and B16-F10 cells in higher dose after a long-term exposure. As shown in Fig. 1 the viability of 0.5 mM and 5 mM treated A-375 cells for 24 h did not differ from the non-treated cells, however, there was a reduction in cell viability in 5 mM treated cells compared to

Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil. ✉email: enioferreira@icb.ufmg.br

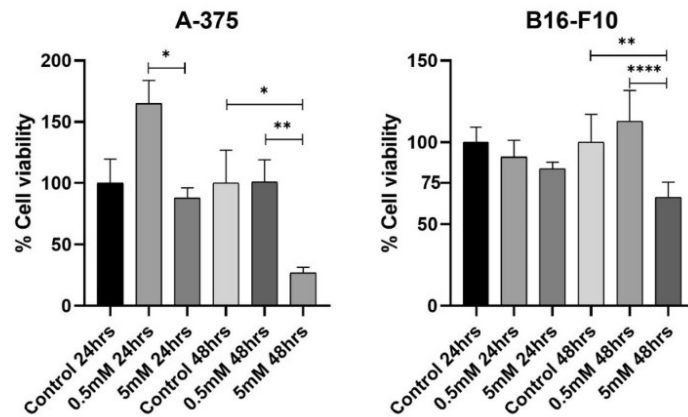


Figure 1. Effects of metformin on cell viability. Cells viability assessment by MTT assay of A-375 and B16-F10 cells lines treated for 24- and 48-h with metformin at 0.5 mM and 5 mM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ (One-way ANOVA).

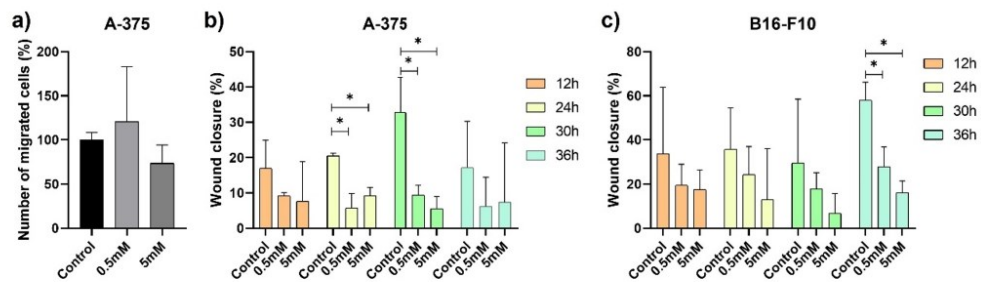


Figure 2. Effects of metformin on cell migration and invasion. (a) Number of A-375 invasion cells treated for 24-h with 0.5 mM or 5 mM metformin. (b,c) Wound closure percentage of A-375 (b) and B16-F10 (c) cells treated with 0.5 mM or 5 mM metformin. * $p < 0.05$ (One-way ANOVA).

0.5 mM treatment ($p:0.0122$). The 48-h treatment promoted the reduction of 5 mM treated cells viability compared to the non-treated ($p:0.0172$) and 0.5 mM treated cells ($p:0.0065$). The 24-h treatment did not reduce the cell viability of B16-F10 cells, but the 48-h treatment promoted the reduction of cell viability in the 5 mM treated cells compared to non-treated ($p:0.0026$) and 0.5 mM treated cells ($p:0.0001$).

Metformin reduces A-375 and B16-F10 migration, without impairing EMT-related genes expression. The percentage of invasive A-375 cells was increased by treatment with 0.5 mM metformin (120%) and reduced with 5 mM treatment (73%), but without statistical significance (Fig. 2a). In the experiment conducted with B16-F10 cells, it was not possible to observe cell invasion under any of the conditions analyzed, including non-treated cells. Treatment with metformin, regardless of concentration, reduced the percentage of wound closure in A-375 (Figs. 2b, S1) and B16-F10 (Figs. 2c, S2) cells, especially with 24 and 30 h in A-375 cells and 36 h in B16-F10 cells.

Metformin treatment did not significantly change the mRNA expression of all analyzed genes in A-375 and B16-F10 cells (Figs. 3 and 4). In A-375 cells the fold changes of *CDH1* expression were 2.02 and 2.26 in 0.5 mM and 5 mM treated cells, respectively. For *CDH2* the fold changes were 1.43 and 1.53, respectively. In B16-F10 cells the fold change of *CDH1* expression was 1.37 and 1.59 in 0.5 mM and 5 mM treated cells, respectively. For *CDH2* the fold changes were 0.99 and 0.92, respectively.

Metformin reduces formation, size, and proliferation in the pulmonary metastasis of murine B16 melanoma. During the daily check-up of the inoculated mice, no clinical/behavioral changes were observed. Twenty-one days after inoculation all animals (control and that received 0.5 mM treated cells) pre-

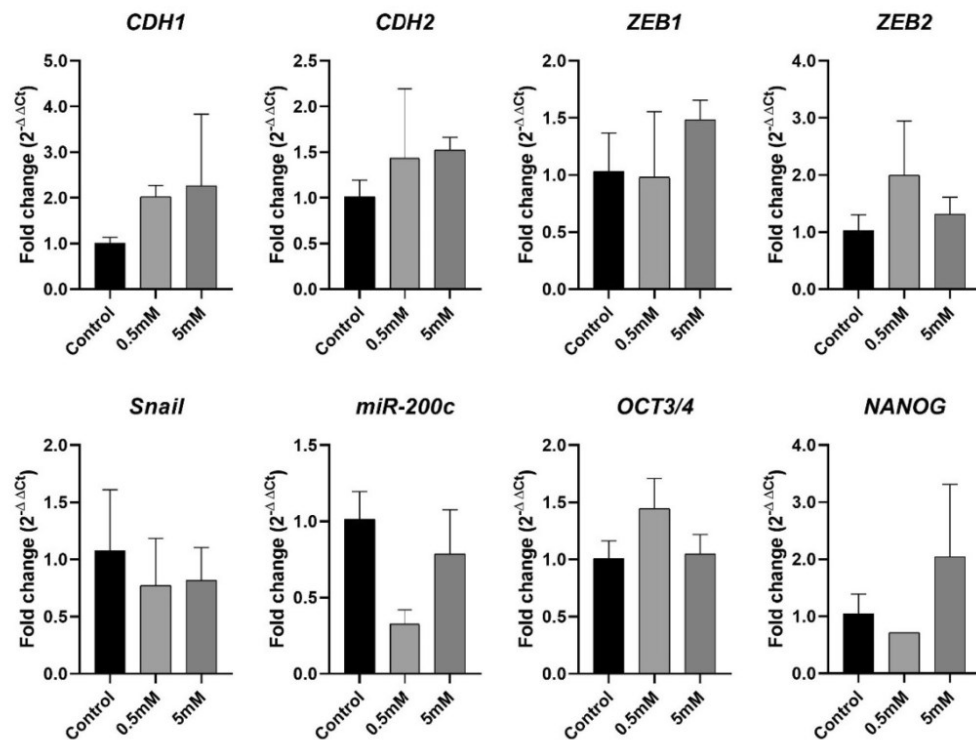


Figure 3. A-375 mRNA expression. A-375 cell line mRNA expression of EMT-related genes after 24 h of treatment with metformin at 0.5 mM and 5 mM. Data are plotted as mean \pm SD of $2^{-\Delta\Delta CT}$, directly proportional to the relative gene expression.

sented pulmonary metastatic nodules, with extensive involvement of the lung parenchyma, associated with perivascular and peribronchiolar infiltrate of inflammatory cells (Fig. 5a,b). In the animals that received 5 mM treated cells, pulmonary nodules were observed in just one animal, organized in a small and rare focus of micro-metastasis (Fig. 5c). The frequency of lung metastases was significantly lower in the 5 mM group than in the 0.5 mM and control groups (Fisher's exact test, $p < 0.0001$, Fig. 6a).

The total lung and metastatic lung areas were used to determine the percentage of lung areas with metastases. The metastases observed in the control and 0.5 mM animals were significantly higher than those observed in the animal of the 5 mM group (One-sample t-test, $p: 0.0085$, and $p: 0.0047$, respectively; Fig. 6b). The mean percentage area with metastases was $15.18\% \pm 4.028$ in the control animals, and $9.309\% \pm 2.333$ in the 0.5 mM animals, while in the animal of the 5 mM group, only 0.6% of the lung area was affected by metastases.

The mean proliferative index of metastatic neoplastic cells, measured by CDC47 nuclear expression, was significantly lower in the animal of 5 mM group (22.9%, Fig. 6f) than in the control (73.4%, Fig. 6d) and 0.5 mM group (73.5%, Fig. 6e) (One-sample t-test, $p: 0.0001$, and $p: 0.0012$, respectively; Fig. 6c).

Metformin reduces the expression of EMT and differentiation cells markers in the pulmonary metastasis of murine B16 melanoma. E-cadherin expression was not detected in metastases of any cases, while N-cadherin expression was observed in all cases. N-cadherin expression was observed in cytoplasm and membrane, the score most frequently observed was 3 in the control group (Fig. 7a), in 75% of cases, and score 2 in the 0.5 mM group, in 50% of cases, already in the animals of 5 mM group was observed frequently the score 1 (Fig. 7b). The cytoplasmatic vimentin expression was not detected in metastasis of group 5 mM animal (Fig. 7d), but in the control group 50% of cases present scores 1 (Fig. 7c), and in the 0.5 mM group the most common scores observed was 1 and 2, in 40% of cases each. However, N-cadherin and vimentin expression frequencies do not change between the control and 0.5 mM groups.

The Twist expression was mainly observed in the cytoplasm, being positive on average at 47.8% and 37.8% of neoplastic cells in the control (Fig. 8a) and 0.5 mM (Fig. 8b) groups respectively. ZEB1 expression, visualized at the membrane, was found only in control (Fig. 8c) and 0.5 mM (Fig. 8d) groups, in an average percentage

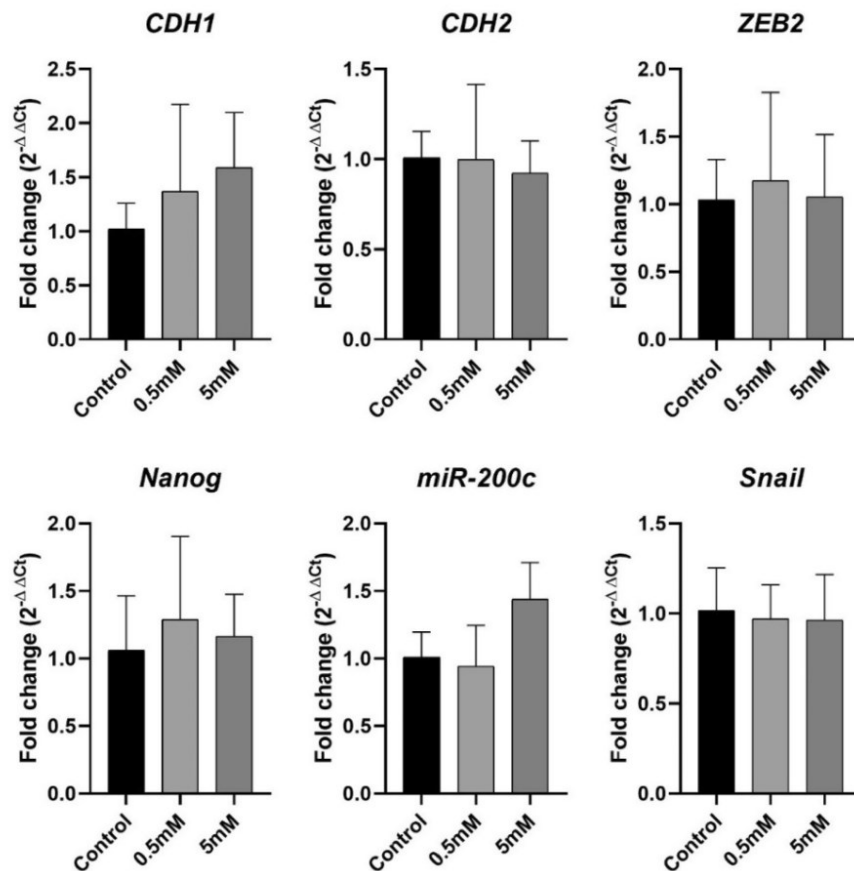


Figure 4. B16-F10 mRNA expression. B16-F10 cell line mRNA expression of EMT-related genes after 24 h of treatment with metformin at 0.5 mM and 5 mM. Data are plotted as mean \pm SD of $2^{-\Delta\Delta Ct}$, directly proportional to the relative gene expression.

of 12.5% and 5% of the cells. ZEB2 expression, observed only in the control and 0.5 mM groups, can be seen in the membrane and the nucleus (Fig. 8e,f). Membrane expression was positive on average in 3.5% of cells in the control group and 8.1% in the 0.5 mM group, while nuclear expression was observed in 25% of cells in the control group and 7.5% in the group 0.5 mM, with the expression in the control group being significantly higher than in the 5 mM group (one-sample t-test; $p=0.04$).

Nanog nuclear expression was observed on average in 14.7% cells/case in the control group (Fig. 9a), 10.2% in the 0.5 mM group, and 8.2% of cells in the animal of 5 mM group (Fig. 9b), but without significant difference between groups.

The intensity of Sox10 expression, observed at the cytoplasm, was predominant moderate (score 2) in 50% of the control group, 62.5% of the 0.5 mM group, and in the group 5 mM animal. The percentage of cells with positive expression of Sox10 was predominantly scored 4 in control (Fig. 9c) (50% of cases) and 0.5 mM group (Fig. 9d) (30% of cases), but in the group, 5 mM animal was scored 1.

Discussion

Melanoma is a neoplasm of great clinical importance due to high resistance to chemotherapy, fast metastatic spread, and reduced survival time. There is evidence of the occurrence of EMT during its progression.

This study indicated a reduction of in vitro migration in A-375 and B16-F10 cells treated with metformin and in vivo experiments demonstrated that metformin-treated cells generate fewer and smaller metastases. In addition, the metastasis observed in the animal that received 5 mM treated cells showed a reduction in the

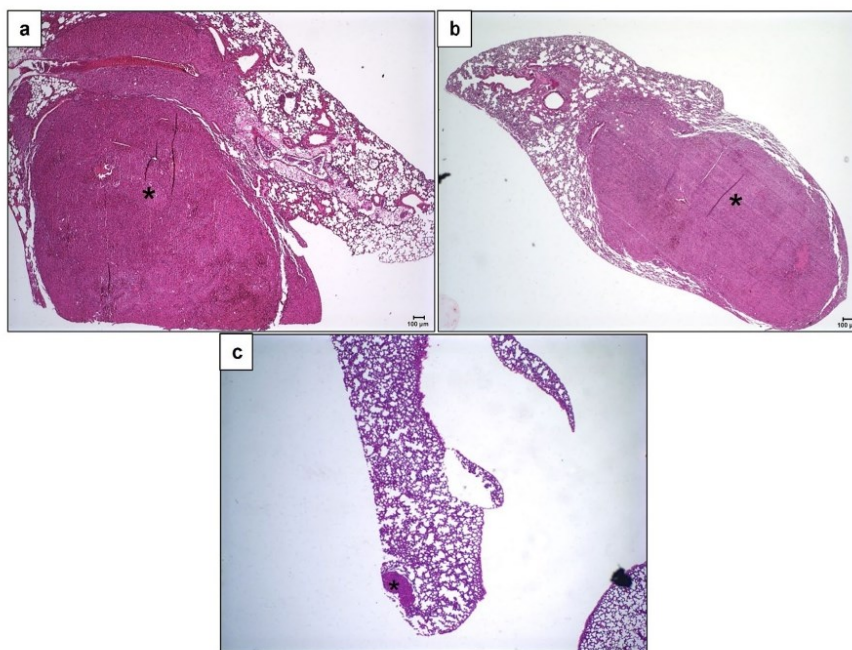


Figure 5. Lung metastases development in C57BL/6 mice inoculated with metformin-treated or untreated B16-F10 cells. Lung tissue, stained with hematoxylin–eosin, 21 days after inoculation of B16-F10 cells: (a) untreated with metformin; (b) treated, in vitro, with 0.5 mM of metformin; (c) treated, in vitro, with 5 mM of metformin. $\times 4$. Scale bar: 100 μm .

proliferative index and the expression of mesenchymal (N-cadherin, vimentin, ZEB1, and ZEB2) and cell dedifferentiation marker (Sox10).

Metformin, used in this study to block EMT, affects cellular metabolism¹⁸, so we performed the MTT assay to rule out toxic concentrations that compromise cell viability and impair the evaluation of EMT blockade. Cytotoxic effects of metformin were observed only in 48-h treatment in both cell lines, consistent with previous studies that show deleterious effects of metformin being more frequent in treatments with higher concentrations, such as 10 mM, or more extended periods (48–72 h)^{19,20}, making their use for 24 h viable for our purpose. The A-375 cell line treated with 0.5 mM metformin shows an increasing trend of cell viability but without a statistical difference, this may be an indication that in this concentration metformin increased cell metabolism of A-375 cells, but without significant impacts on cell viability.

The role of EMT in the progression of epithelial neoplasms is widely discussed and well established in the literature, but whether EMT is strictly necessary for the formation of metastases in non-epithelial neoplasms remains to be clarified^{7,21,22}. The results obtained in this study show that the reduction of EMT-related markers, promoted by chemical inhibition with metformin, is associated with reducing the potential for metastases formation.

The use of metformin for inhibition of EMT under the conditions applied in this study has already been reported. The mRNA levels were not changed in the in vitro experiments although it was possible to notice differences in the protein level of EMT-related markers when evaluating the expression on pulmonary metastases, showing that the regulation of EMT-related markers in this model, despite not occurring at the genomic level, occurs at the protein level, this may be an indication that the effects of metformin on EMT can also occur by other mechanisms than direct transcription regulation. The results of the in vivo experiments indicate that the reduction of metastasis formation was concomitant with the reduction of N-cadherin expression. The ability of metformin to inhibit EMT, increase E-cadherin expression, and reduce N-cadherin at the gene and protein level has already been reported in other neoplasms and melanocytic lineages^{16,19,23}. This effect has been associated with the inhibitory action of metformin on the MAPK/ERK pathway, which is overactivated in melanomas due to mutations in *BRAF*, *NRAS*, and *NFI* and promotes increased cell proliferation and expression of EMT-inducing transcription factors^{24,25}. Recently Suwei et al., show that metformin effects on EMT are dependent on the miR-5100/SPINK5/STAT3 pathway²⁶. SPINK5 is a tumor suppressor protein that regulates EMT on melanoma cells, and when overexpressed inhibits metastasis abilities^{26,27}. The STAT3 pathway is a known driver stimulator of EMT when phosphorylated at the pY705 site²⁸ and SPINK5 could inhibit STAT3 phosphorylation.

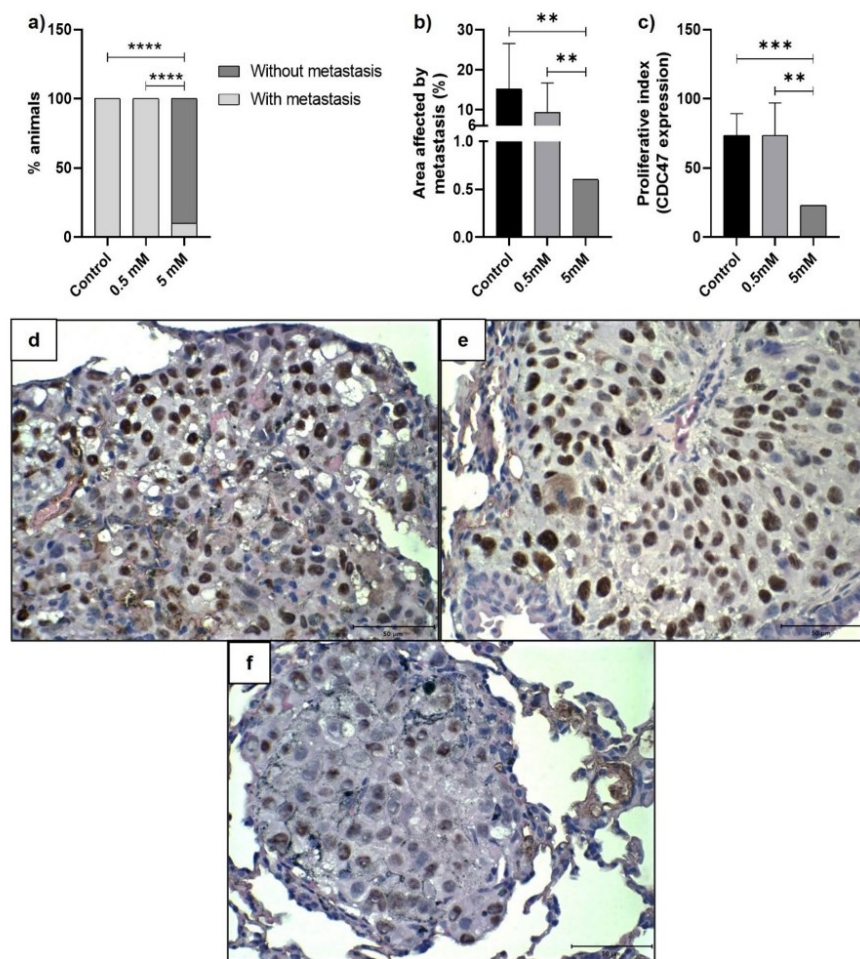


Figure 6. Histopathological and immunohistochemical parameters of pulmonary metastases from metformin-treated or untreated B16-F10 cells in C57BL/6 mice. **(a)** Frequency of pulmonary metastases. Fisher's exact test. **(b)** Measurement of the pulmonary area affected by metastases. One-sample t-test. **(c)** Proliferative index of pulmonary metastases. One-sample t-test. **(d-f)** Lung tissues, collected 21 days after inoculation of B16-F10 cells, were submitted to immunohistochemistry technique for CDC47 identification. Nuclear immunopositivity was evaluated in 500 neoplastic cells, allowing the determination of the mean proliferative index. **(d)** Cells untreated with metformin; **(e)** Cells treated, in vitro, with 0.5 mM of metformin; **(f)** Cells treated, in vitro, with 5 mM of metformin. $\times 60$. Scale bar: 50 μ M.

The treatment with metformin suppressed miR-5100, which targets SPINK5, and elevated SPINK5 expression, reducing STAT3 phosphorylation²⁶.

The expression of E-cadherin was not restored in metastases of metformin-treated cells, however, there is evidence that EMT regulation does not always occur simultaneously on the epithelial and mesenchymal axes²⁹.

In melanocytes, N-cadherin expression is associated with a potential for malignant transformation, and in neoplastic melanocytes, it is even considered an indication of a worse prognosis^{30,31}. One of the mechanisms by which N-cadherin can facilitate the formation of metastases is by stimulating collective cell migration, where cells maintain physical interconnectivity, collective cell polarity, and coordinated cytoskeletal activity, being a more efficient way than the individual migrating cell^{32,33}. One of the main requirements for collective cell migration is remodeling the cell cytoskeleton promoted by Rho-family GTPase signaling, which is stimulated by N-cadherin³⁴.

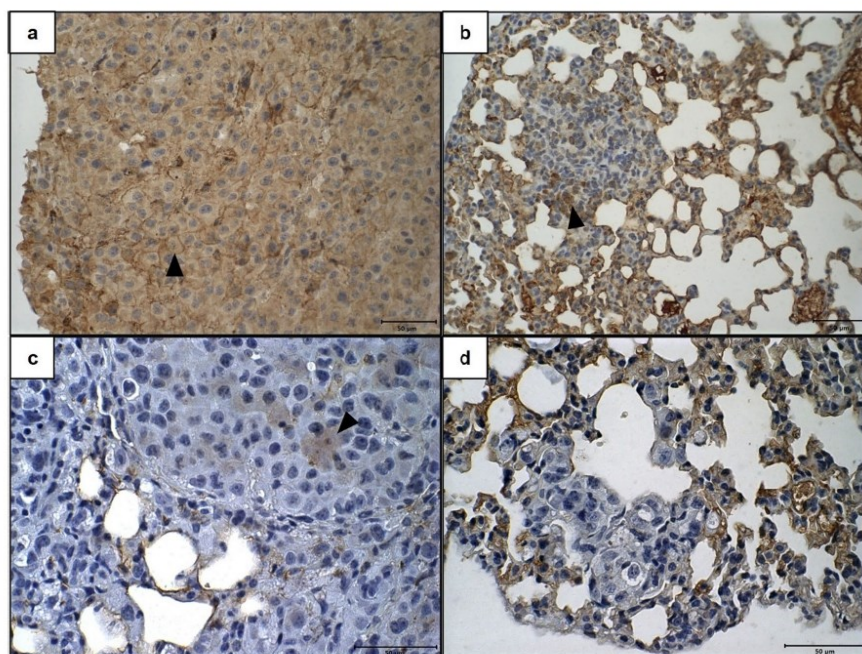


Figure 7. Immunohistochemical expression of N-cadherin and Vimentin in lung metastases from C57BL/6 mice inoculated with metformin-treated or untreated B16-F10 cells. (a,b) Lung tissues showing membrane and cytoplasmic immunorexpression of N-cadherin 21 days after inoculation of B16-F10 cells: (a) untreated with metformin; (b) treated, in vitro, with 5 mM of metformin. (c,d) Lung tissues showing cytoplasmic immunorexpression of vimentin 21 days after inoculation of B16-F10 cells: (c) untreated with metformin; (d) treated, in vitro, with 5 mM of metformin. $\times 40$. Scale Bar: 50 μm . Arrowhead: Neoplastic cells with positive immunorexpression.

The metastasis in the animal that received 5 mM treated cells shows a reduction in ZEB1 and ZEB2 expression. These proteins are associated with EMT stimulation in several neoplasms, including melanomas³⁵. ZEB transcription factors can form a complex with the co-repressors C-terminal binding protein 1 and 2 (CtBP1/2). This complex can bind the CDH1 promoter gene, promoting the E-cadherin downregulating³⁶; this effect occurs in epithelial and non-epithelial contexts^{10,37}. The pathways directly involved in N-cadherin expression remain unclear⁶, but ZEB2 was one of the few transcription factors that suppress E-cadherin and stimulate N-cadherin expression³⁸. On the other hand, some studies show that unlike the observed in epithelial neoplasms, in which ZEB transcription factors act similarly, in melanomas they have antagonistic roles, and the ZEB balance regulation is not yet fully understood³⁹. ZEB2 expression is associated with a pro-proliferative status but also cell differentiation, the expression of ZEB1 promotes a mesenchymal/invasive status^{10,40}.

Our work shows that the use of metformin for the chemical regulation of EMT-related markers can reduce melanoma's invasive and metastatic potential, which reinforces the importance of EMT in neoplastic progression. Targeting specific molecular pathways associated with epithelial–mesenchymal transition inhibition may provide a more effective strategy in melanoma treatment.

Materials and methods

Cell lines and metformin treatment. The melanoma cell lines, A-375 (CRL-1619) and B16-F10 (CRL-6475) were grown, in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin at 37 °C and 5% CO₂. All cell lines were obtained from American Tissue Culture Collection (ATCC). 24 h prior to the treatment the medium was replaced by DMEM + 5% FBS + 1% penicillin/streptomycin.

Melanoma cell lines were plated in a 96-well plate (5×10^3 cells/well) for MTT assay, or in a 12-well plate (7.5×10^4 cells/well), for RNA isolation. After 24 h the medium was replaced by fresh medium with metformin at concentrations of 0 mM (control), 0.5 mM and 5 mM. Each experiment was repeated at least three times with three replicates per experiment. B16-F10 cells, for in vivo experiments, were cultured at T75 flasks until reaching 70–80% confluence when the metformin was added at concentrations 0, 0.5 mM, or 5 mM for 24 h.

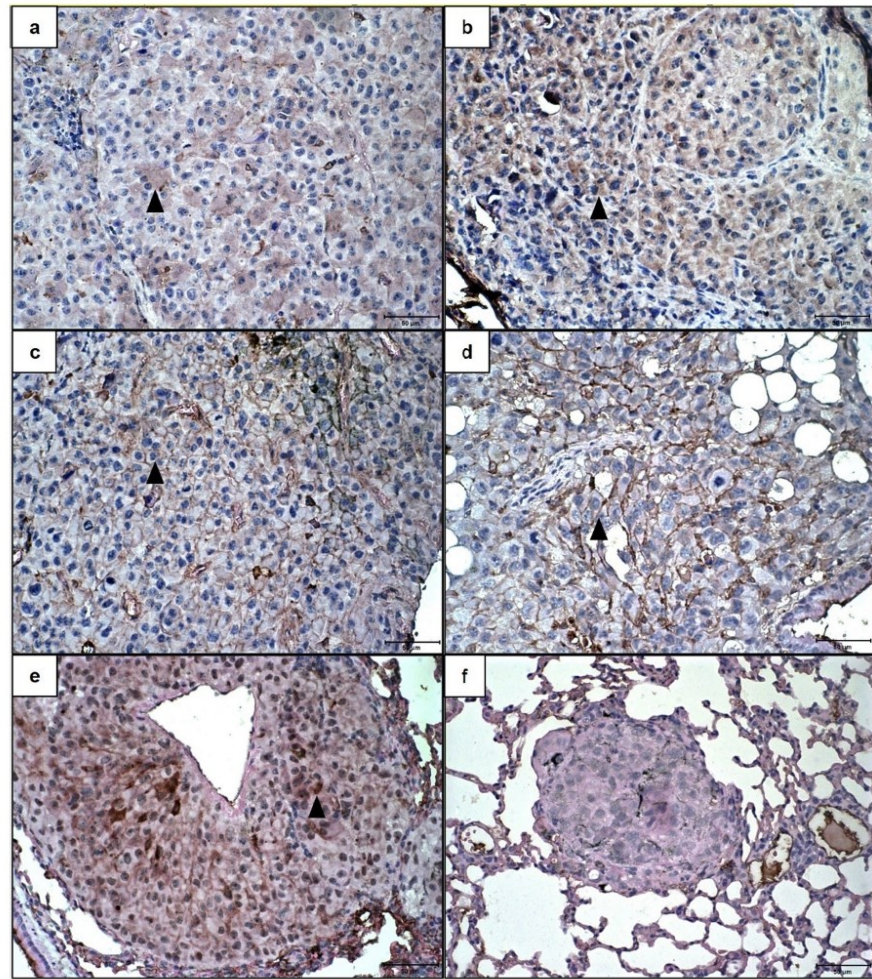


Figure 8. Immunohistochemical expression of Twist, ZEB1, and ZEB2 in lung metastases from C57BL/6 mice inoculated with metformin-treated or untreated B16-F10 cells. (a,b) Lung tissues showing cytoplasmic immunoreactivity of Twist, 21 days after inoculation of B16-F10 cells: (a) untreated with metformin; (b) treated, in vitro, with 0.5 mM of metformin. (c,d) Lung tissues showing membrane immunoreactivity of ZEB1 21 days after inoculation of B16-F10 cells: (c) untreated with metformin; (d) treated, in vitro, with 0.5 mM of metformin. (e,f) Lung tissues showing membrane and nuclear immunoreactivity of ZEB2, 21 days after inoculation of B16-F10 cells: (e) untreated with metformin; (f) treated, in vitro, with 0.5 mM of metformin. $\times 40$. Scale Bar: 50 μm . Arrowhead: Neoplastic cells with positive immunoreactivity.

Analysis of cell viability. Cell viability in A-375 and B16-F10 cells treated with metformin was evaluated using the colorimetric assay MTT. After 24- and 48-h metformin treatment, cells were incubated with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), for 4 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ and 5% CO_2 . Dimethyl sulfoxide was added to lysis cells and released formazan, allowing colorimetric measurement of absorbance in a microplate reader at 570 nm (SpectraMax 190 absorbance microplate reader, Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA).

RNA isolation and real-time PCR. Total RNA was isolated, after 24 h of metformin treatment, from A-375 and B16-F10 cells using 1 mL of Trizol[®] reagent according to the protocol provided by the manufacturer

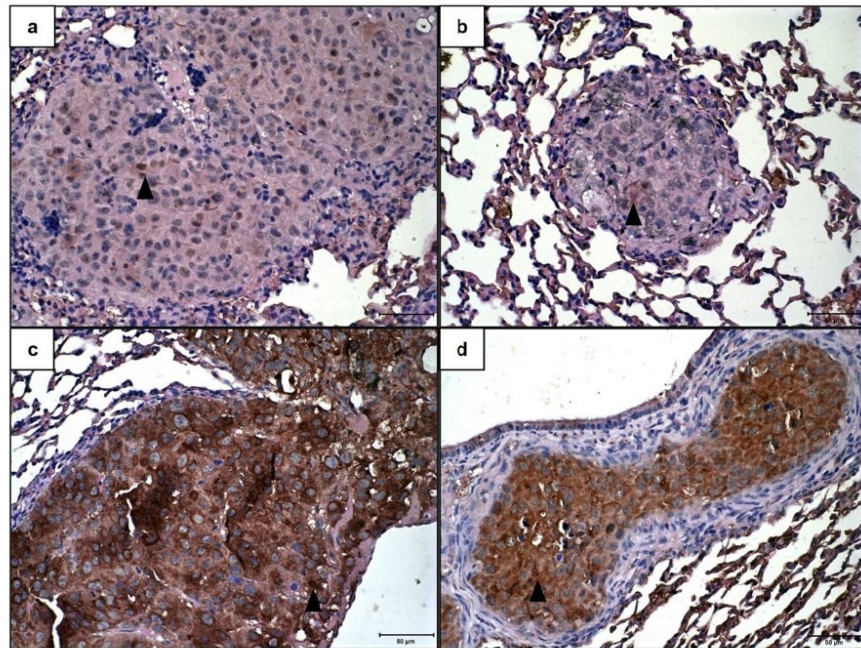


Figure 9. Immunohistochemical expression of Nanog and Sox10 in lung metastases from C57BL/6 mice inoculated with metformin-treated B16-F10 cells. (a,b) Lung tissues showing nuclear immunopositivity of Nanog 21 days after inoculation of B16-F10 cells: (a) untreated with metformin; (b) treated, in vitro, with 5 mM of metformin. (c,d) Lung tissues showing cytoplasmic immunopositivity of Sox10 21 days after inoculation of B16-F10 cells: (c) untreated with metformin; (d) treated, in vitro, with 0.5 mM of metformin. $\times 40$. Scale Bar: 50 μ m. Arrowhead: Neoplastic cells with positive immunopositivity.

(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). First-strand complementary DNA (cDNA) was synthesized from 0.5 μ g total RNA using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) incubated in a MiniAmp[™] Plus Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA).

Real-time PCR was carried out in QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using the Power Sybr[™] Green Master Mix Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The PCR were performed in three independent experiments, and each sample was run in duplicate in each experiment. Samples were run on 96-well optical PCR plates with a final reaction volume of 20 μ L. The PCR parameters were 1 cycle at 50 $^{\circ}$ C for 2 min, 1 cycle at 95 $^{\circ}$ C for 10 min, 40 cycles at 95 $^{\circ}$ C for 15 s and 58 $^{\circ}$ C for 1 min, 1 cycle at 95 $^{\circ}$ C for 15 s, 60 $^{\circ}$ C for 1 min and 95 $^{\circ}$ C for 1 s.

The primers used for PCR amplification of target genes are listed in Table 1. *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gene was used as reference to normalize target gene expression. Specific primers were designed using the sequences obtained in GeneBank, through the Blast program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). Subsequently, all sequences were designed and analyzed using the Integrated DNA Technologies website program (<http://www.idtdna.com>).

The PCR results were analyzed based on the Δ CT, the primary source of data variability. Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, where CT is the threshold cycle⁴¹.

Cell motility assays. Effects of metformin treatment on cell invasion capacity were evaluated by Corning[™] Biocoat[™] Matrigel[™] Invasion Chamber—354480 (Discovery Labware, Inc., Two Oak Park, Bedford, MA, USA), used according to the manufacturer's instructions. A-375 and B16-F10 cells were plated at the seeding density of 2.5×10^4 cells/well into the upper chambers with serum free DMEM + 1% penicillin/streptomycin and metformin at 0, 0.5 or 5 mM concentrations. In the lower chambers was added DMEM supplemented with 5% FBS and 1% penicillin/streptomycin as a chemoattractant. The plate was incubated at 37 $^{\circ}$ C in 5% CO₂ for 24 h. The non-invading cells on the upper side of the chamber were removed with a cotton swab and the invading cells that transmigrated to the matrigel and attached on the underside of the chamber were fixed with methanol for 10 min and stained with 0.1% crystal violet for 10 min. Then, the migrated cells were examined using Cytation

Species	Gene	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')
<i>Homo sapiens sapiens</i>	<i>GAPDH</i>	TGGGTGTGAACCATGAGAAG	GAGTCCCTCCACGATACCAAAG
	<i>CDH1</i>	CCCTTCACAGCAGAACTAAC	CACCTCTAAGGCCATCTTTG
	<i>CDH2</i>	GGACCGAGAATCACCAATG	CGTTCCTGTCCACTCATAG
	<i>ZEB1</i>	GGGAGGATGACAGAAAGGAA	GCATCTGACTCGCATTATC
	<i>ZEB2</i>	CCATCTGATCCGCTCTTATC	CCTGTGCCACTACATTGTC
	<i>SNAIL</i>	AGCTGCAGGACTCTAATC	GAGTCCCAGATGAGCATT
	<i>miR200c</i>	GTCTTACCCAGCAGTGTTG	TACCCGGCAGTATTAGAGAC
	<i>OCT3/4</i>	GGAGGAAGCTGACAACAATG	CTCACTCGGTCTCGATACT
<i>Mus musculus</i>	<i>GAPDH</i>	GTGGAGTCTACTGGTGTCTT	GGTTCACCCATCACAAC
	<i>CDH1</i>	CATCATTGAGGGGAGACAG	GACACGGCATGAGAATAGAG
	<i>CDH2</i>	CTGACTGAGGAGCCTATGAA	CAGTCTCTCTTCTGCCTTTG
	<i>ZEB1</i>	CCAGCAGACCAGACAGTATT	TCTGAGTCACACTCGTTGTC
	<i>ZEB2</i>	GCCACGAGAAGATGAAGAG	CTCCTTGGGTTAGCATTGG
	<i>SNAIL</i>	CAACTATAGCGAGCTGCAGGA	GTACCAGGAGAGATCCCAGAT
	<i>miR200c</i>	GTCTTACCCAGCAGTGTTG	TACCCGGCAGTATTAGAGAC
	<i>OCT3/4</i>	GATCACTCACATCGCCAATC	CCCTGTAGCCTCATACTCTT

Table 1. Primer sequences for qPCR.

5 Cell Imaging Multi-Mode Reader (Biotek, Winooski, VT, USA), and images from 5 random fields/well were captured. Using ImageJ software (version 1.51j8, National Institute of Health, MD, USA), the images were analyzed to determine the number of migrant cells and set to 100% according to the control.

Cell migration after metformin treatment was evaluated by the wound healing assay using the Ibbidi Culture-Insert 2 Well system (Ibidi, Martinsried, Germany), a silicon insert that separates two compartments in the wells. The silicone insert was positioned in a 24-well plate and 12.5×10^3 A-375 cells or 7.5×10^3 B16-F10 cells were applied into each compartment with DMEM + 5% FBS and 1% penicillin/streptomycin. After 24 h the insert was removed, cells washed with PBS to remove debris and non-adherent cells, and the adherent cells covered with fresh serum free DMEM + 1% penicillin/streptomycin, 10 μ g/mL of mitomycin, and metformin at 0, 0.5 or 5 mM concentrations. Two points of the wound were photographed at 0, 12, 24, 30 and 36 h and the area into which the cells migrated was measured using ImageJ software (version 1.51j8, National Institute of Health, MD, USA). The wound closure percentage was calculated according to the formula below⁴².

$$\text{Wound closure (\%)} = \left[\frac{A_{t=0h} - A_{t=\Delta h}}{A_{t=0h}} \right] \times 100$$

$A_{t=0h}$: area of the wound at $t=0$ h, $A_{t=\Delta h}$: area of the wound at the interested time.

Animals. In vivo experiments were performed with C57BL/6 female mice at 5 weeks old, according to the ethical principles for animal experimentation and after approval by the Animal Use Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (no 143/2019) and complied with the relevant guidelines and regulations. This study is reported in accordance with ARRIVE guidelines. B16-F10 cells 24 h after metformin treatment were mechanically removed, collected, centrifuged, resuspended in sterile phosphate-buffered saline, and quantified in a Neubauer chamber. Mice were inoculated, via tail vein, with 5×10^5 B16-F10 cells (8 animals with no treated cells-control group, 10 animals with 0.5 mM treated cells-0.5 mM group, and 10 animals with 5 mM treated cells-5 mM group). At 21-days post-inoculation, all mice were euthanized with ketamine/xylazine intra-peritoneal injection, and lungs were collected for histological analysis.

Histopathological analysis. Lungs were excised, fixed in 10% neutral buffered formalin (pH 7.4) for 48 h, cleaved, embedded in paraffin, 4 μ m-thick sections were obtained, stained with hematoxylin and eosin (H&E), and examined under light microscopy. Neoplastic cells form aggregates, or tumor nodules were considered metastatic lung lesions. The total lung area and area of metastatic lung lesion were measured using images captured at Olympus BX41 microscope in the SPOT 3.4.5 software.

Immunohistochemistry. Immunohistochemical staining was performed through the peroxidase reaction method with a polymerized secondary antibody and the chromogen 3'-3'-diaminobenzidine (Novolink Polymer Detection System; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK). Antigen retrieval was performed by incubation in citrate buffer (pH 6.0) at water bath—20 min at 98 °C; or Pascal' Pressure Cooker (Dako Cytomation, Glostrup, DNK)—2 min at 125 °C. Table 2 lists the manufacturers, clones, dilutions, and incubation times for all antibodies used. Tissue slides were counterstained with hematoxylin for 10 s, and Giemsa stain (1:5) for 30 min. Then slides were rinsed with a hydrochloric acid solution (1:100), absolute alcohol, and finally isopropyl alcohol for 1 min. Giemsa stain allows the differentiation between melanic pigment, which acquires a greenish hue of chromogen reaction (brownish hue).

Antibody	Manufacturer	Clone	Antigen retrieval	Dilution	Incubation time
E-cadherin	Invitrogen	4A2C7	Water bath	1:100	16 h
N-cadherin	Dako	6G11	Water bath	1:50	16 h
Vimentin	Santa Cruz	Vim3B4	Water bath	1:500	16 h
ZEB1	Sigma-Aldrich	Polyclonal	Water bath	1:400	1 h
ZEB2	Sigma-Aldrich	Polyclonal	Pascal*	1:200	1 h
Nanog	Abcam	Polyclonal	Water bath	1:100	16 h
Twist	Abcam	Polyclonal	Water bath	1:400	16 h
Sox10	Abcam	Polyclonal	Water bath	1:400	16 h
CDC47	Neomarks	47DC141	Water bath	1:400	1 h

Table 2. IHC protocol.

Immunohistochemistry interpretation. Expression of E-cadherin, N-cadherin, and Sox-10 were categorized based on the percentage of positive cells: 0 (negative), 1 (<25% cells), 2 (25–50% cells), 3 (50–75% cells), and 4 (>75% cells)⁴³. Sox10 expressions were also categorized based on the intensity: 0 (negative), 1 (weak), 2 (moderate), 3 (strong). Vimentin expression was classified in: 0 (negative), 1 (<5%), 2 (5–25%), 3 (25–50%), 4 (>50%). Transcription factors (Twist, ZEB1, and ZEB2) labeling was categorized as the percentage of labeled neoplastic cells by a semi-quantitative method. The expression of CDC47 and Nanog have quantitatively evaluated in 500 cells and the percentage of positive cells was determined.

Statistical analysis. The software GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used to perform statistical analyses. For quantitative results, means were compared using a one-way ANOVA, one-sample t-test, or t-test and its variants depending on the normality of data distribution. Relationships between qualitative variables were investigated with Fisher's exact test. The significance level was set to $p \leq 0.05$.

Data availability

The datasets generated and used during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 13 July 2022; Accepted: 11 October 2022

Published online: 22 October 2022

References

- American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2019* (American Cancer Society (American Cancer Society, 2019).
- INCA. Câncer de pele melanoma. <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma> (2020).
- Kuphal, S. & Bosserhoff, A. K. E-cadherin cell-cell communication in melanogenesis and during development of malignant melanoma. *Arch. Biochem. Biophys.* **524**, 43–47 (2012).
- Nieto, M. A., Huang, R.Y.-J., Jackson, R. A. & Thiery, J. P. EMT: 2016. *Cell* **166**, 21–45 (2016).
- Guarino, M., Rubino, B. & Ballabio, G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* **39**, 305–318 (2007).
- Hao, L., Ha, J. R., Kuzel, P., Garcia, E. & Persad, S. Cadherin switch from E- to N-cadherin in melanoma progression is regulated by the PI3K/PTEN pathway through Twist and Snail. *Br. J. Dermatol.* **166**, 1184–1197 (2012).
- Pedri, D., Karras, P., Landeloos, E., Marine, J. & Rambow, F. Epithelial-to-mesenchymal-like transition events in melanoma. *FEBS J.* <https://doi.org/10.1111/febs.16021> (2021).
- Caramel, J. *et al.* A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell* **24**, 466–480 (2013).
- Craene, B. D. & Berx, G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 97–110 (2013).
- Denecker, G. *et al.* Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression. *Cell Death Differ.* **21**, 1250–1261 (2014).
- Korpai, M., Lee, E. S., Hu, G. & Kang, Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J. Biol. Chem.* **283**, 14910–14914 (2008).
- Evans, J. M. M., Donnelly, L. A., Emslie-Smith, A. M., Alessi, D. R. & Morris, A. D. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* **330**, 1304–1305 (2005).
- Bowker, S. L., Majumdar, S. R., Veugelers, P. & Johnson, J. A. Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. *Diabetes Care* **29**, 254–258 (2006).
- Chae, Y. K. *et al.* Repurposing metformin for cancer treatment: Current clinical studies. *Oncotarget* **7**, 40767–40780 (2016).
- Podhorecka, M., Ibanez, B. & Dmoszynska, A. Metformin—Its potential anti-cancer and anti-aging effects. *Postepy Hig Med. Dosw.* **71**, 170–175 (2017).
- Cerezo, M. *et al.* Metformin blocks melanoma invasion and metastasis development in AMPK/p53-dependent manner. *Mol. Cancer Ther.* **12**, 1605–1615 (2013).
- Peppicelli, S. *et al.* Metformin is also effective on lactic acidosis-exposed melanoma cells switched to oxidative phosphorylation. *Cell Cycle* **15**, 1908–1918 (2016).
- Cerezo, M., Tomic, T., Ballotti, R. & Rocchi, S. Is it time to test biguanide metformin in the treatment of melanoma?. *Pigment Cell Melanoma Res.* **28**, 8–20 (2014).
- Liang, G. *et al.* Metformin upregulates E-cadherin and inhibits B16F10 cell motility, invasion and migration. *Oncol. Lett.* **10**, 1527–1532 (2015).

20. Tseng, H.-W., Li, S.-C. & Tsai, K.-W. Metformin treatment suppresses melanoma cell growth and motility through modulation of microRNA expression. *Cancers* **11**, 209 (2019).
21. Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M. A. & Weinberg, R. A. EMT in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 128–134 (2018).
22. Dongre, A. & Weinberg, R. A. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 69–84 (2019).
23. Zhang, C. & Wang, Y. Metformin attenuates cells stemness and epithelial–mesenchymal transition in colorectal cancer cells by inhibiting the Wnt3a/β-catenin pathway. *Mol. Med. Rep.* **19**, 1203–1209 (2019).
24. Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 178–196 (2014).
25. Ryabaya, O. *et al.* Metformin increases antitumor activity of MEK inhibitor binimetinib in 2D and 3D models of human metastatic melanoma cells. *Biomed. Pharmacother.* **109**, 2548–2560 (2019).
26. Suwei, D. *et al.* Metformin inhibits melanoma cell metastasis by suppressing the miR-5100/SPINK5/STAT3 axis. *Cell Mol. Biol. Lett.* **27**, 48 (2022).
27. Alves, M. G. *et al.* Relative expression of KLK5 to LEKTI is associated with aggressiveness of oral squamous cell carcinoma. *Transl. Oncol.* **14**, 100970 (2021).
28. Lin, W.-H. *et al.* STAT3 phosphorylation at Ser727 and Tyr705 differentially regulates the EMT–MET switch and cancer metastasis. *Oncogene* **40**, 791–805 (2021).
29. Pillai, M. *et al.* Mapping phenotypic heterogeneity in melanoma onto the epithelial–hybrid–mesenchymal axis. *Front. Oncol.* **12**. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.913803> (2022).
30. Murtas, D. *et al.* Role of epithelial–mesenchymal transition involved molecules in the progression of cutaneous melanoma. *Histochem. Cell Biol.* **148**, 639–649 (2017).
31. Yan, S. *et al.* Epithelial–mesenchymal expression phenotype of primary melanoma and matched metastases and relationship with overall survival. *Anticancer Res.* **36**, 6449–6456 (2016).
32. Etienne-Manneville, S. Neighborly relations during collective migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **30**, 51–59 (2014).
33. Mrozik, K. M., Blaschuk, O. W., Cheong, C. M., Zannettino, A. C. W. & Vandyke, K. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer* **18**, 939 (2018).
34. Combedazou, A. *et al.* Small GTPases orchestrate cell–cell communication during collective cell movement. *Small GTPases* **11**, 103–112 (2020).
35. Ashrafizadeh, M. *et al.* MicroRNAs and their influence on the ZEB family: Mechanistic aspects and therapeutic applications in cancer therapy. *Biomolecules* **10**, 1040 (2020).
36. Grootclaes, M. L. & Frisch, S. M. Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene* **19**, 3823–3828 (2000).
37. Comijn, J. *et al.* The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol. Cell* **7**, 1267–1278 (2001).
38. Vandewalle, C. *et al.* SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell–cell junctions. *Nucleic Acids Res.* **33**, 6566–6578 (2005).
39. Brunel, K., Verstaeppe, J., Vandamme, N. & Berx, G. Intrinsic balance between ZEB family members is important for melanocyte homeostasis and melanoma progression. *Cancers* **12**, 2248 (2020).
40. Vandamme, N. *et al.* The EMT transcription factor ZEB2 promotes proliferation of primary and metastatic melanoma while suppressing an invasive, mesenchymal-like phenotype. *Cancer Res.* **80**, 2983–2995 (2020).
41. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
42. Rötzer, V. *et al.* Desmoglein 3-dependent signaling regulates keratinocyte migration and wound healing. *J. Invest. Dermatol.* **136**, 301–310 (2016).
43. Veloso, E. S. *et al.* ZEB and Snail expression indicates epithelial–mesenchymal transition in canine melanoma. *Res. Vet. Sci.* **131**, 7–14 (2020).

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Grant number: 140269/2018-5) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

Author contributions

E.S.V., H.L.D.P., and E.F. designed the research. E.S.V. performed the experiments and data analysis. F.H.S.S. and T.S.R. helped maintain cell lines and in MTT assay. B.M.L. helped with cell motility assays. C.P.A. assisted in RNA extraction and qPCR. B.A.C., V.H.S.R.S., S.A.R., and M.R.A.C. assisted in the *in vivo* experiments (inoculation, maintenance, and euthanasia). BAC helped with histopathological and immunohistochemistry. E.S.V., H.L.D.P., and E.F. drafted the work. H.L.D.P. and E.F. coordinated the study.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22235-8>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to E.F.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

7. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos neste estudo e nas condições metodológicas empregadas podemos concluir que:

- A metformina promoveu comprometimento a viabilidade celular apenas em tratamentos com maior tempo de exposição (48 horas) na concentração de 5 mM, e não alterou significativamente os níveis de expressão de mRNA dos genes estudados em nenhuma das concentrações utilizadas;
- O uso da metformina em ambas as concentrações, mesmo sem interferência estatisticamente significativa nos padrões de expressão de genes relacionados a TEM, foi capaz de reduzir o potencial migratório das linhagens A-375 e B16-F10;
- O uso *in vitro* de metformina na concentração de 5 mM em células B16-F10, reduziu a formação de focos metastáticos pulmonares, no modelo de inoculação endovenosa dessas células em camundongos C57BL/6;
- O tratamento com 5 mM de metformina, *in vitro*, apresentou relação com a redução da expressão proteica nas metástases pulmonares de marcadores envolvidos na TEM e de indiferenciação celular.
- A redução da expressão proteica de marcadores envolvidos na TEM nas metástases pulmonares, promovida pelo tratamento *in vitro* com 5 mM de metformina, aparentemente possui relação com a redução da formação de metástases no modelo murino em células B16-F10.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACLOQUE, H. et al. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1438–1449, 1 jun. 2009.

AKBANI, R. et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. **Cell**, v. 161, n. 7, p. 1681–1696, jun. 2015.

ALIZADEH, A. M.; SHIRI, S.; FARSINEJAD, S. Metastasis review: from bench to bedside. **Tumor Biology**, v. 35, n. 9, p. 8483–8523, 8 set. 2014.

ALONSO, S. R. et al. A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. **Cancer Research**, v. 67, n. 7, p. 3450–3460, 1 abr. 2007.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2019**. Atlanta: American Cancer Society, 2019.

AMSCHLER, K. et al. Morphological Plasticity of Human Melanoma Cells Is Determined by Nanoscopic Patterns of E- and N-Cadherin Interactions. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 139, n. 3, p. 562–572, 1 mar. 2019.

ANDO, H. et al. Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packaging, release, uptake, and dispersion. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 4, p. 1222–1229, abr. 2012.

ARMSTRONG, A. J. et al. Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. **Molecular Cancer Research**, v. 9, n. 8, p. 997–1007, 1 ago. 2011.

ARNOLD, M. et al. Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. **JAMA Dermatology**, v. 158, n. 5, p. 495, 1 maio 2022.

ARZARENA, I.; WELLBROCK, C. Targeting invasive properties of melanoma cells. **The FEBS Journal**, v. 284, n. 14, p. 2148–2162, jul. 2017.

ASHRAFIZADEH, M. et al. MicroRNAs and their influence on the ZEB Family: mechanistic aspects and therapeutic applications in cancer therapy. **Biomolecules**, v. 10, n. 7, p. 1040, 12 jul. 2020.

BAILEY, C. J. Metformin: historical overview. **Diabetologia**, v. 60, n. 9, p. 1566–1576, 3 set. 2017.

BALCH, C. M. et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 16, p. 3635–3648, 15 ago. 2001.

BALCH, C. M. et al. Multivariate analysis of prognostic factors among 2,313 patients with stage III melanoma: comparison of nodal micrometastases versus macrometastases. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 14, p. 2452–2459, 10 maio 2010.

BASRUR, V. et al. Proteomic analysis of early melanosomes: Identification of novel melanosomal proteins. **Journal of Proteome Research**, v. 2, n. 1, p. 69–79, 2003.

BASTIAN, B. C. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, n. 1, p. 239–271, 24 jan. 2014.

BENNETT, D. C.; LAMOREUX, M. L. The color loci of mice - A genetic century. **Pigment Cell Research**, v. 16, n. 4, p. 333–344, 2003.

BERX, G.; ROY, F. VAN. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. **Breast Cancer Research**, v. 3, n. 5, p. 289, 2001.

BOWKER, S. L. et al. Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. **Diabetes Care**, v. 29, n. 2, p. 254–258, 2006.

BRADFORD, P. T. et al. Acral lentiginous melanoma: Incidence and survival patterns in the United States, 1986-2005. **Archives of Dermatology**, v. 145, n. 4, p. 427–434, 2009.

BRASIL. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: Rename 2020**. Brasília: Ministério da Saúde, 2020.

BRESLOW, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. **Annals of Surgery**, v. 172, n. 5, p. 902–908, nov. 1970.

BUCZYŃSKA, A. et al. Metformin Intervention—A Panacea for Cancer Treatment? **Cancers**, v. 14, n. 5, p. 1336, 4 mar. 2022.

- BUROTTO, M. et al. The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. **Cancer**, v. 120, n. 22, p. 3446–3456, 15 nov. 2014.
- CANDIDO, S. et al. Analysis of the B-RAFV600E mutation in cutaneous melanoma patients with occupational sun exposure. **Oncology Reports**, v. 31, n. 3, p. 1079–1082, 2014.
- CEREZO, M. et al. Metformin blocks melanoma invasion and metastasis development in AMPK/p53-dependent manner. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 12, n. 8, p. 1605–15, 1 ago. 2013.
- CHI, A. et al. Proteomic and bioinformatic characterization of the biogenesis and function of melanosomes. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 11, p. 3135–3144, 2006.
- CLARK, E. A. et al. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. **Nature**, v. 406, n. 6795, p. 532–535, 2000.
- CLARK, W. H. et al. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. **Cancer research**, v. 29, n. 3, p. 705–27, mar. 1969.
- CLARK, W. H. et al. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Human Pathology**, v. 15, n. 12, p. 1147–65, dez. 1984.
- CUÉNOT, L. La loi de Mendel et l'hérédité de la pigmentation chez les souris. **Archives de Zoologie Expérimentale et Générale**, v. 10, n. 3, p. XXVII–XXX, jan. 1902.
- CURTIN, J. A. et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 20, p. 2135–47, 17 nov. 2005.
- DANKNER, M. et al. Classifying BRAF alterations in cancer: New rational therapeutic strategies for actionable mutations. **Oncogene**, v. 37, n. 24, p. 3183–3199, 2018.
- DAVIES, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949–954, 2002.
- DENECKER, G. et al. Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression. **Cell Death & Differentiation**, v. 21, n. 8, p. 1250–1261, 25 ago. 2014.
- DROSTEN, M. et al. Genetic analysis of Ras signalling pathways in cell proliferation, migration and survival. **EMBO Journal**, v. 29, n. 6, p. 1091–1104, 2010.

- DUNCAN, L. M. The classification of cutaneous melanoma. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 23, n. 3, p. 501–513, 2009.
- ERICKSON, C. A.; GOINS, T. L. Avian neural crest cells can migrate in the dorsolateral path only if they are specified as melanocytes. **Development**, v. 121, n. 3, p. 915–924, 1995.
- ETIENNE-MANNEVILLE, S. Neighborly relations during collective migration. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 30, n. 1, p. 51–59, out. 2014.
- EVANS, J. M. M. et al. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. **BMJ**, v. 330, n. 7503, p. 1304–1305, 4 jun. 2005.
- FANG, D.; HERLYN, M. The dynamic roles of cell-surface receptors in melanoma development. Em: HEARING, V. J.; LEONG, S. P. L. (Eds.). **From Melanocytes to Melanoma: The Progression to Malignancy**. 1. ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2006. p. 169–181.
- FEDORENKO, I. V; GIBNEY, G. T.; SMALLEY, K. S. M. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management. **Oncogene**, v. 32, n. 25, p. 3009–3018, 15 jun. 2013.
- FIDLER, I. J. Selection of successive tumour lines for metastasis. **Nature New Biology**, v. 242, n. 118, p. 148–149, abr. 1973.
- FORONI, C. et al. Epithelial–mesenchymal transition and breast cancer: Role, molecular mechanisms and clinical impact. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 6, p. 689–697, out. 2012.
- FURUKAWA, F. et al. Roles of E- and P-cadherin in the human skin. **Microscopy Research and Technique**, v. 38, n. 4, p. 343–352, 15 ago. 1997.
- GARG, M. Epithelial, mesenchymal and hybrid epithelial/mesenchymal phenotypes and their clinical relevance in cancer metastasis. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 19, p. 1–13, 21 mar. 2017.
- GARNETT, M. J.; MARAIS, R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. **Cancer Cell**, v. 6, n. 4, p. 313–319, 2004.
- GERNER, R. E.; KITAMURA, H.; MOORE, G. E. Studies of tumor cell lines derived from patients with malignant melanoma. **Oncology**, v. 31, n. 1, p. 31–43, 1975.

GERSHENWALD, J. E. et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 6, p. 472–492, 2017.

GIARD, D. J. et al. In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, n. 5, p. 1417–1423, 1973.

GLOUSHANKOVA, N. A.; ZHITNYAK, I. Y.; RUBTSOVA, S. N. Role of epithelial-mesenchymal transition in tumor progression. **Biochemistry (Moscow)**, v. 83, n. 12–13, p. 1469–1476, 2018.

GOMES, M. B. et al. Treatment of type 2 diabetes mellitus worldwide: Baseline patient characteristics in the global DISCOVER study. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 151, p. 20–32, 2019.

GREENBURG, G.; HAY, E. D. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. **Journal of Cell Biology**, v. 95, n. 1, p. 333–339, 1 out. 1982.

GRIGORE, A. D. et al. **Tumor budding: The name is EMT. partial EMT.** **Journal of Clinical Medicine** MDPI, , 29 abr. 2016.

GROSSE-WILDE, A. et al. Stemness of the hybrid Epithelial/Mesenchymal state in breast cancer and its association with poor survival. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0126522, 2015.

GUAN, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 5, p. 402–418, set. 2015.

HAASS, N. K.; HERLYN, M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 10, n. 2, p. 153–163, nov. 2005.

HAN, B. et al. Metformin inhibits thyroid cancer cell growth, migration, and EMT through the mTOR pathway. **Tumor Biology**, v. 36, n. 8, p. 6295–6304, 2015.

HAO, L. et al. Cadherin switch from E- to N-cadherin in melanoma progression is regulated by the PI3K/PTEN pathway through Twist and Snail. **British Journal of Dermatology**, v. 166, n. 6, p. 1184–1197, jun. 2012.

HASANVAND, A. The role of AMPK-dependent pathways in cellular and molecular mechanisms of metformin: a new perspective for treatment and prevention of diseases.

Inflammopharmacology, v. 30, n. 3, p. 775–788, 13 jun. 2022.

HAY, E. D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. **Cells Tissues Organs**, v. 154, n. 1, p. 8–20, 1995.

HIROBE, T. How are proliferation and differentiation of melanocytes regulated? **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 24, n. 3, p. 462–478, 2011.

HSU, M. Y. et al. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. **The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 188–94, abr. 1996.

HU, Z.-Z. et al. Comparative bioinformatics analyses and profiling of lysosome-related organelle proteomes. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 259, n. 1–3, p. 147–160, jan. 2007.

HUANG, R. Y.-J.; GUILFORD, P.; THIERY, J. P. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 19, p. 4417–4422, 2012.

IN 'T HOUT, F. E. M. et al. Prognostic importance of the extent of ulceration in patients with clinically localized cutaneous melanoma. **Annals of Surgery**, v. 255, n. 6, p. 1165–1170, jun. 2012.

INCA. **Estimativa 2016 - Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde, 2015.

INCA. **Estimativa 2020 - Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde, 2019.

INCA. **Câncer de pele melanoma**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>>. Acesso em: 10 jun. 2022.

INCA. **Atlas On-line de Mortalidade**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/app/mortalidade>>. Acesso em: 31 out. 2022.

ISHIWATA, T. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: Novel therapeutic targets for cancer. **Pathology International**, v. 66, n. 11, p. 601–608, 1 nov. 2016.

ITO, S.; WAKAMATSU, K.; OZEKI, H. Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis. **Pigment Cell Research**, v. 13, n. SUPPL. 8, p. 103–109, 2000.

JIMBOW, K. et al. Some aspects of melanin biology: 1950-1975. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 67, n. 1, p. 72–89, 1976.

JORDAN, N. V.; JOHNSON, G. L.; ABELL, A. N. Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer. **Cell Cycle**, v. 10, n. 17, p. 2865–2873, 2011.

KIBBI, N.; KLUGER, H.; CHOI, J. N. Melanoma: Clinical Presentations. Em: KAUFMAN, H. L.; MEHNERT, J. M. (Eds.). **Melanoma**. Cancer Treatment and Research. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 167p. 107–129.

KIM, J. E. et al. Heterogeneity of expression of epithelial–mesenchymal transition markers in melanocytes and melanoma cell lines. **Frontiers in Genetics**, v. 4, n. MAY, 2013.

KLOSE, A. et al. Selective disactivation of neurofibromin GAP activity in neurofibromatosis type 1 (NF1). **Human Molecular Genetics**, v. 7, n. 8, p. 1261–1268, 1998.

KOGA, S.; NAKANO, M.; TERO-KUBOTA, S. Generation of superoxide during the enzymatic action of tyrosinase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 292, n. 2, p. 570–575, 1992.

KREIZENBECK, G. M. et al. Prognostic significance of cadherin-based adhesion molecules in cutaneous malignant melanoma. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 17, n. 4, p. 949–58, 2008.

KRENGEL, S. et al. Cadherin expression pattern in melanocytic tumors more likely depends on the melanocyte environment than on tumor cell progression. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 31, n. 1, p. 1–7, jan. 2004.

KUPHAL, S.; BOSSERHOFF, A. K. E-cadherin cell-cell communication in melanogenesis and during development of malignant melanoma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 524, n. 1, p. 43–47, 2012.

KUZU, O. F. et al. Current State of Animal (Mouse) Modeling in Melanoma Research. **Cancer Growth and Metastasis**, v. 8, n. S1, p. 81–94, 6 jan. 2015.

- LAMOREUX, M. L.; WAKAMATSU, K.; ITO, S. Interaction of major coat color gene functions in mice as studied by chemical analysis of eumelanin and pheomelanin. **Pigment Cell Research**, v. 14, n. 1, p. 23–31, 2001.
- LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 3, p. 178–196, 2014.
- LARRIBÈRE, L.; UTIKAL, J. Multiple roles of NF1 in the melanocyte lineage. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 29, n. 4, p. 417–425, 2016.
- LAVOIE, H.; THERRIEN, M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 5, p. 281–298, 2015.
- LEBOIT, P. E. et al. **Pathology & Genetics - Skin Tumours**. 3. ed. Lyon: IARC Press, 2006.
- LEE, J. M. et al. The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. **The Journal of Cell Biology**, v. 172, n. 7, p. 973–981, 2006.
- LI, A. et al. Rac1 drives melanoblast organization during mouse development by orchestrating pseudopod-driven motility and cell-cycle progression. **Developmental Cell**, v. 21, n. 4, p. 722–734, 2011.
- LI, G.; SATYAMOORTHY, K.; HERLYN, M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. **Cancer Research**, v. 61, n. 9, p. 3819–25, 2001.
- LIANG, G. et al. Metformin upregulates E-cadherin and inhibits B16F10 cell motility, invasion and migration. **Oncology Letters**, v. 10, n. 3, p. 1527–1532, set. 2015.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LOMAS, A.; LEONARDI-BEE, J.; BATH-HEXTALL, F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. **British Journal of Dermatology**, v. 166, n. 5, p. 1069–1080, 2012.
- LORET, N. et al. The Role of Epithelial-to-Mesenchymal Plasticity in Ovarian Cancer Progression and Therapy Resistance. **Cancers**, v. 11, n. 6, p. 838, 17 jun. 2019.
- LUCIANI, F. et al. Biological and mathematical modeling of melanocyte development. **Development**, v. 138, n. 18, p. 3943–3954, 2011.

LV, Z.; GUO, Y. Metformin and its benefits for various diseases. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 1–10, 16 abr. 2020.

MARKOVIC, S. N. et al. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: Epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 82, n. 3, p. 364–380, 2007.

MASTORE, M.; KOHLER, L.; NAPPI, A. J. Production and utilization of hydrogen peroxide associated with melanogenesis and tyrosinase-mediated oxidations of DOPA and dopamine. **FEBS Journal**, v. 272, n. 10, p. 2407–2415, 2005.

MCCAIN, J. The MAPK (ERK) pathway: Investigational combinations for the treatment of BRAF- mutated metastatic melanoma. **P and T**, v. 38, n. 2, 2013.

MERRILL, S. J. et al. Exponentially increasing incidences of cutaneous malignant melanoma in europe correlate with low personal annual UV doses and suggests 2 major risk factors. **Dermato-Endocrinology**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2015.

MILLER, A. J.; MIHM, M. C. Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 1, p. 51–65, 6 jul. 2006.

MITISIS, D. K. L. et al. Trends in demographics, incidence, and survival in children, adolescents and young adults (AYA) with melanoma: A Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) population-based analysis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 15_suppl, p. 9058–9058, 2015.

MROZIK, K. M. et al. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 939, 1 dez. 2018.

MUÑOZ-COUSELO, E. et al. NRAS-mutant melanoma: current challenges and future prospect. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 10, p. 3941–3947, ago. 2017.

NAKAMURA, K. et al. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. **Life Sciences**, v. 70, n. 7, p. 791–798, 2002.

NAPPI, A. J.; VASS, E. Hydrogen peroxide generation associated with the oxidations of the eumelanin precursors 5,6-dihydroxyindole and 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid.

Melanoma Research, v. 6, n. 5, p. 341–349, out. 1996.

NICOLSON, G. L.; BRUNSON, K. W.; FIDLER, I. J. Specificity of arrest, survival, and growth of selected metastatic variant cell lines. **Cancer research**, v. 38, p. 4105–11, nov. 1978.

NIETO, M. A. et al. EMT: 2016. **Cell**, v. 166, n. 1, p. 21–45, jun. 2016.

NISHIMURA, E. et al. Regulation of E- and P-cadherin expression correlated with melanocyte migration and diversification. **Developmental Biology**, v. 215, n. 2, p. 155–166, 1999.

NISHIMURA, E. K. et al. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. **Nature**, v. 416, n. 6883, p. 854–860, 2002.

PARK, S. et al. Carnosic Acid Inhibits the Epithelial-Mesenchymal Transition in B16F10 Melanoma Cells: A Possible Mechanism for the Inhibition of Cell Migration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 7, p. 12698–12713, 17 jul. 2014.

PARMENTER, T. J. et al. Response of BRAF mutant melanoma to BRAF inhibition is mediated by a network of transcriptional regulators of glycolysis. **Cancer Discovery**, v. 4, n. 4, p. 423–433, 1 abr. 2014.

PATTON, E. E. et al. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. **Current Biology**, v. 15, n. 3, p. 249–254, fev. 2005.

PEINADO, H.; OLMEDA, D.; CANO, A. Snail, ZEB and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 6, p. 415–428, 17 jun. 2007.

PEPPICELLI, S. et al. Extracellular acidity strengthens mesenchymal stem cells to promote melanoma progression. **Cell Cycle**, v. 14, n. 19, p. 3088–3100, 2015.

PEPPICELLI, S. et al. Metformin is also effective on lactic acidosis-exposed melanoma cells switched to oxidative phosphorylation. **Cell Cycle**, v. 15, n. 14, p. 1908–1918, 2016.

- PODHORECKA, M.; IBANEZ, B.; DMOSZYŃSKA, A. Metformin – its potential anti-cancer and anti-aging effects. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, v. 71, n. 1, p. 170–175, 2017.
- POSTE, G. et al. In vitro selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue-invasive properties. **Cancer Research**, v. 40, n. 5, p. 1636–44, maio 1980.
- PRIEST, A. V.; SHAFRAZ, O.; SIVASANKAR, S. Biophysical basis of cadherin mediated cell-cell adhesion. **Experimental Cell Research**, v. 358, n. 1, p. 10–13, 2017.
- QIANG, P. et al. Metformin inhibits proliferation and migration of endometrial cancer cells through regulating PI3K/AKT/MDM2 pathway. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 4, p. 1778–1785, 2019.
- RAPOSO, G. et al. Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. **Journal of Cell Biology**, v. 152, n. 4, p. 809–823, 2001.
- RAWLES, M. E. Origin of Pigment Cells from the Neural Crest in the Mouse Embryo. **Physiological Zoology**, v. 20, n. 3, p. 248–266, jul. 1947.
- ROBERT, G. et al. SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. **Cancer Research**, v. 66, n. 15, p. 7516–7523, 2006.
- RÖTZER, V. et al. Desmoglein 3-Dependent Signaling Regulates Keratinocyte Migration and Wound Healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 1, p. 301–310, 1 jan. 2016.
- RYABAYA, O. et al. Metformin increases antitumor activity of MEK inhibitor binimetinib in 2D and 3D models of human metastatic melanoma cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 2548–2560, jan. 2019.
- SALVATORE, T. et al. Metformin: An old drug against old age and associated morbidities. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 160, p. 108025, 1 fev. 2020.
- SARAEI, P. et al. The beneficial effects of metformin on cancer prevention and therapy: a comprehensive review of recent advances. **Cancer Management and Research**, v. Volume 11, p. 3295–3313, abr. 2019.

- SATO, R. et al. Concise Review: Stem Cells and Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Biological Implications and Therapeutic Targets. **Stem Cells**, v. 34, n. 8, p. 1997–2007, 1 ago. 2016.
- SCHATTON, T.; FRANK, M. H. Cancer stem cells and human malignant melanoma. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 21, n. 1, p. 39–55, 2008.
- SEIJI, M.; FITZPATRICK, T. B. The reciprocal relationship between melanization and tyrosinase activity in melanosomes (melanin granules). **The Journal of Biochemistry**, v. 49, n. 6, p. 700–706, jun. 1961.
- SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 6, p. 345–58, 29 jun. 2016.
- SHAPIRO, L. et al. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. **Nature**, v. 374, n. 6520, p. 327–337, 23 mar. 1995.
- SHIBUE, T.; WEINBERG, R. A. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 10, p. 611–629, 11 out. 2017.
- SHITARA, D. et al. Nevus-associated melanomas: Clinicopathologic features. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 142, n. 4, p. 485–491, 2014.
- SHOOK, D.; KELLER, R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial–mesenchymal transitions in early development. **Mechanisms of Development**, v. 120, n. 11, p. 1351–1383, nov. 2003.
- SIGURDSSON, V. et al. Endothelial induced EMT in breast epithelial cells with stem cell properties. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e23833, 2011.
- SIMON, J. D. et al. Current challenges in understanding melanogenesis: Bridging chemistry, biological control, morphology, and function. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 22, n. 5, p. 563–579, 2009.
- SMOLLER, B. R. Histologic criteria for diagnosing primary cutaneous malignant melanoma. **Modern Pathology**, v. 19, n. S2, p. S34–S40, 17 fev. 2006.

STEEL, K. P.; DAVIDSON, D. R.; JACKSON, I. J. TRP-2/DT, a new early melanoblast marker, shows that steel growth factor (c-kit ligand) is a survival factor. **Development**, v. 115, n. 4, p. 1111–9, ago. 1992.

STERNE, J. Du nouveau dans les antidiabétiques. La NN diméthylamino guanyl guanidine. **Maroc Med.**, v. 13, n. 36, p. 1295–6, 1957.

SZTILLER-SIKORSKA, M. et al. Sphere formation and self-renewal capacity of melanoma cells is affected by the microenvironment. **Melanoma Research**, v. 22, n. 3, p. 215–224, jun. 2012.

TANABE, S. et al. Interplay of EMT and CSC in Cancer and the Potential Therapeutic Strategies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 17 jun. 2020.

THIERY, J. P. et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 871–890, nov. 2009.

TUCCI, M. G. et al. Involvement of E-cadherin, β -catenin, CDC42 and CXCR4 in the progression and prognosis of cutaneous melanoma. **British Journal of Dermatology**, v. 157, n. 6, p. 1212–1216, dez. 2007.

TUCKER, R. P. Neural crest cells: a model for invasive behavior. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 2, p. 173–177, fev. 2004.

VAN RAAMSDONK, C. D. et al. Effects of G-protein mutations on skin color. **Nature Genetics**, v. 36, n. 9, p. 961–968, 2004.

VELOSO, E. S. et al. ZEB and Snail expression indicates epithelial-mesenchymal transition in canine melanoma. **Research in Veterinary Science**, v. 131, p. 7–14, 1 ago. 2020.

VIROS, A. et al. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 6, p. 0941–0952, 2008.

VLASHI, E.; PAJONK, F. Cancer stem cells, cancer cell plasticity and radiation therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 31, p. 28–35, 1 abr. 2015.

WANG, Y.; WU, Z.; HU, L. Epithelial-mesenchymal transition phenotype, metformin, and survival for colorectal cancer patients with diabetes mellitus II. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2017, p. 1–10, 2017.

WANG, Y.; WU, Z.; HU, L. The regulatory effects of metformin on the [SNAIL/miR-34]:[ZEB/miR-200] system in the epithelial-mesenchymal transition(EMT) for colorectal cancer(CRC). **European Journal of Pharmacology**, v. 834, p. 45–53, 5 set. 2018.

WANG, Y.; ZHOU, B. P. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis. **Chinese Journal of Cancer**, v. 30, n. 9, p. 603–611, 5 set. 2011.

WERNER, E. A.; BELL, J. CCXIV. - The preparation of methylguanidine, and of $\beta\beta$ -dimethylguanidine by the interaction of dicyanodiamide, and methylammonium and dimethylammonium chlorides respectively. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 121, n. 1790, p. 1790–1794, 1922.

WILKIE, A. L.; JORDAN, S. A; JACKSON, I. J. Neural crest progenitors of the melanocyte lineage: coat colour patterns revisited. **Development**, v. 129, n. 14, p. 3349–57, jul. 2002.

YU, M. et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. **Science**, v. 339, n. 6119, p. 580–584, 1 fev. 2013.

ZHANG, C.; WANG, Y. Metformin attenuates cells stemness and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells by inhibiting the Wnt3a/ β -catenin pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 19, n. 2, p. 1203–1209, 2019.

ZHANG, K.-F. et al. Metformin enhances radiosensitivity in hepatocellular carcinoma by inhibition of specificity protein 1 and epithelial-to-mesenchymal transition. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 15, n. 7, p. 1603, 2019.

ZHONG, W. et al. Comparison of the molecular and cellular phenotypes of common mouse syngeneic models with human tumors. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 2, 2 dez. 2020.

ZOU, Z. et al. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges. **Cell & Bioscience**, v. 10, n. 1, p. 31, 10 dez. 2020.

9. ANEXOS

9.1. ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Figura 2. Ensaio de cicatrização de feridas com células A-375. Fotomicrografias ao longo do protocolo experimental demonstrando a migração celular para cicatrização da ferida na monocamada de células.

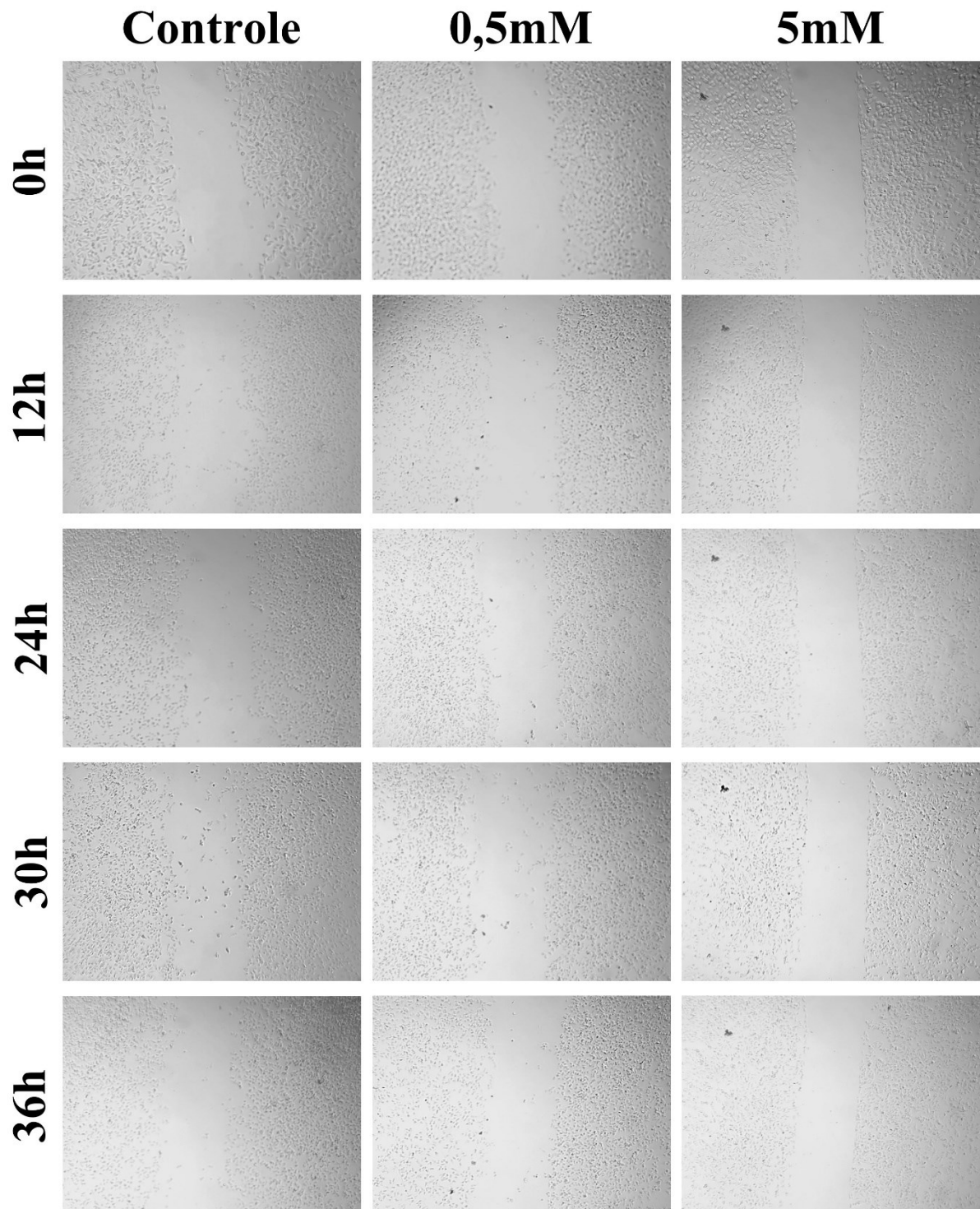
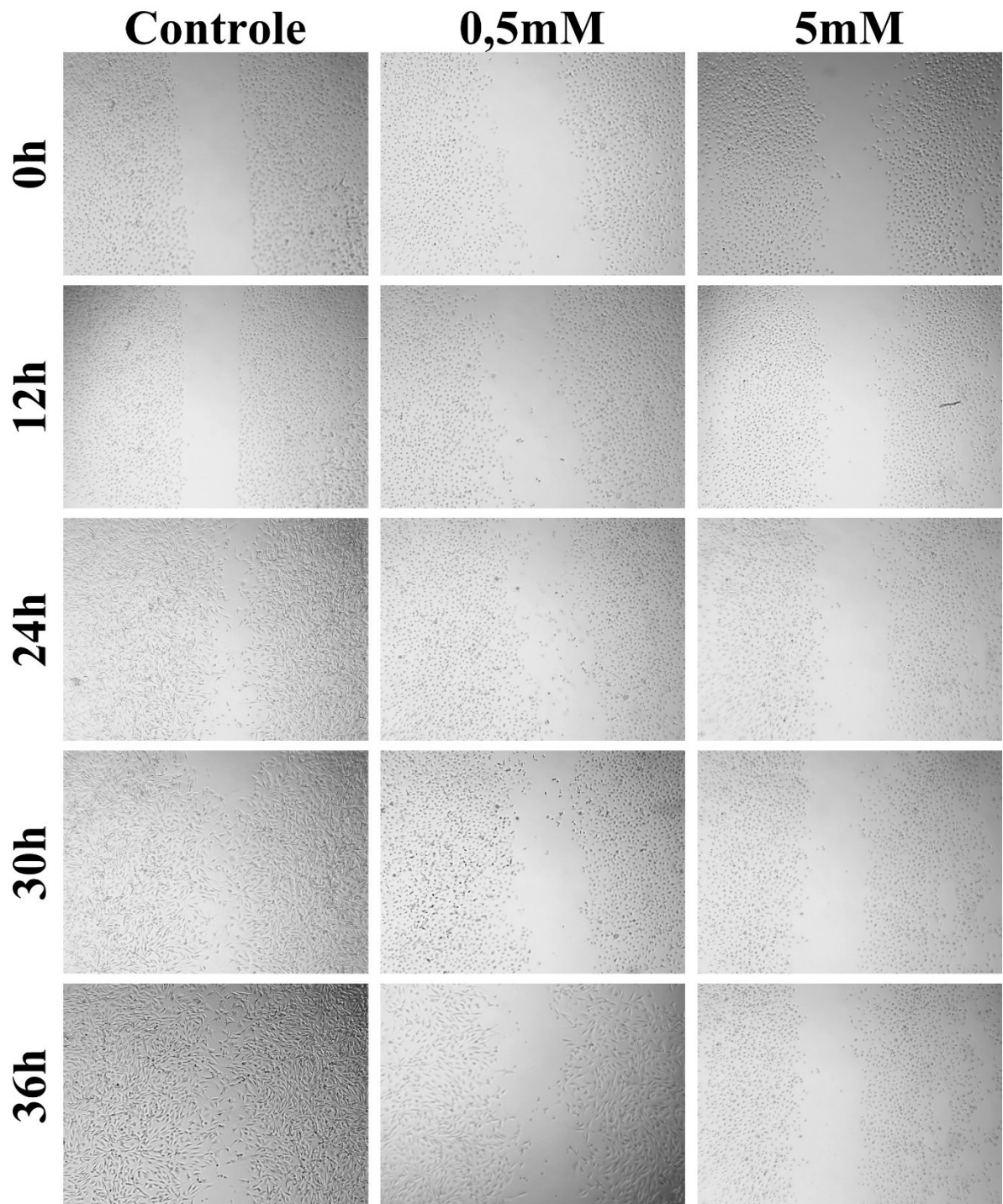


Figura 3. Ensaio de cicatrização de feridas com células B16-F10. Fotomicrografias ao longo do protocolo experimental demonstrando a migração celular para cicatrização da ferida na monocamada de células.



9.2. GRÁFICOS DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

Figura 4. Expressão imuno-histoquímica de N-caderina, vimentina e Sox10. Distribuição percentual dos casos de cada grupo experimental de acordo com o score de expressão observado nas metástases pulmonares de células B16-F10 em camundongos C57BL/6 para a) N-caderina; b) vimentina; c) percentual de células marcadas para Sox10; d) intensidade de marcação de Sox10.

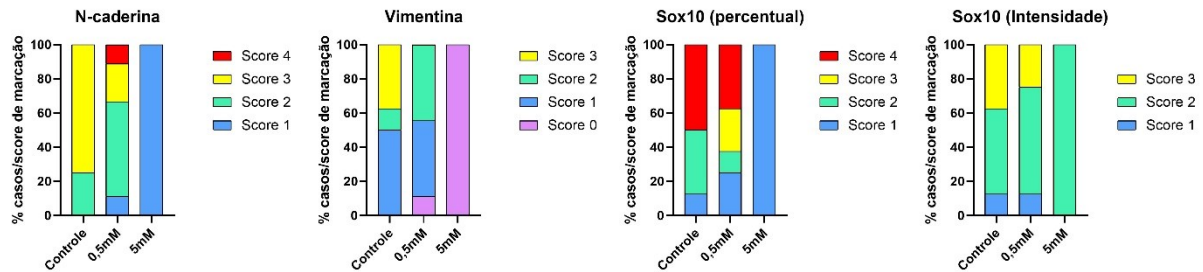
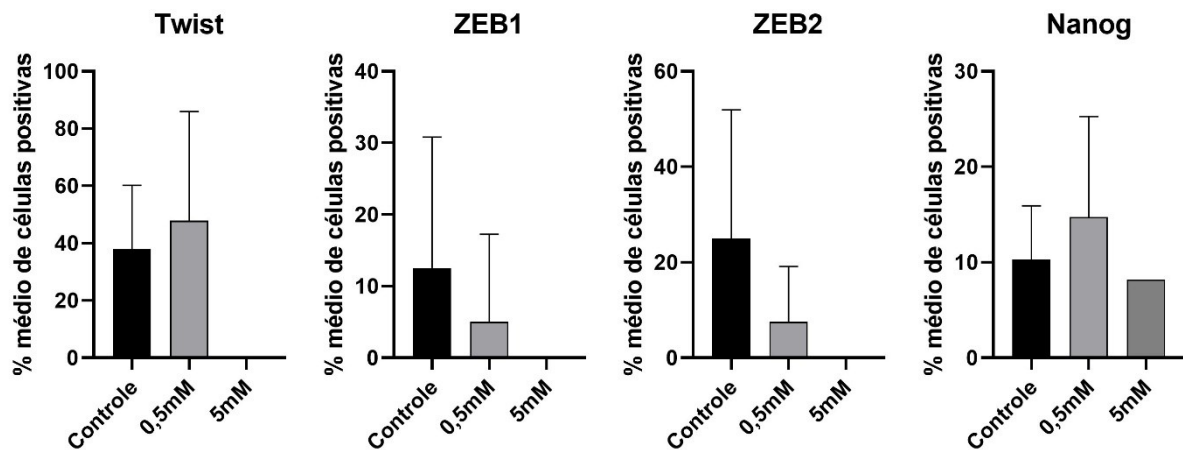


Figura 5. Expressão imuno-histoquímica de Twist, ZEB1, ZEB2 e Nanog. Percentual médio de células positivas para a expressão dos fatores de transcrição a) Twist; b) ZEB1; c) ZEB2 e d) Nanog.



9.3. APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFMG)

Figura 6. Carta de aprovação do CEUA/UFMG



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 143/2019
Título do projeto: Uso da tomografia por emissão de pósitrons (PET) na avaliação da progressão de melanomas submetidos ao tratamento com metformina in vitro
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Enio Ferreira
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Patologia

Situação atual: Decisão Final - Aprovado

Aprovado na reunião do dia 05/08/2019. Validade: 05/08/2019 à 04/08/2024
 Belo Horizonte, 05/08/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
 Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@proq.ufmg.br

9.4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1. PUBLICAÇÕES:

1.1. Artigos:

- *Epithelial-mesenchymal transition inhibition by metformin reduces melanoma lung metastasis in a murine model.* **Autores:** Emerson Soares Veloso, Bárbara Andrade de Carvalho, Felipe Henrique de Souza Silva, Thais Salviana Ribeiro, Bruna Mendes Lima, Camila Pereira Almeida, Vitor Henrique Soares Romão, Sara Aparecida Rocha, Marina Rios de Araujo Campos, Helen Lima Del Puerto, Enio Ferreira. **Revista:** *Scientific Reports*. **Ano:** 2022.
- *COX-2 expression in mammary invasive micropapillary carcinoma is associated with prognostic factors and acts as a potential therapeutic target in comparative oncology.* **Autores:** Thaynan Cunha Vieira, Evelyn Ane Oliveira, Bárbara Jaime dos Santos, Fernanda Rezende Souza, Emerson Soares Veloso, Cristiana Buzelin Nunes, Helen Lima Del Puerto, Geovanni Dantas Cassali. **Revista:** *Frontiers in Veterinary Science*. **Ano:** 2022.
- *COX-2 Silencing in Canine Malignant Melanoma Inhibits Malignant Behaviour.* **Autores:** Tatiany L. Silveira; Lisa Y. Pang; Alexandra Di Domenico; Emerson S. Veloso; Istefani L. D. Silva; Helen L. Del Puerto; Enio Ferreira; David J. Argyle. **Revista:** *Frontiers in Veterinary Science*. **Ano:** 2021.
- *Pro-caspase-3 is constitutively expressed in luteinized granulosa cells from women undergoing controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization.* **Autores:** Camila P. Almeida; Camila O. Silveira; Enio Ferreira; Marcia C. Ferreira; Gabriella G. Oliveira; Emerson S. Veloso; Felipe H. S. Silva; Santuza S. Coelho; Leonardo M. Moraes; Fernando M. Reis; Helen L. Del Puerto. **Revista:** *Acta Histochemica*. **Ano:** 2021.
- *Cutaneous mast cell tumor in a captive Bush dog (*Speothos venaticus*): pathological and immunophenotypical aspects - case report.* **Autores:** D.O. Santos; A.R. Oliveira, T.P. Carvalho, N.F. Paula, H.P. Tinoco, C.M. Coelho, A.T.P.G. Ribeiro, G.C. Martins, E.S. Veloso, E. Ferreira, F. Pierezan, R.L. Santos. **Revista:** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. **Ano:** 2021.
- *ZEB and snail expression indicates epithelial-mesenchymal transition in canine melanoma.* **Autores:** Emerson Soares Veloso, Ivy Nayra Nascimento Gonçalves, Tatiany Luiza Silveira, Juliane Taynar do Espírito Santo, Larissa Vieira Figueiredo, Mary Suzan Varaschin, Geovanni Dantas Cassali, Enio Ferreira. **Revista:** *Research in Veterinary Science*. **Ano:** 2020.
- *Diverse roles of epidermal growth factors receptors in oral and cutaneous canine melanomas.* **Autores:** Emerson Soares Veloso, Ivy Nayra Nascimento Gonçalves, Tatiany Luiza Silveira, Fernando Soares Oliveira, Déborah Soares Vieira, Geovanni Dantas Cassali, Helen Lima Del Puerto, Enio Ferreira. **Revista:** *BMC Veterinary Research*. **Ano:** 2020.
- *Use of Giemsa staining for the immunohistochemical counterstaining in canine melanomas: an -old and forgotten- method.* **Autores:** Tatiany Luiza Silveira, Emerson Soares Veloso, Ivy Nayra Nascimento Gonçalves, Enio Ferreira. **Revista:** *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. **Ano:** 2020.

- *Cyclooxygenase-2 expression is associated with infiltration of inflammatory cells in oral and skin canine melanomas.* **Autores:** Tatiany Luiza Silveira, Emerson Soares Veloso, Ivy Nayra Nascimento Gonçalves, Renato Felipe da Costa, Michele Angela Rodrigues, Geovanni Dantas Cassali, Helen Lima del Puerto, Lisa Y. Pang, David J. Argile, Enio Ferreira. **Revista:** *Veterinary and Comparative Oncology*. **Ano:** 2020.
- *Versican and Tumor-Associated Macrophages Promotes Tumor Progression and Metastasis in Canine and Murine Models of Breast Carcinoma.* **Autores:** Diego Carlos dos Reis, Karine Araújo Damasceno, Cecilia Bonolo de Campos, Emerson Soares Veloso, Gabriela Rafaela Arantes Pêgas, Lucas Rocha Kraemer, Michele Angela Rodrigues, Matheus Silvério Mattos, Dawidson Assis Gomes, Paula Peixoto Campos, Enio Ferreira, Remo Castro Russo, Geovanni Dantas Cassali. **Revista:** *Frontiers in Oncology*. **Ano:** 2019.
- *PIG10, the Proteolytic Fraction from *Vasconcellea cundinamarcensis*, Stimulates Tissue Repair after Acute Exposure to Ultraviolet B Radiation.* **Autores:** Kátia M. Freitas, Ana C. Araújo e Silva, Emerson S. Veloso, Ênio Ferreira, Lucíola S. Barcelos, Marcelo V. Caliari, Carlos E. Salas, Miriam T. P. Lopes. **Revista:** *International Journal of Molecular Sciences*. **Ano:** 2019.
- *Quantification of EGFR family in canine mammary ductal carcinomas in situ: implications on the histological graduation.* **Autores:** Emerson Soares Veloso, Ivy Nayra Nascimento Gonçalves, Jaqueline Amorim Arantes, Rafael Vitor Santos de Abreu, Geovanni Dantas Cassali, Enio Ferreira. **Revista:** *Veterinary Research Communications*. **Ano:** 2019.
- *Expression of EGFR family and p53 in a patient with Synchronous Primary Endometrial Adenocarcinoma and Clear Cell Renal Carcinoma: a Case Report.* **Autores:** Priscila Fernanda da Silva Martins, Izabella Cristina Alves Souza, Enio Ferreira, Emerson Soares Veloso, Tatiany Luiza Silveira, Adam Underwood, Fabiano Conde Araujo, Helen Lima Del-Puerto. **Revista:** *Brazilian Journal of Oncology*. **Ano:** 2019.

1.2. Resumos publicados em Anais de eventos científicos:

- *Efeito do tratamento com metformina sobre a expressão de marcadores de transição epitélio-mesênquima em modelo murino de metástases pulmonares de melanoma.* **Autores:** Emerson Soares Veloso, Marina Rios de Araújo Campos, Bárbara Andrade de Carvalho, Thais Salviana Ribeiro, Sara Aparecida Rocha, Bhanca Lopes Teixeira, Vitor Henrique Soares Romão da Silva, Helen Lima del Puerto, Enio Ferreira. **Ano:** 2020. **Evento:** VII Encontro de Patologia da UFMG/I Simpósio Online de Patologia. **Publicação:** Anais do VII Encontro de Patologia da UFMG/I Simpósio Online de Patologia.
- *Inibição de metástases pulmonares pela metformina em modelo murino de melanoma.* **Autores:** Marina Rios de Araújo Campos, Emerson Soares Veloso, Bárbara Andrade de Carvalho, Thais Salviana Ribeiro, Sara Aparecida Rocha, Vitor Henrique Soares Romão da Silva, Bhanca Lopes Teixeira, Helen Lima del Puerto, Enio Ferreira. **Ano:** 2020. **Evento:** VII Encontro de Patologia da UFMG/I Simpósio Online de Patologia.

- Publicação:** Anais do VII Encontro de Patologia da UFMG/I Simpósio Online de Patologia.
- *Expressão proteica de SOX3 e sua relação com a proliferação celular em melanomas caninos orais.* **Autores:** Renato Felipe da Costa, Bárbara Andrade de Carvalho, Emerson Soares Veloso, Bruna Mendes Lima, Karen Yumi Ribeiro Nakagaki, Helen Lima del Puerto, Enio Ferreira. **Ano:** 2020. **Evento:** VII Encontro de Patologia da UFMG/I Simpósio Online de Patologia. **Publicação:** Anais do VII Encontro de Patologia da UFMG/I Simpósio Online de Patologia.
 - *Expressão de Sox-2 em células da granulosa de pacientes submetidas à hiperestimulação ovariana controlada.* **Autores:** Santuza Silva Coelho, Camila Pereira Almeida, Camila Oliveira Silveira, Fernando Marcos Reis, Marcia Cristina Ferreira, Emerson Soares Veloso, Isabella da Terra Borges, Thais Salviana Ribeiro, Rafaela Malta Coutinho Chaves de Oliveira, Ana Carolina Damasceno Cavalcanti, Felipe Henrique Souza Silva, Enio Ferreira, Helen Lima del Puerto. **Ano:** 2020. **Evento:** VII Encontro de Patologia da UFMG/I Simpósio Online de Patologia. **Publicação:** Anais do VII Encontro de Patologia da UFMG/I Simpósio Online de Patologia.
 - *Pro caspase-3 and cleaved caspase-3 gene and protein expression in human granulosa cells correlate with cos duration, length of infertility and proportion of mature oocytes retrieved.* **Autores:** Camila Pereira Almeida, Camila Oliveira Silveira, Enio Ferreira, Marcia Cristina Ferreira, Gabriella Graças Oliveira, Emerson Soares. Veloso, Felipe Henrique Souza Silva, Santuza Silva Coelho, Leonardo M. Moraes, Fernando Marcos Reis, Helen Lima Del Puerto. **Ano:** 2019. **Evento:** 75th Scientific Congress & Expo da American Society for Reproductive Medicine (ASRM). **Publicação:** *Fertility and Sterility*.
 - *Cutaneous mast cell tumor in a bush dog (Speothos venaticus).* **Autores:** Daniel Oliveira dos Santos, Herlandes Penha Tinoco, Carlyle Mendes Coelho, Angela Tinoco Pessanha Gonçalves Ribeiro, Guilherme de Caro Martins, Emerson Soares Veloso, Enio Ferreira, Renato de Lima Santos. **Ano:** 2019. **Evento:** 5º Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária e XIX Encontro Nacional de Patologia Veterinária. **Publicação:** *Abstracts from the 5th Brazilian Congress of Veterinary Pathology*.
 - *Expression of metalloproteinase 9 and 14 and correlation with tumor aggressiveness in oral and cutaneous canine melanomas.* **Autores:** Bruna Mendes Lima, Bárbara Andrade de Carvalho, Emerson Soares Veloso, Renato Felipe da Costa, Déborah Soares Vieira, Helen Lima del Puerto, Geovanni Dantas Cassali, Enio Ferreira. **Ano:** 2019. **Evento:** 5º Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária e XIX Encontro Nacional de Patologia Veterinária. **Publicação:** *Abstracts from the 5th Brazilian Congress of Veterinary Pathology*.
 - *The presence of macrophages in relation to tumor angiogenesis in canine oral melanomas.* **Autores:** Renato Felipe da Costa, Tatiany Luiza Silveira, Emerson Soares Veloso, Ivy Nayra Nascimento Gonçalves, Geovanni Dantas Cassali, Enio Ferreira. **Ano:** 2019. **Evento:** 5º Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária e XIX Encontro Nacional de Patologia Veterinária. **Publicação:** *Abstracts from the 5th Brazilian Congress of Veterinary Pathology*.

- *Immunolocalization and expression of Her2, Her3, Her4, EGFR and P53 in a patient with synchronous primary endometrial adenocarcinoma and clear cell renal carcinoma: A case report.* **Autores:** Fabiano Conde Araújo, Enio Ferreira, Izabella Cristina Alves de Souza, Priscila Fernanda da Silva Martins, Emerson Soares Veloso, Tatiany Luiza Silveira, Ivy Nayra Nascimento Gonçalves, Adam Underwood, Amy Milsted, Helen Lima Del Puerto. **Ano:** 2018. **Evento:** *The Ohio Academy of Science 127th Annual Meeting, 2018.* **Publicação:** *The Ohio Journal of Science.*

2. APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS:

- *Inibição da transição epitélio-mesenquimal, por metformina, reduz a formação de metástases pulmonares em modelo murino de melanoma.* **Autores:** Emerson Soares Veloso, Bárbara Andrade de Carvalho, Felipe Henrique de Souza Silva, Thais Salviana Ribeiro, Bruna Mendes Lima, Camila Pereira Almeida, Vitor Henrique Soares Romão, Sara Aparecida Rocha, Marina Rios de Araujo Campos, Helen Lima Del Puerto, Enio Ferreira. **Ano:** 2022. **Evento:** VIII Encontro de Patologia da UFMG. **Apresentador:** Emerson Soares Veloso.
- *Tratamento com metformina, in vitro, reduz as formações metastáticas pulmonares de melanoma em modelo murino.* **Autores:** Emerson Soares Veloso; Marina Rios de Araújo Campos; Bárbara Andrade de Carvalho; Thais Salviana Ribeiro; Sara Aparecida Rocha; Helen Lima Del Puerto; Enio Ferreira. **Ano:** 2021. **Evento:** XX ENAPAVE. **Apresentador:** Emerson Soares Veloso.
- *Relação entre as proteínas envolvidas na apoptose, proliferação e invasão celular em melanomas orais caninos.* **Autores:** Emerson Soares Veloso, Bárbara Andrade de Carvalho, Bruna Mendes Lima, Renato Felipe da Costa, Geovanni Dantas Cassali, Helen Lima del Puerto, Enio Ferreira. **Evento:** XX ENAPAVE. **Ano:** 2021. **Apresentador:** Emerson Soares Veloso.
- *Expressão proteica de Sox2, Sox3 e Sox10 e sua relação com a proliferação celular em melanomas orais caninos.* **Autores:** Bárbara Andrade de Carvalho; Renato Felipe da Costa; Emerson Soares Veloso; Bruna Mendes Lima; Karen Yumi Ribeiro Nakagaki; Helen Lima Del Puerto; Enio Ferreira. **Ano:** 2021. **Evento:** XX ENAPAVE. **Apresentador:** Bárbara Andrade de Carvalho.
- *Estudo comparativo entre os aspectos histopatológicos em melanomas caninos orais e cutâneos.* **Autores:** Bárbara Andrade de Carvalho; Emerson Soares Veloso; Bruna Mendes Lima; Geovanni Dantas Cassali; Helen Lima Del Puerto; Enio Ferreira. **Ano:** 2021. **Evento:** XX ENAPAVE. **Apresentador:** Bárbara Andrade de Carvalho.
- *Expressão proteica de SOX3 e sua relação com a proliferação celular em melanomas caninos orais.* **Autores:** Renato Felipe da Costa, Bárbara Andrade de Carvalho, Emerson Soares Veloso, Bruna Mendes Lima, Karen Yumi Ribeiro Nakagaki, Helen Lima del Puerto, Enio Ferreira. **Ano:** 2020. **Evento:** VII Encontro de Patologia da UFMG/I Simpósio Online de Patologia. **Apresentador:** Renato Felipe da Costa.
- *Análise da transição epitélio-mesênquima e de receptores de fator de crescimento epidérmico em melanoma caninos.* **Autores:** Emerson Soares Veloso, Ivy Nayra Nascimento Gonçalves, Déborah Vieira Soares, Larissa Vieira Figueiredo, Geovanni

- Dantas Cassali, Helen Lima del Puerto, Enio Ferreira. **Ano:** 2019. **Evento:** X ONCOVET. **Apresentador:** Emerson Soares Veloso.
- *Expressão de metaloproteinases-9 e sua relação com quantificação de colágeno tipo I/III em melanomas caninos.* **Autores:** Bruna Mendes Lima, Bárbara Andrade de Carvalho, Emerson Soares Veloso, Déborah Vieira Soares, Geovanni Dantas Cassali, Helen Lima del Puerto, Enio Ferreira. **Ano:** 2019. **Evento:** X ONCOVET. **Apresentador:** Bruna Mendes Lima.
 - *Associação entre a expressão de metaloproteinases-9 e moléculas de adesão E-caderina e N-caderina em modelo de melanoma canino cutâneo.* **Autores:** Bruna Mendes Lima, Bárbara Andrade de Carvalho, Emerson Soares Veloso, Renato Felipe da Costa, Helen Lima del Puerto, Geovanni Dantas Cassali, Enio Ferreira. **Ano:** 2019. **Evento:** XVI Encontro Mineiro de Biomedicina. **Apresentador:** Bruna Mendes Lima.
 - *Cutaneous mast cell tumor in a bush dog (Speothos venaticus).* **Autores:** Daniel Oliveira dos Santos, Herlandes Penha Tinoco, Carlyle Mendes Coelho, Angela Tinoco Pessanha Gonçalves Ribeiro, Guilherme de Caro Martins, Emerson Soares Veloso, Enio Ferreira, Renato de Lima Santos. **Ano:** 2019. **Evento:** 5º Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária e XIX Encontro Nacional de Patologia Veterinária. **Apresentador:** Daniel Oliveira dos Santos
 - *Expression of metalloproteinase 9 and 14 and correlation with tumor aggressiveness in oral and cutaneous canine melanomas.* **Autores:** Bruna Mendes Lima, Bárbara Andrade de Carvalho, Emerson Soares Veloso, Renato Felipe da Costa, Déborah Soares Vieira, Helen Lima del Puerto, Geovanni Dantas Cassali, Enio Ferreira. **Ano:** 2019. **Evento:** 5º Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária e XIX Encontro Nacional de Patologia Veterinária. **Apresentador:** Enio Ferreira.
 - *The presence of macrophages in relation to tumor angiogenesis in canine oral melanomas.* **Autores:** Renato Felipe da Costa, Tatiany Luiza Silveira, Emerson Soares Veloso, Ivy Nayra Nascimento Gonçalves, Geovanni Dantas Cassali, Enio Ferreira. **Ano:** 2019. **Evento:** 5º Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária e XIX Encontro Nacional de Patologia Veterinária. **Apresentador:** Enio Ferreira.
 - *Zeb and Snail expression indicates epithelial-mesenchymal transition in canine melanoma.* **Autores:** Emerson Soares Veloso, Ivy Nayra Nascimento Gonçalves, Tatiany Luiza Silveira, Juliane Taynar do Espirito Santo, Larissa Vieira Figueiredo, Mary Suzan Varaschin, Geovanni Dantas Cassali, Helen Lima del Puerto, Enio Ferreira. **Ano:** 2018 **Evento:** VI Encontro de Patologia da UFMG. **Apresentador:** Emerson Soares Veloso.
 - *Relação entre os receptores de fator de crescimento epidérmico e características histológicas em melanomas caninos cutâneos.* **Autores:** Emerson Soares Veloso, Ivy Nayra Nascimento Gonçalves, Tatiany Luiza Silveira, Fernando Soares Oliveira, Déborah Soares Vieira, Geovanni Dantas Cassali, Helen Lima del Puerto, Enio Ferreira. **Ano:** 2018 **Evento:** VI Encontro de Patologia da UFMG. **Apresentador:** Emerson Soares Veloso.
 - *Expressão da família EGFR e p53 em paciente com dois tumores sincrônicos – adenocarcinoma endometrial e carcinoma renal de células claras: Relato de caso.*

- Autores:** Priscila Fernanda da Silva Martins, Izabella Cristina Alves Souza, Enio Ferreira, Emerson Soares Veloso, Tatiany Luiza Silveira, Ana Carolina Damasceno Cavalcanti, Santuza Silva Coelho, Fabiano Conde Araújo, Helen Lima del Puerto. **Ano:** 2018 **Evento:** VI Encontro de Patologia da UFMG. **Apresentador:** Priscila Fernanda da Silva Martins.
- *Expressão de COX-2 e linfócitos CD3 positivos no modelo murino de colonização pulmonar por células B16F10.* **Autores:** Larissa Vieira Figueiredo, Emerson Soares Veloso, Verlane Gonçalves Santos, Miriam Teresa Paz Lopes, Enio Ferreira. **Ano:** 2018. **Evento:** VI Encontro de Patologia da UFMG. **Apresentador:** Larissa Vieira Figueiredo.
 - *Apoptosis related genes and alpha inhibin expression in human granulosa cells.* **Autores:** Camila Pereira Almeida, Enio Ferreira, Camila Oliveira Silveira, Emerson Soares Veloso, Bárbara Andrade de Carvalho, Santuza Silva Coelho, Fernando Marcos Reis, Helen Lima del Puerto. **Ano:** 2018. **Evento:** VI Encontro de Patologia da UFMG. **Apresentador:** Camila Pereira Almeida.
 - *Expressão da Caspase-3 em melanomas caninos orais e cutâneos.* **Autores:** Bárbara Andrade de Carvalho, Emerson Soares Veloso, Bruna Mendes Lima, Felipe Henrique Souza Silva, Renato Felipe da Costa, Camila Pereira Almeida, Déborah Soares Vieira, Geovanni Dantas Cassali, Helen Lima del Puerto, Enio Ferreira. **Ano:** 2018. **Evento:** VI Encontro de Patologia da UFMG. **Apresentador:** Bárbara Andrade de Carvalho.
 - *Expressão de metaloproteinases-9 e sua relação com características histológicas em melanomas caninos.* **Autores:** Bruna Mendes Lima, Bárbara Andrade de Carvalho, Emerson Soares Veloso, Déborah Soares Vieira, Geovanni Dantas Cassali, Helen Lima del Puerto, Enio Ferreira. **Ano:** 2018. **Evento:** VI Encontro de Patologia da UFMG. **Apresentador:** Bruna Mendes Lima.
 - *Immunolocalization and expression of Her2, Her3, Her4, EGFR and P53 in a patient with synchronous primary endometrial adenocarcinoma and clear cell renal carcinoma: A case report.* **Autores:** Fabiano Conde Araujo, Enio Ferreira, Izabella Cristina Alves de Souza, Priscila Fernanda da Silva Martins, Emerson Soares Veloso, Tatiany Luiza Silveira, Ivy Nayra Nascimento Gonçalves, Adam Underwood, Amy Milsted, Helen L. Del Puerto. **Ano:** 2018. **Evento:** The Ohio Academy of Science 127th Annual Meeting, 2018. **Apresentador:** Fabiano Conde Araujo.
 - *Relação entre a expressão de Cox-2 com linfócitos CD3 positivos no modelo murino de colonização pulmonar por células B16F10.* **Autores:** Larissa Vieira Figueiredo, Emerson Soares Veloso, Verlane Gonçalves Santos, Miriam Teresa Paz Lopes, Enio Ferreira. **Ano:** 2018. **Evento:** XXVII Semana de Iniciação Científica da UFMG. **Apresentador:** Larissa Vieira Figueiredo.
 - *Relação entre proliferação celular e expressão de E-caderina e N-caderina em melanomas caninos.* **Autores:** Maria Luiza Barreto Cazumba, Emerson Soares Veloso, Ivy Nayra Nascimento Gonçalves, Tatiany Luiza Silveira, Geovanni Dantas Cassali, Enio Ferreira. **Ano:** 2018. **Evento:** XXVII Semana de Iniciação Científica da UFMG. **Apresentador:** Maria Luiza Barreto Cazumba.

- *Relação entre a expressão de N-caderina e ZEB2 no mecanismo de transição epitélio-mesênquima em melanomas caninos.* **Autores:** Déborah Soares Vieira, Emerson Soares Veloso, Tatiany Luiza Silveira, Ivy Nayra Nascimento Gonçalves, Geovanni Dantas Cassali, Enio Ferreira. **Ano:** 2018. **Evento:** XXVII Semana de Iniciação Científica da UFMG. **Apresentador:** Déborah Soares Vieira.
- *Padronização da separação e cellblock de células da granulosa humana (CGH) provenientes de pacientes submetidas à hiperestimulação ovariana controlada (HOC).* **Autores:** Pedro Giannoni Baeta, Camila Pereira Almeida, Emerson Soares Veloso, Ana Carolina Damasceno Cavalcanti, Thais Salviana Ribeiro, Isabella da Terra Borges, Enio Ferreira, Helen Lima del Puerto. **Ano:** 2018. **Evento:** XXVII Semana de Iniciação Científica da UFMG. **Apresentador:** Pedro Giannoni Baeta.
- *Thalidomide-induced CCL2 and M1-like macrophages inhibit lung metastasis in 4T1 murine breast cancer model.* **Autores:** Gabriela Rafaela Arantes Pegas, Diego Carlos dos Reis, Michele Angela Rodrigues, Ana Cândida Araújo e Silva, Emerson Soares Veloso, Grégorio Guilherme Almeida, Paula Peixoto Campos, Sílvia Ligório Fialho, Ricardo Gonçalves, Miriam Teresa Paz Lopes, Dawidson Assis Gomes, Remo de Castro Russo, Enio Ferreira. **Ano:** 2018. **Evento:** XXVII Semana de Iniciação Científica da UFMG. **Apresentador:** Gabriela Rafaela Arantes Pegas.

3. PRÊMIOS RECEBIDOS:

- **Prêmio:** Trabalho selecionado para apresentação oral e premiado em 1º Lugar. **Órgão premiado:** Programa de Pós-graduação em Patologia da UFMG. **Trabalho:** Inibição da transição epitélio-mesênquimal, por metformina, reduz a formação de metástases pulmonares em modelo murino de melanoma. **Autores:** Emerson Soares Veloso, Bárbara Andrade de Carvalho, Felipe Henrique de Souza Silva, Thais Salviana Ribeiro, Bruna Mendes Lima, Camila Pereira Almeida, Vitor Henrique Soares Romão, Sara Aparecida Rocha, Marina Rios de Araujo Campos, Helen Lima Del Puerto, Enio Ferreira. **Evento:** VIII Encontro de Patologia da UFMG. **Ano:** 2022. **Apresentador:** Emerson Soares Veloso.
- **Prêmio:** 1º Lugar na categoria “Pequenos Animais”. **Órgão premiado:** Associação Brasileira de Patologia Veterinária. **Trabalho:** Relação entre as proteínas envolvidas na apoptose, proliferação e invasão celular em melanomas orais caninos **Autores:** Emerson Soares Veloso, Bárbara Andrade de Carvalho, Bruna Mendes Lima, Renato Felipe da Costa, Geovanni Dantas Cassali, Helen Lima del Puerto, Enio Ferreira. **Evento:** XX ENAPAVE. **Ano:** 2021. **Apresentador:** Emerson Soares Veloso.
- **Prêmio:** Menção Honrosa. **Órgão premiado:** Universidade Federal do Triângulo Mineiro. **Trabalho:** Associação entre a expressão de metaloproteinase 9 e moléculas de adesão E-caderina e N-caderina em modelo de melanoma canino cutâneo. **Autores:** Bruna Mendes Lima, Bárbara Andrade de Carvalho, Emerson Soares Veloso, Renato Felipe da Costa, Helen Lima del Puerto, Geovanni Dantas Cassali, Enio Ferreira. **Evento:** XVI Encontro Mineiro de Biomedicina. **Ano:** 2019. **Apresentador:** Bruna Mendes Lima.

- **Prêmio:** 1º Lugar na categoria Pôster. **Órgão premiador:** Programa de Pós-graduação em Patologia da UFMG. **Trabalho:** *Zeb and Snail expression indicates epithelial-mesenchymal transition in canine melanoma.* **Autores:** Emerson Soares Veloso, Ivy Nayra Nascimento Gonçalves, Tatiany Luiza Silveira, Juliane Taynar do Espirito Santo, Larissa Vieira Figueiredo, Mary Suzan Varaschin, Geovanni Dantas Cassali, Helen Lima del Puerto, Enio Ferreira. **Evento:** VI Encontro de Patologia da UFMG. **Ano:** 2018. **Apresentador:** Emerson Soares Veloso.