

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ALINE RAQUELL LECK**

**Efeito de complexo natural altamente diluído sobre o ácido hialurônico e suas implicações em processo inflamatório associado ao melanoma**

**CURITIBA**

**2013**

**ALINE RAQUELL LECK**

**Efeito de complexo natural altamente diluído sobre o ácido hialurônico e suas implicações em processo inflamatório associado ao melanoma**

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Edvaldo da Silva Trindade  
Co-orientador: Ms Lucas Ferrari de Andrade

**CURITIBA  
2013**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por todas as maravilhas que me permite viver, por toda a luz que coloca em meu caminho. Por tudo, absolutamente tudo.

Aos meus pais, Antonio e Maria, que me ensinaram as coisas mais importantes de minha vida, os valores, as atitudes, o esforço, a batalha, o amor, a fé. Obrigada por todo o amor e por sempre apoiarem meus sonhos e acreditarem em mim.

Aos camundongos, pois sem eles esse trabalho não seria realizado.

Aos meus irmãos e familiares, agradeço muito por fazerem parte da minha vida. Obrigada Camila por compartilhar seu computador para digitação deste trabalho, amo vocês.

Ao Cesar, por toda paciência, carinho e apoio. Por estar sempre ao meu lado, me auxiliando na rotina diária, me acompanhando em experimentos aos fins de semana, instalando softwares, e ajudando sempre que preciso. Obrigada por ser tão especial e fazer toda a diferença em minha vida.

Ao meu orientador Professor Edvaldo, porque sempre te chamei e chamarei de professor, mesmo depois de vários trabalhos e anos, representando o respeito que sinto por você. Obrigada por me aceitar em seu laboratório de braços abertos, pela grande paciência em meus momentos de dúvidas sobre o curso, o estágio e a vida, por entender e apoiar minhas escolhas e por ser um exemplo de dedicação. Por todos os ensinamentos, auxílio em relatórios, apresentações e especialmente neste trabalho, pelas correções, pelas discussões, por me orientar, por tudo, muito obrigada.

A Caro, um agradecimento mais que especial por todo o auxílio, na organização dos experimentos, não falando o que deveria ser feito, mas sim estimulando a busca das informações necessárias para realizá-los. Você é uma grande catalizadora destes processos. Obrigada pelas correções, pelas conversas, por tirar tantas dúvidas, tantas delas fora de hora, por redes sociais ou mesmo doente. Muito obrigada por toda essa ajuda.

Ao Lucas, por co-orientar este trabalho, mas muito mais que isso, por me ensinar muito do que sei em um laboratório, pelos 3 anos de trabalho juntos, por sempre ter sido tão bacana e compreensivo comigo, aguardando a semana de provas, escutando minhas dúvidas, explicando experimentos, ensinando desde lavar a vidraria e pesar sólidos no primeiro dia de estágio, como também a técnica de citometria que é a base de grande parte dos experimentos deste trabalho. Pelas conversas, pelo incentivo a continuar na pesquisa, pelo exemplo de dedicação e de como um pesquisador deve fazer pesquisa. Muito obrigada.

Aos amigos do laboratório, obrigada de todo o coração pela ajuda nos experimentos, ao Cleber, dominando toda a histologia e me ajudando a compreender os tumores, ao Gustavo que assim que voltou de Portugal foi recrutado, dando grande auxílio nas análises dos experimentos e também em dúvidas na execução dos mesmos. A Fran, que sempre dispôs de células mesmo em prazos curtos e esteve sempre disposta a ajudar. A Jenifer, pelas conversas sobre as imagens e grande ajuda com as células, e a todos os outros que em algum momento auxiliaram em algum tratamento, material, preparo de solução, limpeza de lamínulas, instalação de plugins no image J. Enfim, a todos! Obrigada mesmo, sem vocês esse trabalho não teria terminado assim. E claro, por todo o convívio do lab, vocês estarão sempre em meu coração.

Aos amigos, muito obrigada pelo apoio e incentivo, vocês sempre me impulsionaram a acreditar em meus objetivos e não desistir. Muito obrigada também pela paciência com minha ausência durante este período.

Aos grandes amigos de faculdade, sem vocês as disciplinas não seriam as mesmas! A todos, vocês são muito importantes. A Mariana, inesquecível coleção de insetos, trabalhos em parceria, grande ajuda na conquista de um sonho recente, e por me pressionar sempre, fazendo que eu escrevesse mais e mais. A Fran por sempre estar ali, ajudando com seus resumos para as avaliações, nos trabalhos em equipe e no que fosse possível. Ao Quito e Najara mostrando os modelinhos da monografia e sendo sempre especiais. A Mariana Toledo, amiga que sempre me ajudou em tudo que fosse preciso, presente em

trabalhos, festas, conversas, bagunças... sua amizade é linda! Obrigada por ter toda boa vontade ao ler este trabalho e ajudar na revisão das normas. A Ila, por todas as conversas maravilhosa e por ser esta amiga tão querida e finalmente ao meu primeiro grande amigo do curso, Gonzalo, você tornou esses 5 anos de curso mil vezes melhor, divertido e parceiro, sendo a companhia que eu sempre adorei ter ao meu lado! Obrigada por toda a ajuda e amizade durante a graduação.

“Dê-me um ponto de apoio  
e moverei o mundo”.

Arquimedes.

## RESUMO

O melanoma é a forma mais agressiva de câncer de pele e devido ao seu alto potencial metastático apresenta o pior prognóstico dentre as neoplasias cutâneas malignas. A incidência de melanoma vem aumentando e a busca por terapias complementares, para serem utilizadas em conjunto com as terapias convencionais, é cada vez mais recorrentes, visando uma melhor eficácia e minimização dos danos causados por estes tratamentos. A homeopatia encontra-se entre as terapias complementares mais utilizadas no combate ao câncer.

Há mais de 10 anos o grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dorly Buchi investiga complexos naturais altamente diluídos que possam ser utilizados juntamente aos tratamentos convencionais. Dentre eles, dados prévios indicam que o M1 tem grande potencial antimelanoma. Assim, o presente trabalho objetiva contribuir para o entendimento do mecanismo de atuação do complexo natural altamente diluído M1, voltando-se para os processos inflamatórios essenciais para a proliferação celular das células tumorais. Como segundo objetivo, buscou-se compreender se o M1 poderia também atuar sobre o tumor subcutâneo pré-estabelecido.

Assim, *in vitro* foi avaliado se as células B16F10 tratadas com M1 ou com seu veículo (controle) poderia alterar a expressão de citocinas, bem com de NFkB. Nestes ensaios, com as metodologias utilizadas, não foi possível concluir que M1 é capaz ou não de alterar a expressão destas moléculas. O passo seguinte foi avaliar se tanto no modelo de metástase pulmonar, quanto no tumor subcutâneo, a diminuição da quantidade e tamanho dos tumores poderia ser decorrente de menor processo inflamatório. Assim, utilizando cortes histológicos, COX-2, carboidratos neutros e ácido hialurônico foram investigados. Os resultados mostraram diferenças na quantidade e distribuição de COX-2 e de ácido hialurônico, moléculas importantes no processo inflamatório, mostrando que o tratamento com M1 leva a uma redução de inflamação associada ao tumor.

O segundo objetivo foi avaliar se M1 pode ter ação sobre tumor pré-existente. Assim, células B16F10 foram injetadas em camundongos C57BL/6 para formação de tumores subcutâneo. Aguardou-se o que o tumor fosse estabelecido para então iniciar o tratamento com o M1, realizando-se acompanhamento diário do volume tumoral. Neste modelo, o M1 atuou efetivamente na redução do crescimento tumoral, diminuindo a proliferação

celular e aumentando a apoptose. Não foi possível correlacionar este efeito com processo inflamatório, cuja pergunta continua em análise.

Estes resultados indicam que o M1 é um potencial tratamento para o melanoma, contribuindo para redução do desenvolvimento do tumor e este processo tem relação com a diminuição do processo inflamatório associado ao tumor.

Palavras Chaves: Câncer, Melanoma, B16F10, Homeopatia, Ácido Hialurônico, Inflamação.

## ABSTRACT

Melanoma is the most aggressive form of skin cancer and due to its metastatic potential presents the worst prognosis among cutaneous malignant neoplasms. The incidence of melanoma is increasing and the search for complementary therapies, to be used in conjunction with conventional therapies, is increasingly recurrent, looking for better effectiveness and minimize the damages caused by this treatments. Homeopathy is between the most used additional therapies to combat cancer.

For over 10 years the research group coordinated by Prof. Dorly Buchi investigates highly diluted natural complexes which can be used together with conventional treatments. Among them, previous data indicate that M1 has great potential antimelanoma. Thus, this study aims to contribute to understanding the mechanism of action of highly diluted natural complex M1, turning to the inflammatory processes essential for cell proliferation of tumor cells. As a second objective, we sought to understand whether the M1 could also act on the pre-established subcutaneous tumor.

Thus, *in vitro*, we assessed whether B16F10 cells treated with M1 or its vehicle (control) could alter the expression of cytokines, as well as NFκB. In these trials, with the methodologies used, it was not possible to conclude whether M1 is able or not to alter the expression of these molecules. The next step was to assess whether both the lung metastasis model, and subcutaneous tumor, the decrease of the number and size of tumors could be due to a lower inflammatory process. Thus, using histological cuts, COX-2, hyaluronic acid and neutral carbohydrates were investigated. The results showed differences in the amount and distribution of COX-2 and hyaluronic acid, important molecules in the inflammatory process, showing that treatment with M1 leads to a reduction of inflammation associated with cancer.

The second objective was to assess whether M1 can take action over a pre-existing tumor. Thus, B16F10 cells were injected into C57BL / 6 mice to form subcutaneous tumors. Waited for the tumor to be established to initiate treatment with M1, performing daily monitoring of tumor volume. In this model, M1 served effectively in reducing tumor growth, decreasing cell proliferation and

increasing apoptosis. It was not possible to correlate this with the inflammatory process, whose question remains under review.

These results indicate that M1 is a potential treatment for melanoma, contributing to reduction of tumor development, and this process is related to the decrease in the inflammatory process associated with tumor.

Key words: cancer, melanoma, B16F10, Homeopathy, Hyaluronic Acid, Inflammation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 01:</b> MICROEVOLUÇÃO DA CÉLULA CANCERÍGENA.	19
<b>FIGURA 02:</b> ETAPAS NO PROCESSO DE METÁSTASE.	21
<b>FIGURA 03:</b> O MELANOMA MALIGNO - FOTO ILUSTRATIVA DE UMA LESÃO DE MELANOMA MALIGNO NA PELE.	24
<b>FIGURA 04:</b> ESTIMATIVA DE MELANOMA E SUA TAXA DE MORTALIDADE NO MUNDO	24
<b>FIGURA 05:</b> OS SEIS NÍVEIS DE CLARK. ILUSTRAÇÃO DE SECÇÃO VERTICAL DA PELE.	27
<b>FIGURA 06:</b> EFEITO DO TRATAMENTO COM O COMPLEXO ALTAMENTE DILUÍDO M1 NA FORMAÇÃO DE NÓDULOS TUMORAIS DE COLONIZAÇÃO PULMONAR.	43
<b>FIGURA 07:</b> AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DE MASSA TUMORAL QUANDO O TUMOR SUBCUTÂNEO RECEBE TRATAMENTO COM O COMPLEXO ALTAMENTE DILUÍDO M1.	44
<b>FIGURA 08:</b> ORGANIZAÇÃO EXPERIMENTAL REALIZADA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.	46
<b>FIGURA 09:</b> TRATAMENTO COM M1 ATRAVÉS DE NEBULIZAÇÃO	52
<b>FIGURA 10:</b> AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO DE CITOCINAS PELAS CÉLULAS B16F10 TRATADAS OU NÃO COM M1	54
<b>FIGURA 11:</b> QUANTIFICAÇÃO DA MOLÉCULA NFkB PRESENTES NAS CÉLULAS B16F10 TRATADAS OU NÃO COM M1	55
<b>FIGURA 12 -</b> IMUNOMARCAÇÃO DE COX-2 PRESENTE EM TUMOR PULMONAR TRATADO OU NÃO COM M1	58
<b>FIGURA 13 -</b> IMUNOMARCAÇÃO DE COX-2 PRESENTE EM TUMOR SUBCUTÂNEO TRATADOS OU NÃO COM M1	59
<b>FIGURA 14.</b> QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO DE COX-2 ATRAVÉS DA CONTAGEM DA ÁREA DE PIXELS MARCADOS COM DAB EM LÂMINAS DE MELANOMA TRATADO OU NÃO COM M1.	60
<b>FIGURA 15 -</b> COLORAÇÃO PAS REALIZADA EM TUMOR PULMONAR TRATADOS OU NÃO COM M1	62

<b>FIGURA 16</b> - COLORAÇÃO PAS REALIZADA EM TUMOR PULMONAR TRATADOS OU NÃO COM M1	63
<b>FIGURA 17</b> - DETECÇÃO HISTOQUÍMICA DE ÁCIDO HIALURÔNICO EM TUMOR PULMONAR TRATADOS OU NÃO COM M1	65
<b>FIGURA 18</b> - DETECÇÃO HISTOQUÍMICA DE ÁCIDO HIALURÔNICO EM TUMOR SUBCUTÂNEO TRATADOS OU NÃO COM M1	66
<b>FIGURA 19</b> - QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO ATRAVÉS DA CONTAGEM DA ÁREA DE PIXELS MARCADOS COM DAB EM LÂMINAS DE TUMOR SUBCUTÂNEO TRATADOS OU NÃO COM M1	68
<b>FIGURA 20</b> - O TRATAMENTO COM M1 LEVA A UMA REDUÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL	70
<b>FIGURA 21</b> - O TRATAMENTO COM M1 REDUZIU PCNA E AUMENTOU p53	71
<b>FIGURA 22</b> - O TRATAMENTO COM M1 NÃO ALTERA A EXPRESSÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO	73

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 01</b> - DESCOBERTAS E EVENTOS IMPORTANTES NO CAMPO DA ONCOLOGIA E DA IMUNOBIOLOGIA TUMORAL	22
<b>TABELA 02</b> - USO DA CAM ENTRE OS ADULTOS NORTE-AMERICANOS DURANTE O ANO E A DISTRIBUIÇÃO DAS TERAPIAS	37
<b>TABELA 03</b> - COMPOSIÇÃO E DILUIÇÃO FINAL DE CADA COMPONENTE DO COMPOSTO NATURAL ALTAMENTE DILUÍDO UTILIZADO	47

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
2.1	CÉLULAS TUMORAIS E SUA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	18
2.2	HISTÓRICO.....	21
2.3	CÂNCER DE PELE.....	23
2.4	INFLAMAÇÃO.....	28
2.5	CARBOIDRATOS E SUA RELAÇÃO COM O CÂNCER.....	32
2.6	ÁCIDO HIALURIÔNICO E MATRIZ EXTRACELULAR NO TUMOR E INFLAMAÇÃO.....	34
2.7	MEDICINA ALTERNATIVA E COMPLEMENTAR (CAM) .....	36
2.8	HOMEOPATIA.....	38
2.9	COMPLEXOS NATURAIS ALTAMENTE DILUÍDOS.....	41
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
4.1	OBJETIVOS GERAIS.....	45
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
5.1	COMPLEXO NATURAL ALTAMENTE DILUÍDO.....	46
5.2	CÉLULAS.....	47
5.3	ANÁLISE POR CITOMETRIAS DE FLUXO DE CÉLULAS B16F10 TRATADAS <i>IN VITRO</i> .....	48

5.4	AVALIAÇÃO DE NFκB.....	48
5.5	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS SECRETADAS PELA B16F10...	49
5.6	IMUNOHISTOQUÍMICA.....	49
5.7	ANIMAIS E TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> .....	51
5.8	MODELO DE CRESCIMENTO TUMORAL <i>IN VIVO</i> .....	51
5.9	DISSOCIAÇÃO E PREPARO DO TUMOR PARA CITOMETRIA DE FLUXO.....	52
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
6.1	QUANTIFICAÇÃO DE NFκB.....	55
6.2	AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES EM MARCADORES INFLAMATÓRIOS.....	56
6.3	COX-2.....	56
6.4	AVALIAÇÃO DE CARBOIDRATOS NEUTROS.....	61
6.5	ÁCIDO HIALURÔNICO.....	64
6.6	AÇÃO DO M1 SOBRE O MELANOMA ESTABELECIDO.....	68
6.7	AVALIAÇÃO DE MOLÉCULAS RELACIONADAS AO CRESCIMENTO TUMORAL E A INFLAMAÇÃO EM CÉLULAS OBTIDAS DA DISSOCIAÇÃO TUMORAL.....	71
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>76</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é responsável por cerca de 13% das causas de mortes no mundo inteiro. Dentre as diversas neoplasias, o câncer de pele do tipo melanoma apresenta alto poder metastático, sendo o de maior gravidade entre as neoplasias da pele e quase sempre incurável. Por estas razões, o interesse em novas formas de tratamento para este tipo de câncer tem aumentado na pesquisa.

Vale lembrar que num processo tumoral ocorre inflamação associada ao tumor. Neste ambiente, diferentes células comunicam-se umas com as outras por meio de contato direto ou produção de citocinas e quimiocinas, agindo de maneiras autócrina e/ou parácrina para controlar o crescimento do tumor e moldá-lo. Vale ressaltar que a expressão de vários mediadores imunitários e moduladores, assim como o estado de ativação e abundância de diferentes tipos de células no microambiente tumoral, ditam em qual direção o equilíbrio é desviado, promovendo o crescimento do tumor ou uma imunidade anti-tumoral (GRIVENNIKOV, GRETEN e KARIN, 2010). Ainda, a inflamação associada ao tumor gera neo-angiogênese, que proporciona as células cancerosas fatores de crescimento adicionais, produzidos por células inflamatórias e imunitárias recentemente recrutadas (KARIN, 2006).

Compostos naturais altamente diluídos estão emergindo como novas formas de terapias para o câncer e outras doenças correlacionadas ao sistema imunológico. Dados prévios do nosso grupo de pesquisa mostram que o tratamento com um desses compostos altamente diluídos, codificado como M1, reduziu o crescimento do melanoma em camundongos, tanto no modelo de metástase experimental (GUIMARÃES, 2009), onde ocorreu redução significativa no número de nódulos formados no pulmão destes animais, como no modelo subcutâneo, onde o volume da massa tumoral foi reduzida, (ANDRADE, 2011).

Por outro lado, os processos inflamatórios causados por células imunológicas são essenciais e têm grande destaque no microambiente tumoral, visto que auxiliam na proliferação tumoral, bem como em metástases. Assim, no presente trabalho foi investigado se o tratamento com M1 pode levar à uma

redução da inflamação relacionada ao tumor. De fato, foi verificado que há diminuição do processo inflamatório, com destaque molecular para alterações detectadas na distribuição e quantidade de ácido hialurônico, um glicosaminoglicano não sulfatado, encontrado principalmente na matriz extracelular e que tem ação direta na proliferação tumoral, sendo assim, considerado um importante alvo em nossas pesquisas.

Ainda, outra questão intrigante para o entendimento da ação de M1 é entender se este complexo é capaz de reduzir o crescimento de tumor pré-existente, simulando o início de um tratamento convencional ao paciente portador de melanoma, uma vez que só é iniciado após ter sido devidamente detectado. Os resultados mostraram que também nesta condição o M1 mostrou ser um potente agente anti-melanoma.

Portanto, através da investigação desenvolvida e exposta neste trabalho, buscou-se compreender melhor a ação do complexo natural altamente diluído M1, como um possível modulador de moléculas relacionadas aos processos inflamatórios e também sua atuação ao utilizá-lo como tratamento em tumores já estabelecidos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CÉLULAS TUMORAIS E SUA PROLIFERAÇÃO CELULAR

As células dentro de um organismo apresentam um potencial proliferativo intrínseco que é necessário para satisfazer os requisitos de crescimento e desenvolvimento normais (ANDREEFF, GOODRICH e PARDEE, 2000).

As células tumorais tem origem tecidual. Conforme crescem e se dividem divergem cada vez mais de sua normalidade, não respondendo a muitos dos sinais que controlam seu crescimento celular e morte. Ao longo do tempo estas células se tornam mais resistentes aos mecanismos de controle, tornando-se menos dependentes dos sinais de outras células e dividindo-se mais rapidamente que seus progenitores. Através das múltiplas anormalidades, estas células conseguem “driblar” a morte celular programada, até que finalmente conseguem romper os limites teciduais e disseminar-se para novos locais do organismo (SCITABLE, 2013).

Para que haja crescimento normal das células é preciso equilíbrio entre a atividade de diversos genes. É de grande importância o bom funcionamento de genes que sinalizam danos celulares e direcionam a célula a entrar em apoptose, bem como dos que controlam o processo de divisão celular, tanto promovendo a proliferação, quanto realizando sua supressão. As células tumorais apresentam mutações em vários genes que controlam a proliferação celular. Certamente cada tipo de tumor tem sua assinatura específica. Uma comparação científica de múltiplos tipos de tumores revelou que certos genes são frequentemente mutados nestas células, como exemplo, os genes de promoção de crescimento. Outras mutações relacionadas inativam os genes que suprimem a proliferação de células ou aqueles que sinalizam a necessidade para a apoptose. Outro exemplo é observado em muitas células tumorais, as quais carregam duas cópias mutantes do gene que codifica a p53, uma proteína multifuncional que detecta danos no DNA e atua como um fator de transcrição de genes de controle do ciclo celular (SCITABLE, 2013).

O câncer tem origem de neoplasias, estas são decorrentes da proliferação anormal dos tecidos, as quais podem ser benignas ou malignas. As neoplasias benignas ou tumores benignos têm seu crescimento de maneira organizada, formado por células bem diferenciadas e com estrutura típica do tecido de origem. Esta neoplasia geralmente apresenta crescimento lento e progressivo, com mitoses normais e limites bem nítidos, não invadindo tecidos adjacentes. As neoplasias malignas ou tumores malignos são formados por células anaplásicas, atípicas, as vezes não apresentando diferenciação. O crescimento se dá rapidamente, com mitoses anormais e numerosas, manifestando um maior grau de autonomia. Esta neoplasia é pouco delimitada e capaz de invadir tecidos vizinhos, podendo provocar metástase (INCA, 2012 a). Durante as fases iniciais do câncer, tumores benignos ficam confinados dentro dos limites normais de um tecido e à medida que crescem e se tornam malignos, adquirem a capacidade de romper esses limites e invadir tecidos adjacentes (SCITABLE, 2013).

Diversos cientistas entendem a progressão do câncer como um processo microevolutivo, onde mutações provocam a proliferação acentuada. O conjunto de células que se divide, cresce ao longo do tempo e novas mutações ocorrem, pode transformar-se inicialmente em uma hiperplasia atípica. Sequencialmente, ocorre a perda de adesão celular e propagação de células tumorais para outros tecidos e órgãos (metástase), como ilustrado na Figura 1 (SCITABLE, 2013).

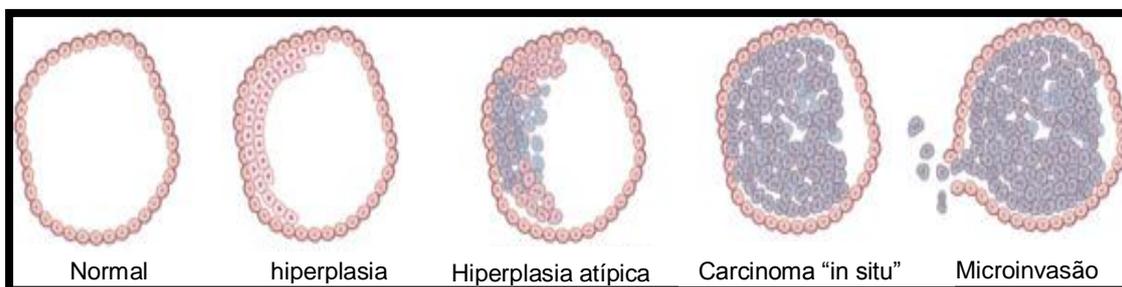


FIGURA 1 – MICROEVOLUÇÃO DA CÉLULA TUMORAIS. Diversas mutações que ocorrem nas células tumorais provocam proliferação acentuada. Novas mutações são adquiridas ao longo do tempo, ocorrendo hiperplasia atípica, gerando um tumor (carcinoma, no caso da origem ser epitelial). Finalmente, quando o tumor torna-se maligno as células tumorais invadem outros tecidos e órgãos, processo conhecido como metástase, gerando um câncer.  
 FONTE:ADAPTADA DE SCITABLE, 2013.

Ainda, para que as células tumorais possam invadir novos ambientes é preciso que estas degradem a matriz extracelular no limite de um tecido. Para tanto, são secretadas proteases, o que permite a formação de novas passagens nos tecidos, rompendo junções celulares e permitindo a realização de metástase. Neste estágio as células entram na corrente sanguínea ou no sistema linfático e viajam para novos locais do corpo, onde iniciam a formação de tumores secundários, estabelecendo um câncer invasivo (SCITABLE, 2013).

A palavra câncer é de origem grega da palavra “karkínos”, que quer dizer caranguejo e foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates (460 a 377 a.C.), o pai da medicina, ao comparar um tumor e os vasos sanguíneos a seu redor a um caranguejo com as patas espalhadas na areia (INCA, 2012 b). Diversos estudiosos especulam ainda mais o significado da palavra câncer, porém não há um consenso entre eles: alguns autores afirmam que o nome deve-se à semelhança das patas do animal com as veias intumescidas em torno do tumor; outros afirmam que esse nome deve-se à dor da doença que é parecida com a dor da picada do animal, ou até mesmo atribuem o nome ao fato da doença metastática evoluir de modo semelhante aos movimentos imprevisíveis do caranguejo (KOWALSKI e SOUSA, 2002).

Atualmente, de acordo com a Organização Mundial de Saúde – OMS, câncer é o nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos. Tendo como sinônimo tumor maligno, este se difere do benigno por ter a capacidade de crescer para além dos seus limites usuais, invadir partes adjacentes do corpo, adentrar aos vasos sanguíneos (intravasamento), ser transportado pela circulação, realizar extravasamento e de se espalhar para outros órgãos diferentes do original, processo conhecido como metástases (Figura 2), que é a principal causa de morte por câncer (WHO, 2013).

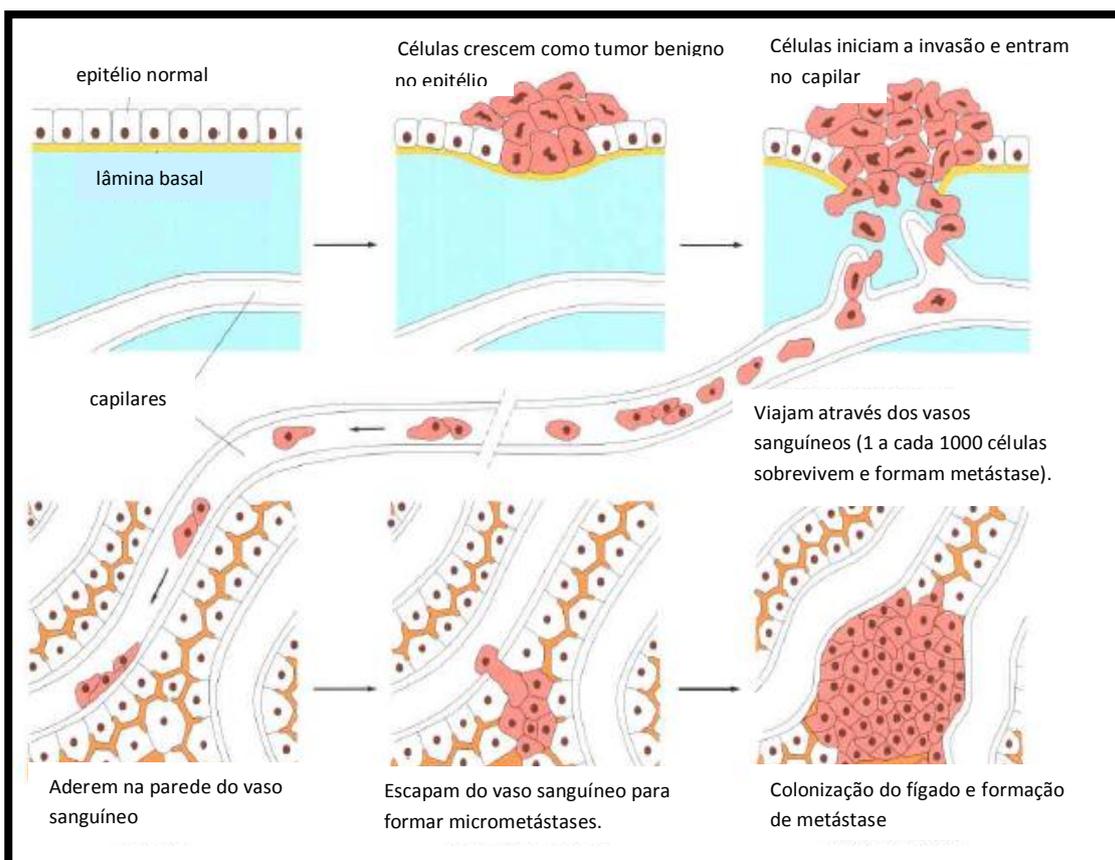


FIGURA 2. ETAPAS NO PROCESSO DE METÁSTASE. O tumor desloca-se de um órgão, atingindo a corrente sanguínea e atravessando a parede de um vaso sanguíneo ou linfático. As células tumorais que entraram no vaso linfático muitas vezes ficam presas em linfonodos, dando origem a metástases de linfonodos. Segundo estudos, uma em cada mil células de tumor maligno que entra na corrente sanguínea irá colonizar um novo tecido de modo a produzir um tumor detectável em um novo local.

FONTE: FIGURA ADAPTADA DE ALBERTS ET AL, 2008 - THE CELL 5ª EDIÇÃO. FIGURA 20 – 17. PÁGINA 1221.

A OMS estimou para o ano de 2030, 27 milhões de novos casos, 17 milhões de mortes por câncer e que 75 milhões de pessoas viverão, anualmente, com câncer. Assim, o câncer é uma das principais causas de morte no mundo e é considerado um problema de saúde pública mundial (IARC, 2008).

## 2.2 HISTÓRICO

Diversos avanços foram importantes para que hoje possamos compreender e continuar na busca dos fatores, características e modificações que ocorrem em células cancerígenas. Virchow em 1863 conseguiu deduzir a

origem celular do câncer e Stephen Paget em 1889 hipotetizou a teoria semente e solo férteis sobre o formação de metástases, na qual as células metastáticas (*seed*-sementes) poderiam crescer em qualquer tecido (*soil*-solo) desde que este fosse propício para tal. Além destes, Theodor Boveri em 1914 propôs que o câncer seria resultado de mutações que ocorreram em cromossomos (MEDRANO, 2013, p.2). Estas e outras descobertas importantes estão sumarizadas na Tabela 1.

TABELA 1. DESCOBERTAS E EVENTOS IMPORTANTES NO CAMPO DA ONCOLOGIA E DA IMUNOBIOLOGIA TUMORAL

Ano	Descoberta ou Evento
1863	Origem celular do Câncer (Virshow) Descrição de infiltrado imune em tumores (Virshow)
1889	Hipótese do <i>seed and soil</i> (Paget)
1898	Tratamento de tumores com produtos bacterianos (Coley)
1914	Mutações cromossômicas e Câncer (Boveri)
1937	Fundação do <i>National Cancer Institute</i>
1944	Transmissão da informação celular pelo DNA (Avery)
1950	Avaliação de drogas antitumorais pelo <i>Cancer Chemotherapy National Service Center</i>
1953	Descoberta da estrutura do DNA
1957	Teoria da imuno vigilância (Burnet)
1970	Transcriptase reversa
1971	Enzimas de restrição
1973	Descoberta das células dendríticas (Steinman)
1975	Hibridomas e anticorpos monoclonais
1976	Origem celular dos oncogenes retrovirais
1981	Supressão tumoral pela p53
1983	Primeiro estudo com Interleucina-2
1984	Proteínas G e Sinalização celular
1985	Primeiro estudo com Interferon-alpha em melanoma Primeiro estudo com transferência adotiva de células em câncer
1990	Primeira diminuição na incidência de câncer e sua mortalidade
1994	Associação entre o gene BRCA1 e câncer de mama
2000	Sequenciamento do genoma humano
2002	Influência da epigenética e de microRNAs no Câncer
2005	Primeira redução no número total de mortes por Câncer
2006	Interações entre o tumor e o estroma (microambiente tumoral)
2009	Vacinação de HPV (VIN)
2010	Aprovação do FDA de Sipuleucel-T® para uso em câncer de próstata
2011	Aprovação do FDA de Ipilumimab® para utilização em melanoma metastático

FONTE: MEDRANO (2013).

O atual conceito da biologia tumoral compreende as interações entre as células tumorais e estromais, formando assim o microambiente tumoral. A biologia dos tumores já não pode ser entendida apenas enumerando as características, devem-se englobar as contribuições do microambiente do tumor para a sua tumorigênese (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Os tumores são tecidos complexos compostos por diversos tipos celulares, que juntos interagem heterotipicamente uns com os outros. Neste ambiente, as células recrutadas têm funções importantes no desenvolvimento e na progressão tumoral. As principais características desse microambiente tumoral são: 1. desregulação de vias energéticas; 2. sinais de proliferação autossustentados; 3. evasão de sinais supressores de crescimento celular; 4. replicação ilimitada; 5. promoção de inflamação; 6. invasão e metástases; 7. indução da angiogênese; 8. instabilidade genômica e desenvolvimento de mutações; 9. resistência à morte celular e 10. evasão dos mecanismos imunes antitumorais (MEDRANO, 2013, p.3). Através destas características ocorre seleção positiva para as células tumorais, beneficiando a transformação das células para o câncer (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Desta forma, o estudo do microambiente tumoral é essencial para a compreensão desse tecido complexo, possibilitando desenvolvimento de imunoterapias e estratégias associativas que atuem de maneira promissora nos tratamentos contra o câncer (MEDRANO, 2013, p. 3).

### 2.3 CÂNCER DE PELE

Diversas neoplasias, de diferentes tipos celulares, são identificadas como câncer de pele. As mais frequentes são: a) carcinoma basocelular, responsável por 70% dos diagnósticos de câncer da pele; b) carcinoma epidermoide, com 25% dos casos e c) melanoma, detectado em aproximadamente 4% dos pacientes (INCA, 2011).

O câncer de pele de uma forma geral é o tipo de tumor maligno mais frequente entre os registrados no Brasil, sendo equivalente a aproximadamente 25% dos casos, porém, quando detectado precocemente apresenta alto percentual de cura. O carcinoma menos agressivo, porém mais frequente é o basocelular, ele e o carcinoma epidermoide podem também ser chamados de câncer da pele não melanoma. O câncer de pele que se origina de melanócitos é definido como câncer de pele melanoma, este representa apenas 4% dos cânceres de pele, porém é o mais grave devido a sua alta capacidade de metástase (FIGURA 3) (INCA, 2011).



FIGURA 3: O MELANOMA MALIGNO. Foto ilustrativa de uma lesão de melanoma maligno na pele.

FONTE: WORLD HEALTH ORGANIZATION (2011).

O melanoma é a neoplasia cutânea maligna de pior prognóstico, devido ao grande potencial de desenvolvimento de metástases e, conseqüentemente, levando a óbito. A incidência desse tipo de câncer de pele vem aumentando, principalmente na população branca residente em áreas do planeta com maior exposição aos raios ultravioleta (MORENO *et al.*, 2012).

A Figura 4 ilustra as taxas de melanoma nos diferentes países do mundo e o número de óbitos observados no ano de 2008.

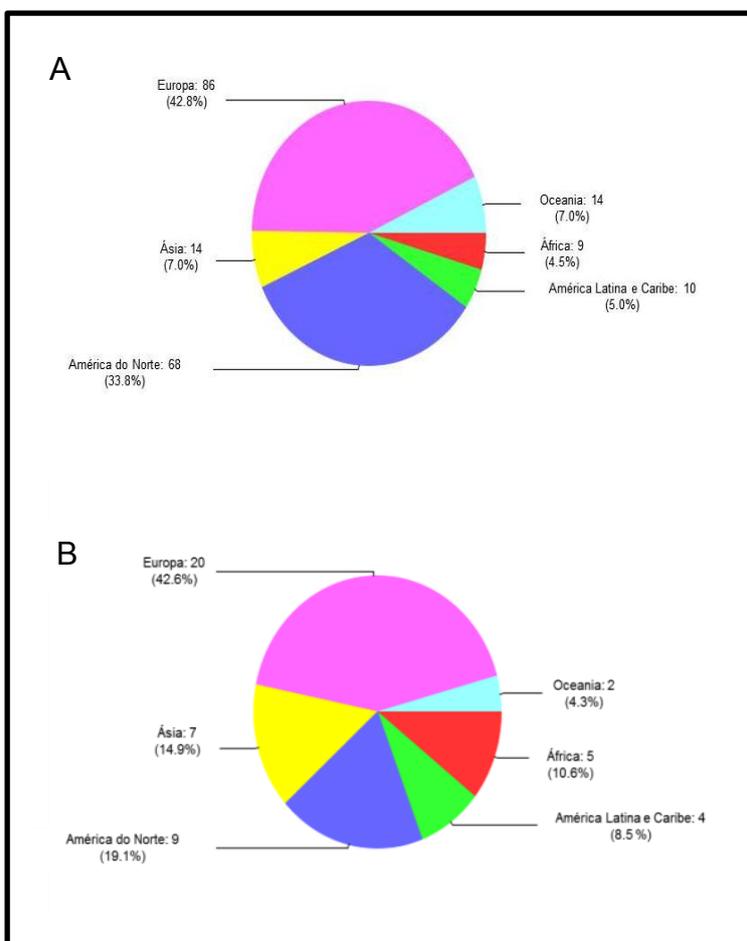


FIGURA 4. ESTIMATIVA DE MELANOMA E SUA TAXA DE MORTALIDADE NO MUNDO. A Figura acima ilustra a incidência de melanoma no mundo, em ambos os sexos e em todas as faixa etárias. A. Estimativa do número de casos de câncer. B. Estimativa do número de óbitos por casos de câncer.

FONTE: GLOBOCAN, 2008.

Como discutido anteriormente, a origem do melanoma são os melanócitos. Estes são de origem neuroectodérmico, tendo em vista que estas células migram da crista neural para toda a epiderme durante a embriogênese. Em consequência desse fato, quando as células perdem as diferenciações, o tumor gerado apresenta grande capacidade de metastatização, mesmo em fases iniciais, visto que as características de invadir e disseminar poderiam ser consideradas uma prerrogativa inata deste tipo celular não diferenciado. Na maioria das vezes, o melanoma se origina na pele, embora possa surgir a partir de mucosas ou em outros locais para os quais migram as células da crista neural (WAINSTEIN E BELFORT, 2004).

Segundo Zaidi *et al.*, (2008), o melanoma se desenvolve de maneira gradual, inicialmente como um nevo benigno, constituído por uma população clonal de melanócitos com alta taxa proliferativa, mas que não evolui devido à senescência celular. Porém, com as constantes taxas de mutações que ocorrem se a senescência é superada, pode ocorrer crescimento radial através da progressão na epiderme, ainda com baixo potencial invasivo, fase conhecida como RGP (crescimento Radial). Infelizmente, quando as células são capazes de atingir a derme (fase VGP) e realizar metástase (fase metastática), o prognóstico do paciente é ruim.

O principal agente de etiologia ambiental para o desenvolvimento de melanoma é o espectro de UV da radiação solar, que apresenta mecanismos pelos quais inicia mutações no melanócitos. Por ser altamente letal, o melanoma cutâneo é o mais grave dos cânceres de pele relacionados à exposição a radiação UV. Apesar dos grandes avanços no seu tratamento, ele ainda é responsável por um número considerável de óbitos (SOUZA *et al.*, 2004; WHO, 2013).

Além da UV, há também a ocorrência de melanoma gerado por mutações espontâneas do DNA, as quais foram observadas em vários genes e, é proposto que estejam envolvidas com diferentes fases da progressão da doença. Estudos recentes também forneceram evidência de alteração da expressão através de modulações epigenéticas (como, metilação do DNA e/ou modificação de histonas). Acredita-se que os eventos epigenéticos desempenham um papel importante na interação gene-ambiente, associados com a iniciação e progressão de melanoma (ZAIDI *et al.*, 2008).

Para o melanoma são apontados como fatores de risco, além da radiação ultravioleta, o formaldeído, a cerca de 37% em massa (formol ou formalina), o clorofluorcarbono (gás CFC que prejudica a proteção contra radiação), os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA - substâncias que resultam da combustão de uma variedade de produtos como coque, diesel e cigarros, estando presente na poluição do ar) e os agrotóxicos (herbicida paraquat ou gramoxone, arseniato de chumbo e organoclorados) (BAKER; WILKINSON, 1990; DICH *et al.*, 1997; SCHREINEMACHERS, 2000).

A primeira descrição que se refere ao melanoma surgiu durante o período 460 a 375 a.C. nas escrituras de Hipócrates e, o termo “melanoma”, foi empregado originalmente em 1838 por Robert Carswell, que o utilizou para descrever lesões malignas pigmentadas da pele. Nas décadas de 50 e 60 vários pesquisadores como Allen, Spitz, Petersen e Bodenhan já tentavam identificar os fatores prognósticos relacionados ao melanoma, e em 1969 Clark e colaboradores aprimoraram o sistema de micro estadiamento utilizando como critério os níveis de invasão na pele (WAINSTEIN e BELFORT, 2004).

Em 1984 Clark e colaboradores dividiram o desenvolvimento do melanoma em seis etapas: 1. Surgimento de manchas melanocíticas; 2. Hiperplasia melanocítica com diferenciação “aberrante”; 3. Displasia das manchas melanocíticas, com núcleo atípico; 4. Crescimento radial do melanoma primário; 5. Crescimento vertical do melanoma primário; 6. Melanoma metastático (ANDRADE, 2011).

É possível identificar duas fases distintas no crescimento tumoral: a. Crescimento horizontal, na qual a lesão ainda é plana, pequena e não adquire profundidade, apresentando comportamento benigno, b. Crescimento vertical, onde estão presentes células malignas localizadas na derme reticular e até mesmo invadindo o subcutâneo. (WAINSTEIN e BELFORT, 2004).

O carcinoma melanocítico tem como fase final o melanoma, onde a capacidade proliferativa e de invasão de suas células é potente, graças a grande instabilidade genética (SOUZA *et al.*, 2004). As fases são ilustradas na Figura 5.

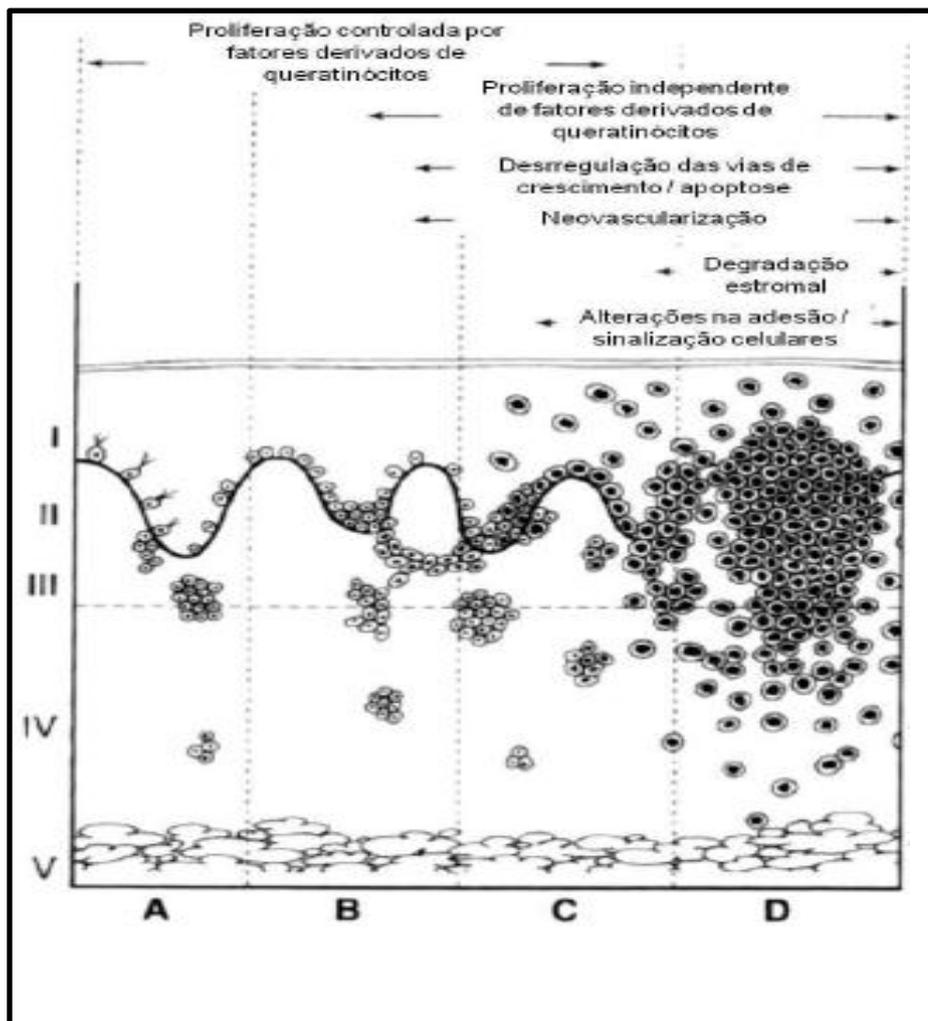


Figura 5 – OS SEIS NÍVEIS DE CLARK. Ilustração de secção vertical da pele, incluindo i. Epiderme, ii – iv. Derme e v. Tecido subcutâneo. A.: melanócitos normais distribuídos individualmente ou em pequenos aglomerados na junção epiderme – dermal. B: proliferação atípica dos melanócitos. C: melanoma em crescimento radial. D: melanoma em crescimento vertical.

FONTE: ADAPTADO HOUGHTON *ET AL*, (2002).

O melanoma maligno representa um desafio clínico substancial, o diagnóstico e métodos prognósticos para a detecção precoce da doença, que se baseiam fundamentalmente na morfologia tecidual microscópica e na profundidade da lesão, medida em milímetros, ficam aquém de fornecer uma avaliação precisa e individualizada do risco de progressão da doença (SEKULIC *et al.*, 2009).

No Brasil, o melanoma corresponde a 0,15% de todas as neoplasias registradas, apresentando crescente diagnóstico histológico. A possibilidade de cura dessa neoplasia está diretamente relacionada com o diagnóstico precoce

e o tratamento ao início do seu desenvolvimento (FIGUEIREDO *et al.*, 2003, INCA, 2013).

## 2.4 INFLAMAÇÃO

A inflamação é a primeira resposta do organismo à infecção, irritação ou outras lesões, ela é considerada uma resposta imunológica não específica e tem como objetivo neutralizar agentes agressores e reparar tecidos danificados. As cinco características clássicas da inflamação são: rubor, calor, inchaço, dor e perda de função. Estas características se devem ao aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade capilar perto da zona lesionada, permitindo assim, que leucócitos e moléculas do sistema imunitário migrem da corrente sanguínea, atravessem a parede endotelial e cheguem aos tecidos afetados (GOMES *et al.*, 2008).

As células responsáveis pelo processo inflamatório são os leucócitos, esses podem ser distribuídos em 2 grupos: células mononucleares e granulócitos. As mononucleadas contém: linfócitos, monócitos, macrófagos e células dendríticas. Já os granulócitos são: neutrófilos, basófilos e eosinófilos (KUBY, 2003). Os monócitos patrulham continuamente em busca de sinais de infecção bacteriana ou inflamação. As substâncias liberadas pelos agentes invasores, como endotoxina (lipopolissacarídeo - LPS), ou a existência de lesão tecidual, como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), aumentam a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, dando início ao extravasamento de leucócitos para a área inflamada (PEREIRA, 2009).

A presença de leucócitos dentro de tumores foi a primeira indicação de uma possível ligação entre a inflamação e o câncer. Contudo, foi somente durante a última década que foram obtidas evidências claras de que a inflamação desempenha um papel fundamental na tumorigênese, e alguns dos mecanismos moleculares subjacentes foram elucidadas (KARIN, 2006). O papel da inflamação na tumorigênese é agora aceito e tornou-se evidente que o microambiente inflamatório é um componente essencial para todos os tumores (MANTOVANI *et al.*, 2008).

Observações na década de 1990 permitiram compreender que o sistema imune pode influenciar na qualidade (imunogenicidade) dos tumores,

ou seja, aparentemente as células tumorais imunogênicas são combatidas pelo sistema imune e eliminadas. Porém durante a tumorigênese essa imunogenicidade é perdida e o tumor pode agora fugir do controle imunológico e progredir mesmo na presença desse sistema (MEDRANO, 2013, p 5).

Agora é bem estabelecido que a indução de inflamação por infecções bacterianas e virais aumenta o risco de câncer (MARTEL e FRANCESCHI 2009), Neoplasias mais sólidas aparecem em indivíduos mais velhos, e até mesmo a velhice e a senescência celular são postuladas como sendo promotores de tumor que atuam através de mecanismos inflamatórios (ERSHLER e KELLER, 2000; RODIER *et al.*, 2009). Juntamente ao seu efeito pró-tumorigênico, a inflamação também pode influenciar a resposta imune do hospedeiro à tumores e pode ser utilizada na imunoterapia do câncer (DOUGAN e DRANOFF, 2009).

A inflamação é um componente crítico da progressão do tumor e muitos cânceres surgem de locais de infecção, irritação e inflamação crônica (COUSSENS e WERB, 2002).

A maioria, se não todos os tumores sólidos desencadeiam uma resposta inflamatória intrínseca que se acumula em um microambiente pró-tumorigênico (MANTOVANI *et al.*, 2008). Em adição à proliferação celular autônoma, determinados oncogenes, tais como *Ras* e membros da família de *MYC*, induzem um programa transcricional que conduz a remodelagem do microambiente do tumor através do recrutamento de leucócitos e linfócitos, expressão do promotores de tumor e de quimiocinas e citocinas (SOUCEK *et al.*, 2007; SPARMANN e BAR-SAGI, 2004). Todos os tumores sólidos, em algum momento, ultrapassam seu suprimento de sangue, oxigênio e nutrientes tornando-se carentes, isto resulta em morte celular por necrose no núcleo do tumor e libertação de mediadores pró-inflamatórios, tal como a IL-1 (interleucina-1) (VAKKILA e LOTZE, 2004). A resposta inflamatória resultante promove neo-angiogênese e proporciona a sobreviventes das células cancerosas, através da disponibilização de fatores de crescimento adicionais, produzidos por células inflamatórias e imunitárias, recentemente recrutadas (KARIN, 2006).

O microambiente do tumor, que é em grande parte orquestrado por células inflamatórias, é um participante indispensável no processo neoplásico,

promovendo a proliferação, sobrevivência e migração. Além disso, as células tumorais recrutam algumas das moléculas de sinalização do sistema imune inato, tais como selectinas, quimiocinas e seus receptores de invasão, migração e metástase. A proliferação contínua de células em um ambiente rico em células inflamatórias, fatores de crescimento e agentes promotores de danos no DNA, certamente potencializam e/ou promovem o risco neoplásico. Durante a lesão de um tecido associada a uma ferida, a proliferação celular é reforçada, enquanto o tecido se regenera e a inflamação diminui. Em contraste, as células em proliferação, que permanecem com danos no DNA ou agressão mutagênica, continuam a proliferar em um microambiente rico em células inflamatórias e fatores de crescimento que suportem o seu crescimento. Hoje, sabe-se que de fato as células tumorais podem usurpar os principais mecanismos pelos quais o organismo tenta combater o câncer, para então continuar a colonizar o hospedeiro (COUSSENS e WERB, 2002).

Um dos mecanismos que permitem que o tumor sobreviva é seu estabelecimento em um ambiente imunossupressor. Esse estado é adquirido pela secreção de citocinas supressoras como, VEGF (Fator de Crescimento vascular endotelial), TGF $\beta$  (Fator de Transformação do crescimento beta), interleucina 10 e pelo recrutamento de células, tais como, células T reguladoras (MEDRANO, 2013).

As células do sistema imunológico mais frequentemente encontradas dentro do microambiente tumoral são os macrófagos associados ao tumor (TAM) e linfócitos T (ou células T). Os TAMs promovem principalmente o crescimento do tumor e podem ser obrigatórios para a angiogênese, invasão e metástase (CONDEELIS e POLLARD, 2006). O alto teor TAM geralmente correlaciona-se com um mau prognóstico (MURDOCH *et al.*, 2008).

As células T apresentam importante papel no combate ao câncer, porém também há evidências de que muitos dos subconjuntos de células T encontradas em tumores sólidos estão envolvidos na promoção e progressão tumoral, ou, ainda, em metástase. Isto inclui células T CD8+, produtoras de IFN- $\gamma$ , células Th1 (linfócitos T auxiliar), Th2 e Th17 (ASPORD *et al.*, 2007; NARDO *et al.*, 2009; HANADA *et al.*, 2006; ROBERTS *et al.*, 2007; LANGOWSKI *et al.*, 2006; WANG *et al.*; 2009).

As células tumorais produzem várias citocinas e quimiocinas que atraem leucócitos. O componente inflamatório da neoplasia pode incluir o desenvolvimento de uma população diversa de leucócitos – tais como, neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos e mastócitos, assim como linfócitos - todos os quais são capazes de produzir um conjunto variado de citocinas e mediadores citotóxicos, incluindo espécies reativas de oxigênio, as MMPs (metaloproteases) e outras proteases, como serino- ou cisteíno-proteases, bem como mediadores solúveis, como TNF- $\alpha$ , interleucinas e interferons (IFNs) (COUSSENS e WERB, 2002). Dessa forma, a produção de citocinas pelas células imunes e inflamatórias é um importante mecanismo de promoção tumoral que fornece as células malignas sinais contínuos de crescimento e sobrevivência em um microambiente inicialmente hostil. Ainda, vários tipos de células cancerígenas produzem suas próprias citocinas, incluindo IL-6 (GAO *et al.*, 2007).

O perfil de expressão de citocinas e quimiocinas no microambiente tumoral pode ser mais relevante do que o seu teor de células imunes específicas. Diferentes citocinas podem promover ou inibir o desenvolvimento e a progressão tumoral, independentemente da sua origem. Através da ativação de vários efetores a jusante, tais como fatores de transcrição NFkB, AP-1, STAT (transdutores de sinal e ativadores de transcrição) e SMAD (proteínas intracelulares que transduzem sinais extracelulares), bem como caspases. As citocinas controlam o meio imunológico e inflamatório, seja favorecendo a imunidade anti-tumoral (IL-12, TRAIL (fator de necrose tumoral relacionada a ligante indutor de apoptose), IFN $\gamma$ ) ou melhorando a progressão tumoral (IL-6, IL-17, IL-23), além de apresentar efeitos diretos sobre o crescimento e a sobrevivência das células tumorais (TRAIL, FasL (Ligante Fas), TNF- $\alpha$ , ligantes de EGFR (receptor do fator de crescimento epidermal), TGF- $\beta$  (Fator de transformação de crescimento beta), IL-6) (LIN e KARIN, 2007).

O Fator Nuclear de kB (NFkB) é uma pequena família de proteínas, que funcionam como fatores de transcrição, o qual é conhecido por estar envolvido nas respostas imunitárias e inflamatórias inatas, que atuam apenas quando formam dímeros. Embora a importância de NFkB na imunidade seja indiscutível, evidências recentes indicam que as vias de sinalização que estão envolvidas na ativação do NFkB são também importantes para o

desenvolvimento tumoral. O NFkB é capaz de induzir várias das alterações celulares necessárias para a tumorigênese relatadas por Hanahan e Weinberg, e tem sido verificado constitutivamente ativo em alguns tipos de células cancerígenas. Existem vários mecanismos pelos quais os fatores de transcrição NFkB são desacoplados dos seus modos normais de regulação, e estes têm sido associados ao câncer (KARIN *et al.*, 2002).

NFkB constitutivamente ativos têm sido associados com vários aspectos da tumorigênese, incluindo a promoção da proliferação de células cancerosas, a prevenção de apoptose e o aumento do potencial angiogênico e metastático de um tumor. O NFkB controla a proliferação celular por ativação de genes alvos e pode também ser um inibidor de morte célula programada ao ativar a transcrição de vários genes conhecidos por bloquear a indução de apoptose por TNF- $\alpha$  e outros membros pró-apoptóticos (KARIN *et al.*, 2002).

É relatado que moléculas mediadoras de inflamação, como citocinas pró-inflamatórias e mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico, são encontrados em grandes quantidades em tumores como o melanoma (ONUCHIC *et al.*, 2012). Por exemplo o Leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>). Ele é enzimaticamente formado pela 5-LOX, e possui um importante papel no recrutamento de células inflamatórias para o ambiente tumoral (BACHI *et al.*, 2009). Outro mediador inflamatório lipídico relacionado a progressão tumoral é a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Ela é formada enzimaticamente pela ciclooxigenase-2 (COX-2) e possui um importante papel na modulação da atividade de macrófagos e neutrófilos recrutados pelas células tumorais, favorecendo o crescimento tumoral (CLARKE *et al.*, 2005).

## 2.5 CARBOIDRATOS E SUA RELAÇÃO COM O CÂNCER

As células tumorais exibem muitas alterações quando comparadas com as células normais. Um exemplo interessante é mostrado pelo padrão de carboidratos expressos na superfície celular ou na matriz extracelular. Vale lembrar que o desenvolvimento embrionário é tipicamente acompanhado por mudanças no padrão de glicosilação. Assim, não é surpreendente que mudanças no padrão de glicosilação são também características universais de transformações que geram células tumorais. Corrobora com esta ideia os

estudos correntes que têm mostrados que diversas glicosilações na superfície das células tumorais medeiam elementos chaves em processos patofisiológicos durante as várias etapas da progressão tumoral (LI, SONG e QIN, 2010).

Dentre os glicoconjugados de interesse em glicobiologia do câncer, destacam-se os Proteoglicanos, os quais são moléculas presentes em quase todos os tecidos na matriz extracelular, bem como na própria célula (membrana plasmática ou intracelularmente). Só os proteoglicanos de matriz extracelular são mais de 50 membros conhecidos e os de membrana são, basicamente pertencentes a três famílias (Sindecam, Glipicam e Proteoglicano de Condroitim Sulfato ou NG2) (AFRATIS *et al.*, 2012).

Os Proteoglicanos são formados por um esqueleto proteico ao qual liga-se covalentemente cadeias de glicosaminoglicanos. Estes, por sua vez, são heteropolissacarídeos compostos por unidades dissacarídicas repetitivas. Cada unidade possui uma *N*-acetil hexosamina (podendo ser glucosamina ou galactosamina) e um açúcar não aminado (ácido urônio ou galactose). As diferenças no tipo de monossacarídeos nas unidades dissacarídicas, bem como no padrão de sulfatação resultam nos diferentes glicosaminoglicanos: Heparan sulfato, Heparina, Condroitim 4 ou 6 sulfato, dermatan sulfato, queratan sulfato ou ácido Hialurônico (AFRATIS *et al.*, 2012). Este último é o único glicosaminoglicano que não se apresenta sulfatado e, também, não forma ligação covalente a um esqueleto proteico, portanto não forma proteoglicano.

De acordo com Mizumoto e Sugahara (2013), os glicosaminoglicanos estão distribuídos na superfície de células e em suas matrizes extracelulares, atuando também em vários processos fisiológicos.

Diversos glicosaminoglicanos apresentam papel chave na transformação maligna de células e em processos metastáticos. Por exemplo, foi verificado em carcinoma pulmonar maior proporção de unidades dissacarídicas de 4,6-O-dissulfato em células que continham alto potencial metastático se comparadas com células de baixo potencial metastático, o que sugere importante contribuição dos glicosaminoglicanos nesse processo (MIZUMOTO e SUGAHARA, 2013).

A remodelagem enzimática de glicosaminoglicanos está envolvida na formulação de respostas inflamatórias através de um controle de sequestro e liberação de citocinas/quimiocinas no espaço extracelular, realizando modulação de interações de células endoteliais com leucócitos e a ECM (MEIROVITZ *et al.*, 2013).

## 2.6 ÁCIDO HIALURÔNICO E MATRIZ EXTRACELULAR NO TUMOR E INFLAMAÇÃO

De acordo com Nobre *et al.*, (2011), durante as duas últimas décadas, progressos significativos foram feitos na compreensão do papel do ácido hialurônico (HA), assim como seu mecanismo de síntese, degradação e regulação. A matriz extracelular (ECM) desempenha papel essencial na organogênese, crescimento e função celular, e um de seus principais componente é o HA. O HA apresenta forma nativa de alto peso molecular (HMWHA) e é composto de repetidas unidades dissacarídicas de N-Acetilglucosamina e ácido glucurônico, sendo sintetizado na superfície de diversas células, como células estromais e queratinócitos.

O HMWHA pode ser degradado em fragmentos de baixo peso molecular por hialuronidases, enzimas que são sintetizadas principalmente por fibroblastos e apresenta expressão elevada durante processos inflamatórios. As células tumorais produzem hialuronidases, o que leva a degradação de HA ao redor do ambiente tumoral. Os fragmentos de HA podem estimular respostas de angiogênese, incluindo proliferação celular e migração (NOBRE *et al.*, 2011). Os fragmentos de HA desempenham diversos efeitos biológicos nas células quando comparado com HMWHA, podendo, por exemplo, induzir quimiocinas inflamatórias e expressão de citocinas em macrófagos, o que pode facilitar a degradação de proteínas de matriz extracelular e, portanto, promover o crescimento de tumores e metástases (VOELCKER *et al.*, 2007).

Os fragmentos de HA atuam promovendo a maturação de células dendríticas, este processo é acompanhado pela liberação de interleucina (IL)-1b, IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF). Além disso, os fragmentos de HA em lesões teciduais podem estimular as células endoteliais a produzir IL-8 na forma TLR4-dependente (VOELCKER *et al.*, 2007).

De acordo com os estudos de Voercker (2007), dados sugerem que os produtos da degradação do HA presente na ECM ativam células do melanoma aumentando sua mobilidade, em parte, através da indução da via de sinalização do TLR4 e induzem a expressão de IL-8, quimioatrativo que possui potencial angiogênico e, portanto, podem contribuir para o crescimento e a progressão do tumor. A motilidade de células tumorais é considerada essencial para o crescimento local do tumor e espalhamento metastático sucessivo, após estimulação por fragmentos de HA isso é evidenciado, concluindo-se que o mesmo também é responsável pelo aumento dos níveis de IL-8 detectados. A superexpressão de IL-8, em diferentes tipos de tumor, aumenta o crescimento de tumores e progressão da doença, incluindo melanomas humanos, em que a expressão de IL-8 correlaciona-se, adicionalmente, com potencial metastático. Outra atuação dos fragmentos de HA é sobre os reativos de oxigênio. Os EROs potencializam a degradação de componentes da ECM, incluindo o HA, podendo assim potencializar o estado de inflamação em locais de lesão tecidual, visto que os fragmentos de HA aumentam as respostas inflamatórias. No entanto, o HA tem a capacidade de absorver as espécies reativas de oxigênio, evitando assim sua alta atividade e desempenhando um papel ativo na proteção dos tecidos (NOBLE, *et al.*, 2011).

O CD44 é uma molécula de superfície celular e é o principal receptor de ligação do HA. Essa proteína participa de diversas funções celulares, tais como ativação de linfócitos, proliferação, diferenciação e migração celular, angiogênese, apresentação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento aos receptores correspondentes, e atua também na sinalização para a sobrevivência da célula. Todas estas propriedades biológicas são essenciais para as atividades fisiológicas de células normais, mas também estão associadas às atividades patológicas das células tumorais (NAOR *et al.*, 2002).

O CD44 é uma proteína abundante em muitos tipos de células e embora algumas isoformas de CD44 possam se acoplar a outras moléculas, tais como fibronectina, a maioria das funções atribuídas ao CD44, até agora, pode ser atribuído à sua capacidade de ligar-se e interiorizar HA. A interação HA-CD44 inicia um importante papel no desenvolvimento, inflamação, recrutamento e ativação de células T, mas a atuação do CD44 na regulação do HA depende do tipo celular. Quando há acúmulo de HA no local da lesão

tecidual ocorre incessante inflamação e a deficiência de CD44 resulta em inflamação aumentada, sugerindo um importante papel do CD44 na limitação da inflamação, exercendo prevenção de respostas inflamatórias exageradas ao LPS e promovendo a expressão de reguladores negativos da sinalização de TLR4. A ativação do CD44 não parece ser resultado de ostensivas alterações na glicosilação. A ligação de CD44 em linfócitos T ativados, mediadas por HA é a primeira interação adesiva, permitindo o extravasamento em locais de inflamação, dependendo também de integrina  $\alpha$ , o que pode explicar a frequente associação destes receptores de adesão com diversas moléculas inflamatória crônica (NOBLE, *et al.*, 2011).

## 2.7 MEDICINA ALTERNATIVA E COMPLEMENTAR (CAM)

A medicina Alternativa e Complementar (CAM) está definida pelo Centro Nacional de Medicina Alternativa e Complementar (NCCAM) como "um grupo de diversos sistemas de cuidados médicos de saúde, práticas e produtos que não são atualmente consideradas uma parte da medicina convencional". Algumas das modalidades de CAM incluem acupuntura, aromaterapia, osteopatia, yoga e suplementos de ervas (BISHOP *et al.*, 2010).

Apesar dos notáveis avanços realizados pela medicina convencional, tem havido um crescimento exponencial no interesse e no uso das CAM, principalmente em países ocidentais desenvolvidos. Segundo a literatura as medicinas não convencionais são elemento significativo no tratamento em países em desenvolvimento e pobres (SPADACIO e BARROS, 2008).

O uso de CAM tem aumentado progressivamente ao longo dos últimos 15 anos mais ou menos, e, sem dúvida, ganhou importância médica, econômica e sociológica, na população em geral varia de 5 a 75% (mediana 23%), de acordo com uma recente publicação sistemática que incluiu dez países: Áustria, Dinamarca, Alemanha, Itália, Suíça, Reino Unido, Canadá, Estados Unidos, Austrália e Coréia do Sul (MOLASSIOTIS *et al.*, 2005; VIKSVEEN *et al.*, 2013). A integração das CAM nos sistemas nacionais de saúde tem sido tema de constantes debates visto que configuram opções em potencial para o cuidado à saúde e não podem ser desconsideradas enquanto prática terapêutica. Constatou-se também crescimento no número de

produções científicas que procuram saber o quanto os pacientes com câncer e seus familiares solicitam informações em relação à utilização clínica de uma série de intervenções por CAM. A CAM é popular entre os pacientes com câncer: 35,9% dos pacientes utilizam alguma forma de CAM (SPADACIO e BARROS, 2008). Os medicamentos fitoterápicos foram as terapias CAM mais comumente utilizadas, juntamente com a homeopatia, vitaminas/minerais, chás medicinais e outros. Ainda ao realizar uma análise multivariada sugeriu-se que o perfil do utilizador de CAM foi o de pessoas mais jovens, mulheres e com maior nível de escolaridade. A maioria dos pacientes usou CAM para aumentar a capacidade do corpo de combate ao câncer ou melhorar o bem-estar físico e emocional. Essas são as principais razões para o pacientes com câncer voltarem-se para CAM (MOLASSIOTIS *et al.*, 2005). Estudo realizado no EUA investigou a extensão do uso da CAM entre os adultos norte-americanos e sobre a distribuição das terapias (Tabela 2) (FRENKEL *et al.*, 2008).

TABELA 2. USO DA CAM ENTRE OS ADULTOS NORTE-AMERICANOS DURANTE O ANO E A DISTRIBUIÇÃO DAS TERAPIAS.

Terapia CAM	Porcentagem	(N = 502 pacientes)
Suplementos nutricionais e vitaminas	35.9	180
Medicamentos fitoterápicos	25.1	126
Remédios caseiros	23.1	116
Massagem terapêutica	21.3	107
Aromaterapia	12.5	63
Meditação	12.2	61
Manipulação quiroprática	12.0	60
Terapia de relaxamento	10.6	53
Medicamentos homeopáticos	5.4	27
Acupuntura	4.4	22
Cura energética	4.2	21
Reflexologia	3.0	15
Imaginação guiada	2.6	13
Toque terapêutico	2.2	11
Outros	2.2	11
Florais de bach	1.2	6
Reiki	1.0	5
Shiatsu	1.0	5
Naturopatia	0.4	2

FONTE: FRENKEL, 2008.

## 2.8 HOMEOPATIA

O sistema médico alternativo da homeopatia foi desenvolvido na Alemanha no final do século XVIII. Os defensores da homeopatia têm como ponto base o princípio do "semelhante cura semelhante". Assim uma doença pode ser curada por uma substância que produz sintomas similares em pessoas saudáveis (OLAKU *et al.*, 2013). A fim de minimizar os possíveis agravantes que tal tratamento poderia causar sobre os sintomas da doença original, Hahnemann propôs o método de dinamização farmacotécnica ou potencialização (diluição em série com sucussão) para reduzir o efeito primário da medicação e desenvolver o seu "poder latente dinâmico" (TEIXEIRA *et al.*, 2010; HAHNEMANN, 1991). Além disso, a "lei da dose mínima", na qual a noção de que quanto menor a dose do medicamento, maior a sua eficácia, também é utilizada (OLAKU *et al.*, 2013). A questão científica muitas vezes colocada nesse processo de preparo é se há vestígios dos materiais de partida (CHIKRAMANE *et al.*, 2012).

Samuel Hahnemann (1755-1843) é o fundador da homeopatia e o primeiro a formular um campo de sistema terapêutico usando doses extremamente pequenas de remédios e preparando essas diluições através de um duplo processo de diluição seriada e agitação de substâncias. Ele se referiu a este processo como "dinamização" ou "potencialização", e o produto correspondente de dinamizações ou "potências", uma vez que ele acreditava que este procedimento desenvolvia poderes latentes dinâmicos, escondido ou adormecido dentro da matéria-prima dos compostos. Segundo Hahnemann, a susceptibilidade do organismo é aumentada quando o indivíduo está doente, e a susceptibilidade à ação de substâncias está relacionada ao "poder de conservação", caracterizado como sendo muito mais excitável na doença do que na saúde. A tentativa de Hahnemann para explicar a ação homeopática incluiu um componente mecânico (extensão da superfície contato) e um "dinâmico", ou seja, as forças que operam no movimento da matéria, mesmo no mais ínfimo nível, e sua relação com o componente mínimo anatômico de um corpo vivo, as células (WAISSE, 2012).

O processo clássico de fabricação de medicamentos homeopáticos envolve geralmente matérias-primas vegetal, mineral ou animal trituradas em

lactose e / ou diluídas em série em soluções de etanol-água e sucussão (vigorosos ciclos repetidos de batidas manuais contra uma superfície, ou padronizado em braço mecânico) em frascos de vidro. Fatores de diluição comum são uma fonte de 1 parte para 9 partes de solvente (1/10, decimal, D ou X potências) e uma fonte de 1 parte para 99 partes de diluente (1/100, centesimal, C potências) ( BELL e KOITHAN, 2012). Pelas várias diluições, diversas nomenclaturas são dadas, tais como "doses infinitesimais", "ultra diluições molecular", "ultra-diluições", "diluições ultra-altas", "diluições elevadas", substâncias diluídas em série. O termo altas diluições (HDs) resulta de um consenso por parte dos membros do Grupo Internacional de Pesquisa para o Infinitesimal (GIRI), assim será usado neste trabalho (WAISSE, 2012). A homeopatia unicista envolve o uso de um único composto homeopático adaptado para cada pacientes, enquanto que na homeopatia pluralista um complexo de vários compostos homeopáticos são combinados em uma fórmula, onde a concentração tende a ser abaixo de 24X e 12X (os números indicam a diluição do remédio homeopático, isto é, por exemplo, se os remédios são obtidos através de diluição decimal - uma parte de substância para nove partes de água é em seguida rotulada pela letra X, ou D) (MILAZZO *et al.*, 2013).

A homeopatia chegou oficialmente ao Brasil em 1840, por meio do ex-comerciante francês e militante socialista Benoit Mure, há relatos, entretanto, de que, em 1820, os imigrantes alemães, que se estabeleceram em colônias no Sul do Brasil, já a utilizavam como uma medicina caseira e seguiam as orientações presentes nos livros escritos pelo médico conterrâneo e criador da nova medicina, Dr. Samuel Hahnemann. No seu início, a história da homeopatia no Brasil esteve atrelada a uma prática liberal, com tímidas incursões institucionais nos ambulatórios mantidos pelas ordens católicas, no Rio de Janeiro, que prestavam cuidados aos socialmente desassistidos, inclusive, escravos (MONTEIRO e IRIART, 2007). No Brasil a homeopatia deixou de ser considerada como uma terapia alternativa quando foi reconhecida como especialidade médica pela portaria nº 1000 de 1980 pelo Conselho Federal de Medicina (NOGUEIRA *et al.*, 1986).

Diversos grupos de pesquisa buscam esclarecer a eficácia de remédios homeopáticos em geral ou investigar as características de altas potências em

particular através da aplicação de potências e altas diluições em experiências de investigação básica, em que, como sabemos, nenhum efeito placebo pode ter lugar (CLAUSEN *et al.*, 2011). A chave para uma melhor compreensão do princípio fundamental da homeopatia é a decodificação do seu mecanismo de ação, através de experimentação com modelos e remédios apropriados. A investigação sobre potências elevadas aumentou cerca 20% desde 2007 (CLAUSEN *et al.*, 2011).

Através de diversos estudos a atividade farmacológica ou a eficácia de alguns remédios homeopáticos em pré-clínico estudos (*in vitro* e em animais) tem sido investigadas, porém, pouco se sabe sobre a ação dessas drogas (CAMARGO *et al.*, 2013). A identificação do princípio ativo dos medicamentos homeopáticos preparados por diluição e sucussão da substância original é uma grande questão científica para a homeopatia. Em altas diluições (> 12-C ou 24 x, respectivamente), a probabilidade de que uma única molécula da tintura mãe esteja presente é quase zero. Assim, os efeitos específicos de elevadas potências são considerados, de acordo com a corrente científica, como improváveis (JAGER *et al.*, 2011).

Ensaio clínicos randomizados, na maioria dos casos, relatam que os efeitos de remédios homeopáticos apresentam significativa diferença em comparação com o placebo, podendo indicar que em certos casos o meio de diluição pode adotar propriedades específicas relacionadas com a tintura-mãe, mesmo sem quaisquer moléculas do ativo presente (JAGER *et al.*, 2011).

Em contrapartida, segundo bibliografia, estudos físico-químicos de soluções homeopáticas demonstraram inequivocamente a presença das matérias-primas de partida sob a forma de nanopartículas, mesmo nessas diluições extremas (super-Avogadro $>10^{23}$ ) (CHIKRAMANE *et al.*, 2012).

Com base nos resultados Chikramane e colaboradores foi proposta uma hipótese de retenção de partículas que explica a presença do material de partida, apesar das enormes diluições.

Como paliativo ou tratamento de suporte, a homeopatia é usada principalmente para fortalecer o corpo em sua luta contra o câncer, para melhorar o bem-estar geral, e para aliviar a dor resultante de uma doença ou tratamentos convencionais (MILAZZO *et al.*, 2006).

## 2.9 COMPLEXOS NATURAIS ALTAMENTE DILUÍDOS

Há mais de 10 anos, o Laboratório de Pesquisa em Células Inflamatórias e Neoplásicas da Universidade Federal do Paraná, vem estudando complexos naturais, os quais são diluídos em água destilada e menos de 1% de álcool (OLIVEIRA *et al.*, 2011). As matrizes utilizadas são tinturas conhecidas da Farmacopéia Homeopática Brasileira (2a edição – 1997) e a preparação segue as técnicas homeopáticas de Hahnemann, com dinamizações sucessivas, todas realizadas manualmente.

Nos estudos em nosso laboratório, as principais alterações evidenciadas após os tratamentos com um dos complexos, foram “a) a produção do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) por macrófagos *in vitro* que foi significativamente diminuída (PIEMONTE *et al.*, 2002); b) a atividade enzimática da NADPH oxidase foi aumentada assim como a da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (OLIVEIRA *et al.*, 2006); c) a atividade do sistema endossomal/lisosomal assim como a atividade fagocítica dos macrófagos em interação com *Saccharomyces cerevisiae* e *Trypanosoma cruzi* epimastigotas foi aumentada (LOPES *et al.*, 2006); d) a ativação morfológica de macrófagos, aumento de liberação de NO *in vitro*, diminuição da liberação de O<sub>2</sub> *in vitro*, aumento da expressão de CD3, CD11b, CD45R *in vivo* (OLIVEIRA, 2010); e) o M1 levou a redução de TNF- $\alpha$ , e também reduziu a atividade de NF $\kappa$ B sobre a estimulação do TNF- $\alpha$  em uma linhagem de células repórter (OLIVEIRA *et al.*, 2011); f) diversos complexos aumentaram a imunidade inata e M1 também aumentou a imunidade adquirida (OLIVEIRA *et al.*, 2011); entre diversos mais.

Em estudos realizados com animais portadores de Sarcoma 180 mostraram que todos os animais que foram tratados com um complexo natural altamente diluído, sobreviveram até a data final do experimento. Além disso, ocorreu remissão tumoral total em 30% dos animais e mesmo nos animais que a massa tumoral permaneceu, foi possível observar significativa redução do volume tumoral e infiltração leucocitária, granulação tecidual e fibrose circundante ao tumor (SATO *et al.* 2005).

Através desses dados é constatada a grande importância da continuidade desses estudos, visando novas possibilidades terapêuticas que complementem tratamentos alopáticos.

### 3 JUSTIFICATIVA

Os dados prévios do nosso grupo de pesquisa, utilizando compostos naturais altamente diluídos (M1 ou M8) mostraram que estes compostos possuem ação antimelanoma. Vale destacar que tanto em modelo experimental de metástase pulmonar (Figura 6) (GUIMARÃES, 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2010), quanto em tumor sólido (Figura 7) (ANDRADE, 2011), M1 mostrou ter importante ação para diminuição do tamanho dos nódulos tumorais (no caso do pulmão), quanto da massa tumoral (em tumor sólido). Os mecanismos pelos quais estes complexos agem ainda não são conhecidos. Os dados preliminares mostram que, no caso do tumor sólido, M1 leva a um aumento de apoptose das células tumorais, decorrente de uma menor formação de novos vasos (ANDRADE, 2011). Já no caso dos nódulos tumorais no pulmão, o Proteoglicano Perlecan encontra-se menos expresso, sendo um requisito importante para migração, invasão e formação de novas metástases (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

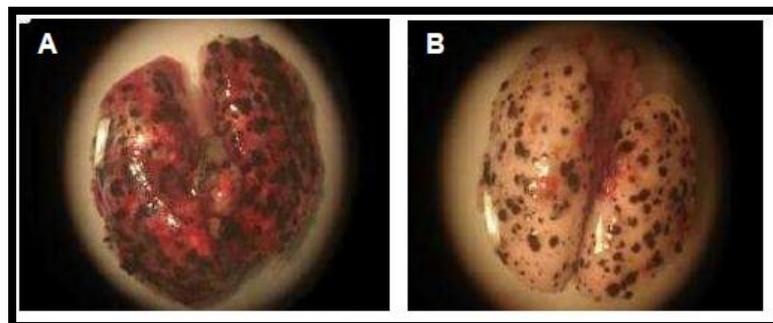


FIGURA 6 – EFEITO DO TRATAMENTO COM O COMPLEXO ALTAMENTE DILUÍDO M1 NA FORMAÇÃO DE NÓDULOS TUMORAIS DE COLONIZAÇÃO PULMONAR. As imagens obtidas de pulmões de animais que receberam células tumorais B16F10 via veia caudal e, que desenvolveram nódulos tumorais neste órgão. Observe os nódulo em preto, devido a presença de melanina nas células tumorais de melanoma. A – pulmão de animal não tratados com complexo natural altamente diluído e B - pulmão de animal tratados com M1.  
FONTE: GUIMARÃES (2009)

Tais resultados sugerem que o complexo natural altamente diluído M1 pode ser eficiente no tratamento contra o melanoma. Assim, o presente trabalho buscou avaliar os efeitos do tratamento com M1 em processos inflamatórios, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*.

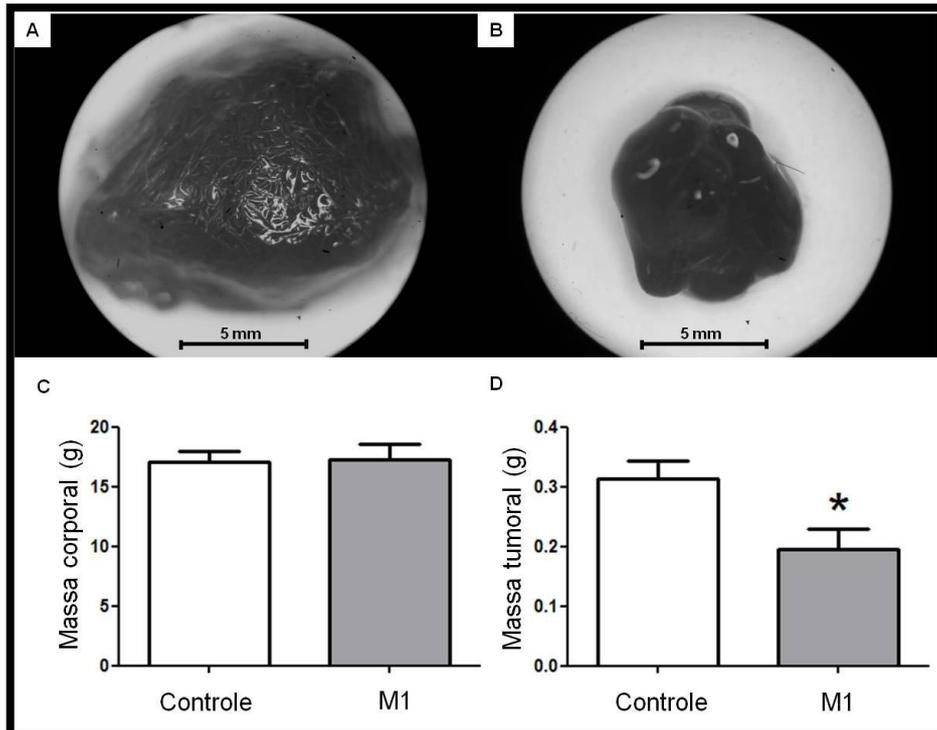


FIGURA 7 – O TRATAMENTO COM M1 AO MENOR DESENVOLVIMENTO DO TUMOR SUBCUTÂNEO. Tumor sólido de animais que receberam células tumorais B16F10 no flanco dorsal e desenvolveram tumor subcutâneo. Observe a massa tumoral visualizada em microscopia estereoscópica. A cor escura é decorrente da presença de melanina nas células tumorais de melanoma. A – tumor sólido de animal não tratados com complexo natural altamente diluído e B – tumor sólido de animal tratados com M1. FONTE: ANDRADE (2011).

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVOS GERAIS

Considerando que o complexo natural altamente diluído M1 tem uma significativa ação antimelanoma, o presente trabalho tem como objetivo geral contribuir para o entendimento do mecanismo de ação de M1 sobre melanoma *in vitro* e *in vivo*.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1. Avaliar se a redução do desenvolvimento de melanoma, causado por M1 também é acompanhado da diminuição do processo inflamatório associado ao tumor, estudando moléculas chaves neste processo, como citocinas, NFkB, carboidratos neutros, ácido hialurônico e COX-2.

4.2.2. Avaliar se M1 pode ter ação antitumoral sobre o tumor pré-estabelecido.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

Como plano de trabalho, foram desenvolvidos ensaios *in vitro* e *in vivo*, visando avaliar o tratamento com M1 em processos inflamatórios. As principais técnicas utilizadas em ambos foram citometria de fluxo e imunohistoquímica, como apresentado no organograma da figura 8.

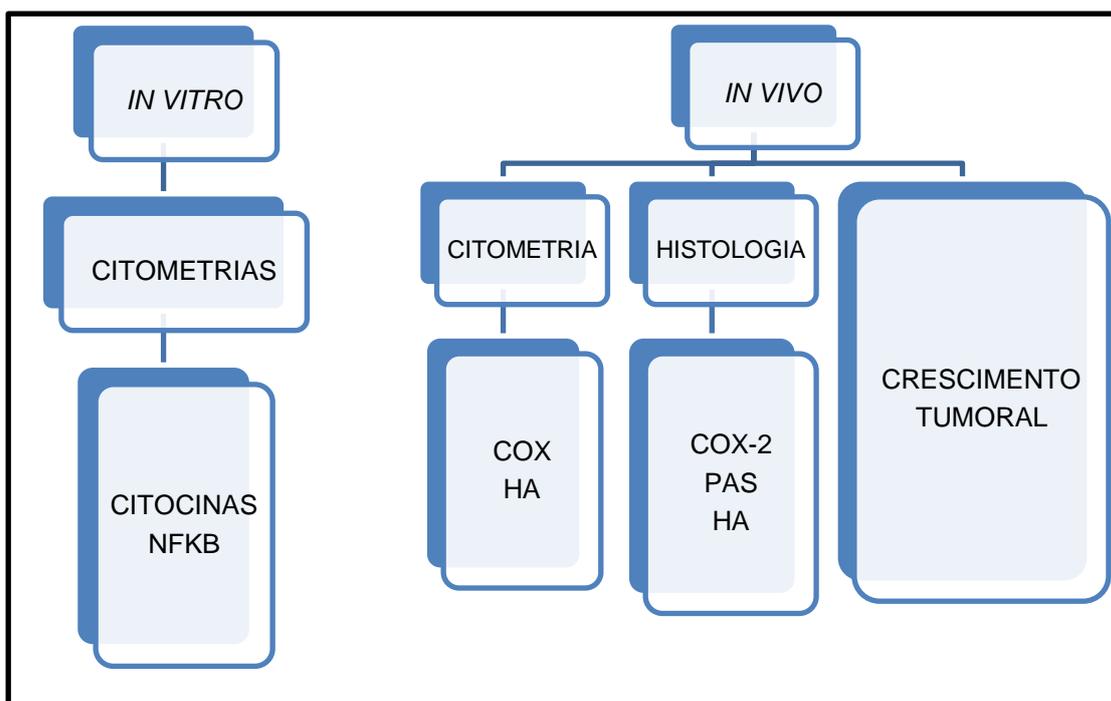


FIGURA 8: ORGANIZAÇÃO EXPERIMENTAL REALIZADA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.

### 5.1 COMPLEXO NATURAL ALTAMENTE DILUÍDO - M1

Os complexos naturais altamente diluídos seguem as técnicas de preparação Hahnemannianas. As tinturas-mãe são adquiridas de agências autorizadas e licenciadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) assegurando a composição físico-química dos produtos bem como a qualidade, principalmente pelo fato do composto estar livre de endotoxinas.

O complexo utilizado segue as normas de manipulação da Farmacopeia Homeopática Brasileira, sendo dinamizado sucessivamente. O veículo de diluição do complexo, água destilada, foi preparado igualmente ao

complexo para que possa servir como controle. Esses foram manipulados e obtidos na farmácia Homeoterápica (Curitiba-PR).

A partir de um extrato total ou diluição inicial (DH), tinturas altamente diluídas foram obtidas de seriadas diluições decimais em água destilada (1 parte de tintura para nove partes de água - v / v). A solução aquosa resultante é incolor e inodora, e contém 0,1% de álcool (OLIVEIRA *Et Al.*, 2011).

Todos os frascos das soluções para tratamento utilizados nesse estudo foram armazenados a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por até três meses após a data de fabricação. Eles também foram vigorosamente agitados, processo denominado de sucussão, por 30 vezes imediatamente antes do uso. Para uso nos ensaios *in vitro*, o M1 foi filtrado em membranas de 0,22µm e armazenado em frascos estéreis, ao abrigo da luz.

TABELA 3. COMPOSIÇÃO E DILUIÇÃO FINAL DE CADA COMPONENTE DO COMPOSTO NATURAL ALTAMENTE DILUÍDO UTILIZADO

Componente	M1	
	Matriz	Concentração Final
<i>Aconitum napellus</i>	MT	20 dH
<i>Arsenicum álbum</i>	6 dH	18 dH
<i>Asa foetida</i>	MT	20 dH
<i>Calcarea carbônica</i>	8 dH	16 dH
<i>Chelidonium majus</i>	MT	20 dH
<i>Cinnamon</i>	MT	20 dH
<i>Conium maculatum</i>	5 dH	17 dH
<i>Echinacea purpurea</i>	MT	20 dH
<i>Gelsemium sempervirens</i>	MT	20 dH
<i>Ipecacuanha</i>	5 dH	13 dH
<i>Phosphorus</i>	12 dH	20 dH
<i>Rhus toxicodendron</i>	6 dH	17 dH
<i>Silicea</i>	12 dH	20 dH
<i>Sulphur</i>	12 dH	24 dH
<i>Thuja occidentalis</i>	6 dH	19 dH

FONTE: OLIVEIRA *et al.*, 2011.

## 5.2 CÉLULAS

As células utilizadas no presente trabalho foram de melanoma murino da linhagem B16F10, sendo adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro.

As células foram mantidas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB),

1mM de HEPES e 1mM de L-tirosina, acondicionadas em incubadora de CO<sub>2</sub>, a 37° C contendo 5% CO<sub>2</sub>.

Os subcultivos foram realizados com o uso de tripsina 0,25% /1mM EDTA, por 3 minutos, e com uma razão de 1:10, quando a cultura atingia aproximadamente 70% de confluência.

Para o tratamento *in vitro*, células B16F10 foram expostas ao M1 ou ao veículo (controle), diluído no meio de cultura, por um período determinado de acordo com o tipo de experimento.

### 5.3 ANÁLISE POR CITOMETRIAS DE FLUXO DE CÉLULAS B16F10 TRATADAS *IN VITRO*

Células B16F10 foram plaqueadas e mantidas nas condições especificadas acima. Após 24 h em cultura, as células foram tratadas com M1 ou veículo, com dose inicial de 20% (volume final) e posterior dose reforço de 1% em intervalos de 24 h. O tratamento seguiu até 96 h. No final do tratamento, as células foram soltas da placa com tripsina, lavadas com DMEM contendo 10% de SFB, e ressuspensas com PBS. As células foram aliquotadas em tubos de análise para citometria e foram avaliadas por essa metodologia para as seguintes moléculas: NFkB e citocinas, conforme descrito abaixo. Foi adquirido 10.000 eventos por amostras em citômetro de fluxo FACScalibur, através do software CellQuest (BD).

### 5.4 AVALIAÇÃO DE NFkB

Para o ensaio de quantificação do NFkB, foram plaqueadas 10<sup>5</sup> células/poço em placa de 24 poços. Após 24 h em cultura, as células foram tratadas com M1 ou veículo, conforme descrito anteriormente. Após o período de tratamento, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS por 3 vezes, sendo a seguir fixadas com paraformaldeído à 2% em PBS por 20 minutos. Após fixação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e então incubadas com saponina 0,01% por 10 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas uma vez com PBS e incubadas com glicina 0,01M em PBS por 2 minutos. Após o período de incubação as células foram lavadas novamente

com PBS e então incubadas com anticorpo IgG anti-NFkB P65 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dalas, Texas, EUA) produzido em camundongo, na diluição de 2 µg/ml em PBS contendo 1% de BSA e 0,01% de saponina, durante 60 minutos. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS uma vez e incubadas com o anticorpo anti-IgG de camundongo, conjugado com FITC (Jackson), produzido em cabra na diluição de 5 µg/ml em PBS, durante 45 minutos. Vale lembrar que entre todas as etapas de incubação ou lavagem as células foram centrifugadas (a 2000 RPM por 2 min).

Ao final do tempo de incubação, as células foram lavadas em PBS e ressuspensas em 400µl de PBS para serem analisadas em citometria de fluxo, conforme descrito anteriormente.

## 5.5 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS SECRETADAS PELA B16F10

Para detecção e quantificação de citocinas secretadas pela B16F10, 10<sup>4</sup> células/poço foram plaqueadas em placa de 96 poços, para que ao final do tempo de tratamento o número de células por poço fosse ao redor de 3,2.10<sup>5</sup> células, sendo que o tratamento com M1 seguiu o procedimento descrito anteriormente.

A avaliação das citocinas foi realizada por meio de cultura condicionado, que foi coletado ao final do período de incubação e avaliado com o uso do kit *Mouse Inflammation/Th1/Th2 Cytokine Cytometric Bead Array*, da BD Biosciences<sup>TM</sup>, conforme protocolo do fabricante. As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo BD FACScalibur, como descrito anteriormente.

## 5.6 IMUNOHISTOQUÍMICA

Blocos de parafina de pulmão de animais contendo nódulos tumorais pulmonares ou de tumor sólido, obtido com o modelo de tumor subcutâneo, foram gentilmente cedidos por Lucas Andrade (doutorando do nosso grupo de pesquisa, sendo que este material foi utilizado em seu projeto de pesquisa, mas com o enfoque em outras análises). Os blocos foram submetidos ao corte

fino de 5  $\mu\text{m}$ , com o auxílio de um micrótomo, sendo que os cortes foram distendidos em lâminas histológicas.

Cortes de 5  $\mu\text{m}$  de cada material (de tumores subcutâneos ou pulmonar) foram aderidos em lâminas pré-cobertas com poli-L-Lisina. Após a secagem das lâminas, os cortes foram desparafinizados em 3 banhos em xilol por 5 minutos, seguidos de bateria decrescente de álcool etílico (100, 90, 80, 70, 50%, por 5 minutos cada). Em seguida as lâminas foram lavadas por 2 minutos em água corrente e posteriormente em 3 banhos de água destilada e, então, processadas para as marcações de interesse.

Para as reações de imunohistoquímica, cortes reidratados foram incubados por 10 minutos com 5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  em metanol, para o bloqueio da peroxidase endógena seguidos de 3 banhos em PBS. A recuperação antigênica foi realizada em solução tampão de citrato de sódio 10mM, pH 6.0, à 96°C, por 30 minutos. Possíveis ligações não específicas e grupos aldeídicos livres foram bloqueados pela incubação de PBS contendo 1% de BSA por 10 minutos.

Posteriormente, os cortes foram incubados *overnight* por 12 horas à 4°C com o seguinte anticorpo primário: IgG anti-COX-2 (ciclooxigenase), produzido em coelho (Biocare Medical, Concord, CA, EUA), na diluição 0,1  $\mu\text{g/ml}$ .

Após a incubação com o anticorpo primário os cortes histológicos foram submetidos a 3 lavagens em tampão PBS, e as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo, conjugado com HRP (peroxidase de rábano) (Santa Cruz), 5 $\mu\text{g/ml}$ , por 30 minutos.

Também foi realizado ensaio de detecção histoquímica, utilizando um “probe” (marcador) desenvolvido para identificação do ácido hialurônico (MARTINS *et al*, 2003). Este consiste de uma proteína que faz a interação entre um proteoglicano e o ácido hialurônico, fazendo os agregados observados no Agrecam (onde uma cadeia de ácido hialurônico é observada interagindo com diversos proteoglicanos pequenos). Esta proteína é conhecida com proteína de ligação, a qual foi purificada e conjugada com biotina, pelo grupo de Profa. Helena Nader da UNIFESP. Para sua ligação, seguiu protocolo semelhante ao anterior, no entanto, a proteína de ligação foi utilizada na

concentração de 25  $\mu\text{g/ml}$ , por 1 hora e para sua revelação, foi utilizada estreptavidina conjugada com peroxidase (5 $\mu\text{g/ml}$ ), no mesmo tampão de diluição previamente descrito (para COX-2).

Ao final da incubação do ligante primário (anti-COX-2 ou probe para o ácido hialurônico), foram realizados novamente 3 lavagens em tampão PBS e as lâminas foram incubadas com DAB (3,3-diaminobenzidina) (Dako) por 1 minuto (conforme recomendação do fabricante). A seguir, as lâminas passaram por mais 3 lavagens com água destilada.

Ensaio para identificação da presença de carboidrato neutro também foram realizados pela colocação com PAS. Para tanto, lâminas reidratadas (como descrito anteriormente) foram incubadas com ácido periódico por 30 minutos. A seguir, foram lavadas por 3 vezes com água destilada. Posteriormente foram incubadas com reagente de Schiff por 30 minutos. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em água corrente e contracoradas com Hematoxilina. Para finalizar, as lâminas passaram por mais 3 lavagens com água destilada, seguida de bateria crescente de Etanol, seguido por Etanol/Xilol (1:1) e mais duas vezes em xilol. Finalmente, as lâminas foram montadas com Entellan (Merck).

## 5.7 ANIMAIS E TRATAMENTO *IN VIVO*

Camundongos machos C57Bl/6, de 6-10 semanas de idade, foram obtidos do Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná. Foram cumpridas todas as exigências legais, em especial da Lei Federal Nº 6.638, de 5 de Novembro de 1979, a qual trata do manejo científico de animais. Também, todos os procedimentos com animais foram aprovados no Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR (CEEA-UFPR), através do certificado nº 669.

## 5.8 MODELO DE CRESCIMENTO TUMORAL *IN VIVO*

Culturas de B16F10, com 70 - 80% de confluência foram desaderidas em incubação por 5 minutos com solução de tripsina 0,25%/ 1mM EDTA, por 3 minutos e, então, foram ressuspensas em DMEM com 10% de Soro Fetal

Bovino. Posteriormente, as células foram lavadas por 2 vezes com PBS. A viabilidade celular (>90%) foi avaliada com azul de tripan 0,4% em um hemocítmetro, e as células foram ressuspendidas em uma concentração de  $5.10^5$  células por ml e mantidas no gelo. Cerca de 50 $\mu$ l dessa solução foi injetada subcutaneamente no flanco dorsal dos camundongos em até 45 minutos após terem sido desadêridas. Após os tumores subcutâneos atingirem o volume de 300mm<sup>3</sup>, iniciaram-se os tratamentos com M1 ou com veículo por inalação, conforme descrito por Guimarães *et al.*, 2010. O tratamento foi realizado diariamente, sendo uma vez ao dia, até 7 dias.

Durante 7 dias, com o auxílio de um paquímetro, foi realizada a avaliação volumétrica. Por fim, os animais foram eutanasiados, os tumores removidos e pesados.

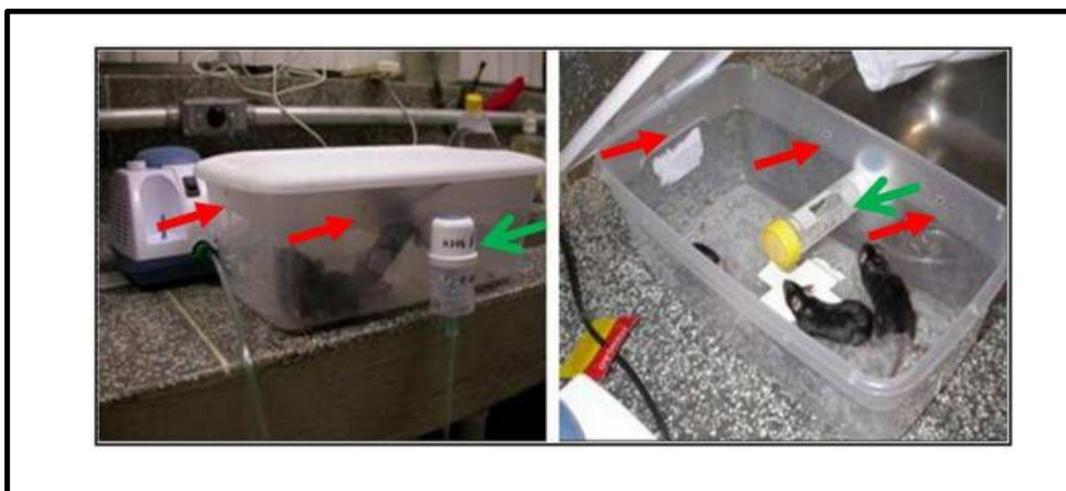


FIGURA 9 – TRATAMENTO COM M1 ATRAVÉS DE NEBULIZAÇÃO - A câmara de nebulização é um recipiente com suporte para a entrada do complexo altamente diluído nebulizador (seta verde) e orifícios circulares para a saída do ar de dentro da câmara (seta vermelha). Dessa maneira o interior da câmara fica com atmosfera saturada com os compostos nebulizados.

FONTE: GUIMARÃES *et al.*, 2010.

## 5.9 DISSOCIAÇÃO E PREPARO DO TUMOR PARA CITOMETRIA DE FLUXO

Os tumores subcutâneos retirados dos camundongos foram dissociados mecanicamente por maceração. Ao final deste procedimento, o material resultante foi submetido à filtração com filtros de poros de 100 $\mu$ m<sup>2</sup> (BD Filcon™). Com as soluções de células prontas, foi realizada a contagem celular, sendo então diluídas numa concentração de 10<sup>6</sup> células/ml. As

amostras foram congeladas e armazenadas a -20°C em PBS com 10% de DMSO.

Com as suspensões de células processadas, foi possível realizar citometrias de fluxo seguindo o procedimento descrito anteriormente.

Para este material, as moléculas avaliadas foram: PCNA, utilizando o anticorpo IgG anti-PCNA, produzido em coelho (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dalas, Texas, EUA) e p53, utilizando anticorpo IgG anti-P53 produzido em coelho 5 µg/ml, sendo ambos revelados com anticorpo secundário anti-IgG de coelho, produzido em cabra, na diluição de 5 mg/ml. Ácido hialurônico e COX-2, seguiram protocolos semelhante ao discutido anteriormente, com exceção que aqui foi realizado em suspensão celular, pela incubação por 1 hora.

## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Com o propósito de verificar se M1 pode agir diretamente nas células tumorais, o primeiro passo foi avaliar a secreção de citocinas. Vale ressaltar que estas são polipeptídios ou glicoproteínas extracelulares hidrossolúveis, que são produzidos em maior quantidade pelas células imunológicas, mas não é exclusivo deste tipo celular. Segundo Dunlop e Campbell (2000), provavelmente todas as células humanas produzem através de vias de secreção, inclusive células tumorais (GALDEANO *et al.*, 1998).

Assim, quando as células B16F10 foram tratadas por 96 h com M1, não mostraram alteração na secreção das citocinas avaliadas, conforme ilustrado na Figura 10.

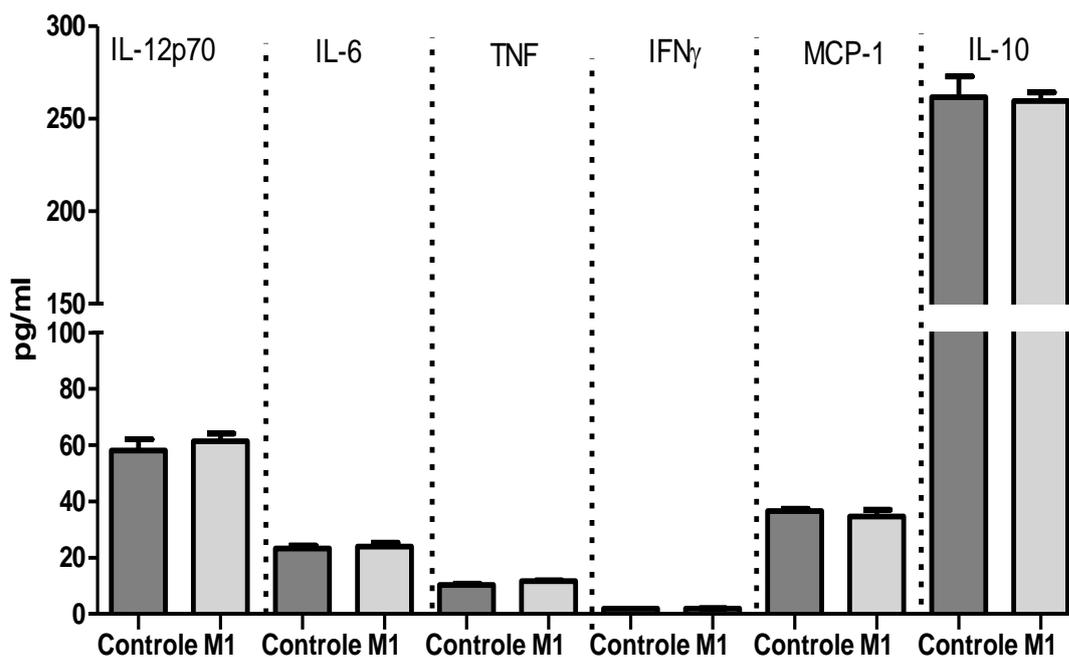


FIGURA 10. AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO DE CITOCINAS PELAS CÉLULAS B16F10 TRATADAS OU NÃO COM M1. As células foram plaqueadas em placas de multipoços e após 24 horas em cultura foram expostas ao M1 ou ao veículo (Controle) por 96 horas. A seguir, o meio foi coletado e submetido ao ensaio para detecção de citocinas, utilizando kit CBA, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os resultados estão expressos em pg/ml de cada citocina.

Os resultados mostram claramente que o tratamento com M1 não apresenta diferença na quantidade de citocinas avaliadas. No entanto, vale esclarecer que estas foram as citocinas presentes no Kit. Assim, não é possível afirmar que M1 não altera a secreção de outras citocinas, como IL-8, por exemplo, que não está disponível neste kit. Outra possibilidade para investigação das citocinas ausentes no Kit é desenhar primers, o que possibilita a investigação da expressão dos genes relacionados com a produção desta citocina.

Além do exposto acima, uma via interessante de investigação é realizar a co-cultura de células tumorais de melanoma murino B16F10 e macrófagos, o que estimularia a produção de citocinas por ambas os tipos celulares, sendo possível investigar *in vitro* uma possível reação interação que ocorre no organismo.

## 6.1 QUANTIFICAÇÃO DE NFκB

O próximo passo foi avaliar se o tratamento poderia alterar a quantidade de NFκB, um fator nuclear (NF) de transcrição que dentre muitas funções celulares está intimamente envolvido com oncogênese, sendo estimulado por múltiplas vias. Além disto, sua sinalização tem um papel fundamental na inflamação associada a tumor.

Para avaliar se esta importante molécula de sinalização celular é alterada pelo tratamento com M1, as células tumorais foram avaliadas utilizando imunomarcção para NFκB, através da subunidade p65, e analisadas em citometria de fluxo, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os resultados estão expressos na Figura 11, onde pode-se observar que não há alteração na quantidade de NFκB.

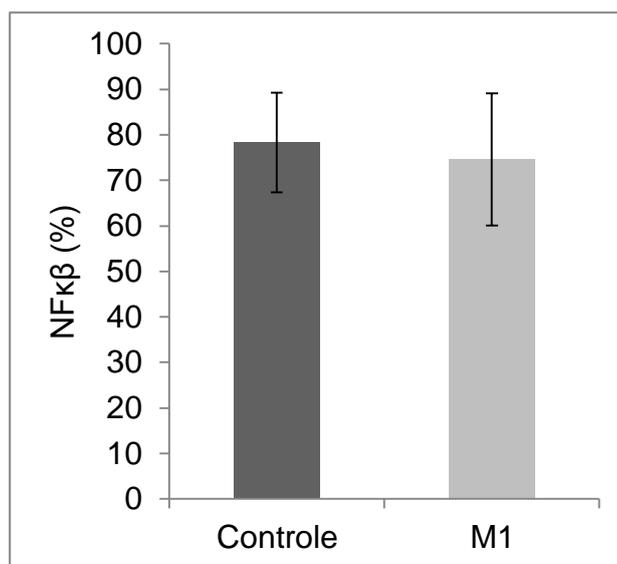


FIGURA 11. QUANTIFICAÇÃO DA MOLÉCULA NFκB PRESENTES NAS CÉLULAS B16F10 TRATADAS OU NÃO COM M1. As células foram plaqueadas em multipoços e após 24 horas em cultura foram expostas ao M1 ou ao veículo (Controle) por 96 horas. Após o tratamento as células foram marcadas para identificação do NFκB por quantificação através de citometria conforme descrito em Materiais e Métodos.

Apesar de não ter diferença no grupo tratado, quando comparado ao controle, vale ressaltar que esta molécula encontra-se inativa no citoplasma, portanto, para confirmar que NFκB pode ou não ter sido alterado pelo tratamento será necessário realizar a imunomarcção, com sua subsequente avaliação da localização celular em microscopia.

Além do exposto acima, o NFkB é um fator de transcrição nuclear que pode apresentar muitas variações, havendo assim diversos tipos de NFkB. Desta forma, não se deve descartar a possibilidade de que o M1 possa causar alterações em outras variedades de NFkB que não foram analisadas aqui. Outro passo importante para as investigações é detectar qual o NFkB mais recorrente na linhagem de melanoma murino B16F10.

Por fim, este conjunto de dados não esclarece o porquê o tratamento com M1 pode levar à redução da formação de nódulos tumorais, bem como da massa tumoral observados nos modelos de metástase pulmonar ou no tumor subcutâneo, respectivamente. Por outro lado, vale lembrar que nestes modelos há todo um microambiente ao redor que pode contribuir para a ação do M1. Face ao exposto, o próximo passo foi investigar se o tratamento pode levar à alteração de expressão de moléculas de inflamação diretamente no tumor, através da avaliação de marcadores específicos no corte histológico de pulmão contendo nódulos tumorais, provenientes de animais portadores de melanoma, bem como de massa tumoral, proveniente do modelo subcutâneo.

## 6.2 AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES EM MARCADORES INFLAMATÓRIOS

A partir dos cortes histológicos citados anteriormente, realizou-se a avaliação das seguintes moléculas: COX-2, carboidrato neutros e do ácido hialurônico.

### 6.3 COX-2

Inicialmente visou-se avaliar a presença de um marcador inflamatório nos tumores. Sabendo-se que a COX-2 é expressa em resposta a estímulos inflamatórios e tem papel no desenvolvimento e progressão de tumores epiteliais malignos Graneiro *et al.*, (2008); Boland *et al.*, (2004), ela foi escolhida como marcador para essa investigação.

Buscando saber se o tratamento com M1 poderia alterar a expressão da COX-2 nas células do ambiente tumoral, cortes obtidos a partir de nódulos tumorais pulmonares e massa tumoral desenvolvida em tecido subcutâneo

foram incubados com anticorpo anti-COX-2 e sua presença foi revelada pela reação de peroxidase e DAB.

Ao analisar qualitativamente a expressão de COX-2 no corte histológico de pulmão (conforme ilustrado na Figura 12), constatou-se que há uma grande diferença do padrão de marcação do grupo tratado com M1, quando comparado com seu controle (não tratado). O próximo passo foi investigar se o mesmo pode acontecer no tumor sólido (conforme ilustrado na imagem 13).

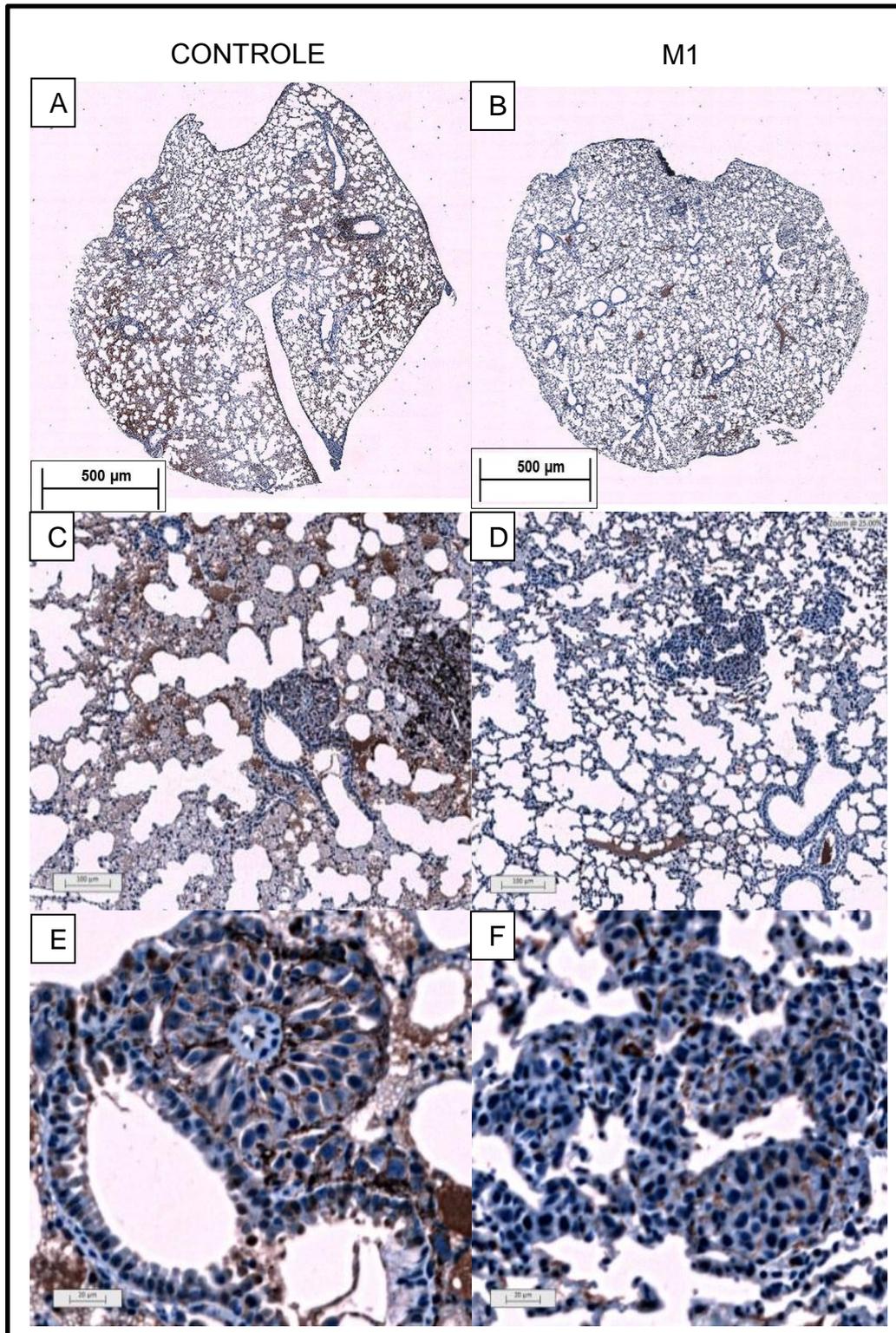


FIGURA 12. IMUNOMARCAÇÃO DE COX-2 PRESENTE EM TUMOR PULMONAR TRATADO OU NÃO COM M1. Imagens obtidas em microscopia de campo claro, utilizando scanner de lâminas histológicas Vslide (Metasystem em parceria com a Carl Zeiss). A, C e E – Controle; B, D e F – Tratado com M1. Os cortes histológicos de pulmão foram incubados com anticorpo anti-COX2 e sua presença foi revelada pela reação de peroxidase e DAB. A marcação positiva é observada em castanho/marrom. As lâminas foram contracoloradas com Hematoxilina (azul). Observe que há uma menor marcação no grupo Tratado (B, D e F) o que é evidente na imagem F.

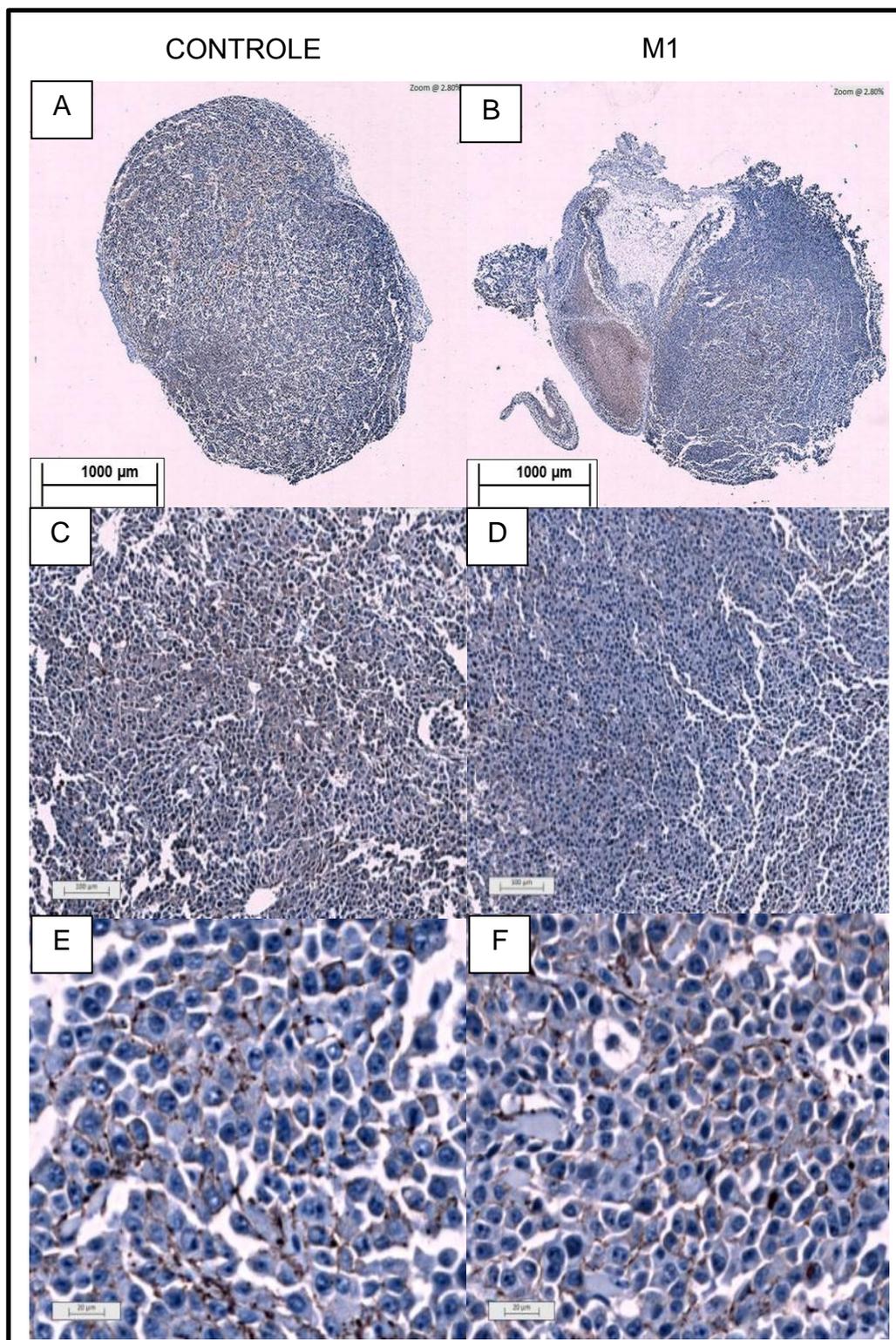


FIGURA 13. IMUNOMARCAÇÃO DE COX-2 PRESENTE EM TUMOR SUBCUTÂNEO TRATADOS OU NÃO COM M1. Imagens obtidas em microscopia de campo claro, utilizando scanner de lâminas histológicas Vslide (Metasystem em parceria com a Carl Zeiss). A, C e E – Controle; B, D e F – Tratado com M1. Os cortes histológicos de tumor sólido foram incubados com anticorpo anti-COX2 e sua presença foi revelada pela reação de peroxidase e DAB. A marcação positiva é observada em castanho/marrom. As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina (azul). As imagens sugerem uma menor marcação no grupo Tratado (B, D e F) o que é mais evidente na imagem F.

Através das imagens é possível concluir que no tumor pulmonar a COX-2 está menos expressa no grupo tratado com M1, porém o mesmo não é tão evidente no tumor subcutâneo. A quantificação relativa dos campos aleatórios confirma esta diferença observada, mostrando que M1 leva a uma diminuição da expressão da enzima COX-2.

Outro possível passo para investigação da COX-2 é a realização de um Western-Blot para esta molécula.

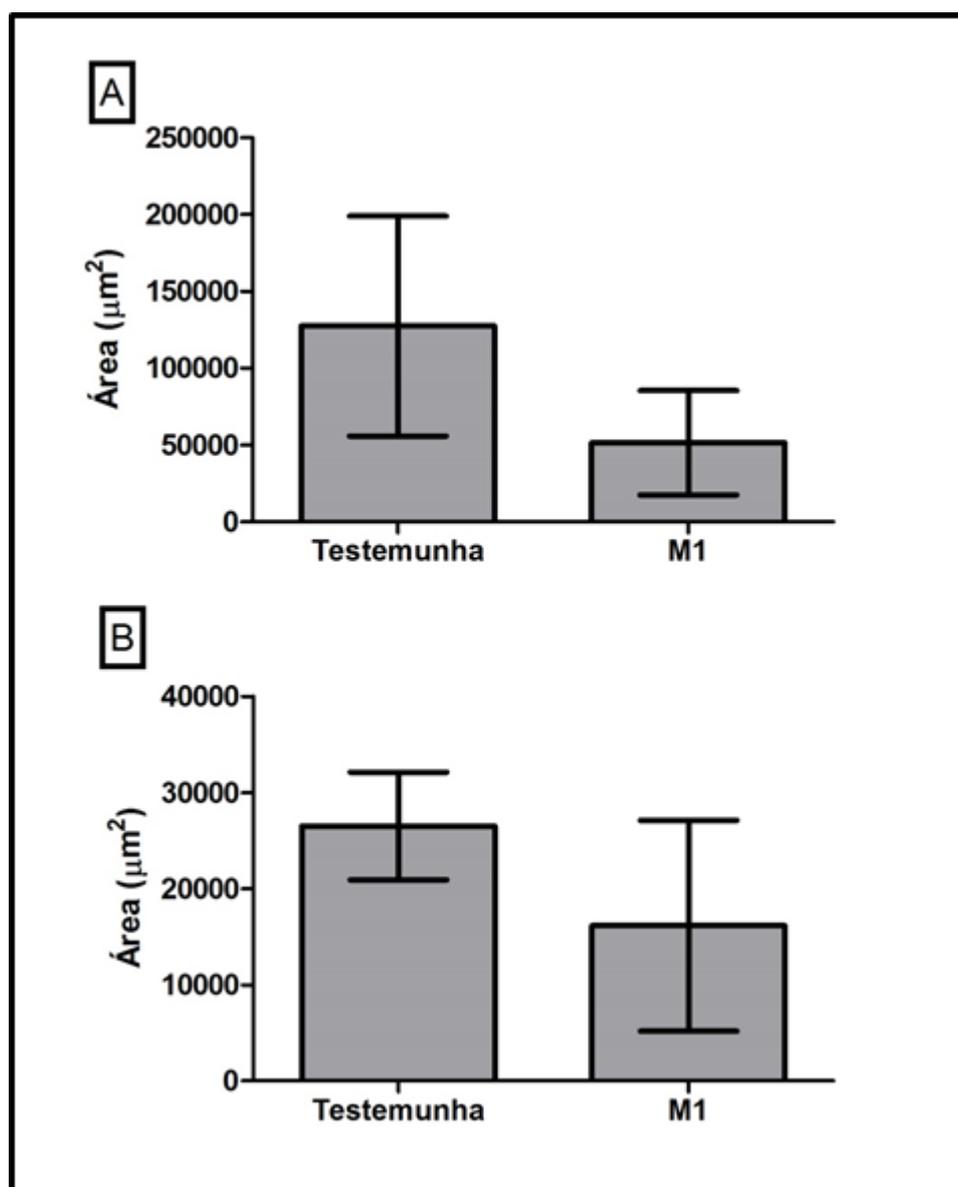


FIGURA 14. QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO DE COX-2 ATRAVÉS DA CONTAGEM DA ÁREA DE PIXELS MARCADOS COM DAB EM LÂMINAS DE MELANOMA TRATADO OU NÃO COM M1. Quantificação da marcação positiva em cortes histológicos de pulmão (A) ou tumor sólido (B). Através da marcação de COX-2 reveladas com DAB foi realizada quantificação da área dos cortes referentes à marcação obtida pela reação peroxidase e DAB. Devido a diferença de cores do tumor e da marcação, foi possível quantificar a área dos pixels referentes a marcação com DAB.

Segundo os dados do nosso grupo de pesquisa, sabe-se que o M1 tem atuação sistêmica (OLIVEIRA *et al.*, 2011; GUIMARÃES, 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2010; ANDRADE, 2011). Assim acredita-se que, a diferente atuação do M1 observada nos dois modelos tumorais, ocorre devido as diferenças intrínsecas encontradas nestes ambientes.

Ao injetar células tumorais de melanoma murino B16F10 no tecido subcutâneo, ocorre o desenvolvimento de uma massa tumoral. Neste local há infiltrado leucocitário e formação de novos vasos, bem como a interação com o organismo, porém não no mesmo nível de um tumor desenvolvido em um órgão, o qual ocorre interação constante com o sistema imunológico.

Por outro lado, no modelo de metástase pulmonar há a formação de nódulos tumorais em um órgão já existente, o pulmão. Este órgão já estabelecido apresenta-se altamente adaptado a uma grande interação com diversos outros sistemas, inclusive o imunológico. É possível que, devido a estes diferentes graus de interação, o M1 atue mais efetivamente no ambiente pulmonar do que no ambiente subcutâneo.

Segundo a literatura, a maior expressão da COX-2 indica maior ação inflamatória local, nesse aspecto o M1 atuou diminuindo a expressão dessa molécula, o que possivelmente auxilie na redução inflamatória e dificulte a proliferação tumoral.

#### 6.4 AVALIAÇÃO DE CARBOIDRATOS NEUTROS

Nosso próximo passo foi avaliar se a diferença observada na expressão de COX-2 tem relação com modificações de carboidratos.

Sabe-se que células tumorais apresentam em sua superfície celular e matriz extracelular diferentes padrões de carboidratos expressos e, que a remodelagem da expressão destas moléculas também está envolvida em respostas inflamatórias (MEIROVITZ *et al.*, 2013). Assim é de grande valia verificar se ocorrem possíveis alterações nestas moléculas quando tratadas com o M1.

Cortes de tumores desenvolvidos em ambos os ambientes, pulmonar e subcutâneo, foram submetidos à coloração com PAS. O ácido periódico

utilizado reage com carboidratos neutros, provocando uma quebra em sua estrutura. Nestas regiões interage o reativo de Schiff, deixando uma coloração rósea.

Com os resultados obtidos não é possível concluir se M1 não causa alterações na distribuição e expressão destas moléculas, como mostrado nas figuras 15 e 16.

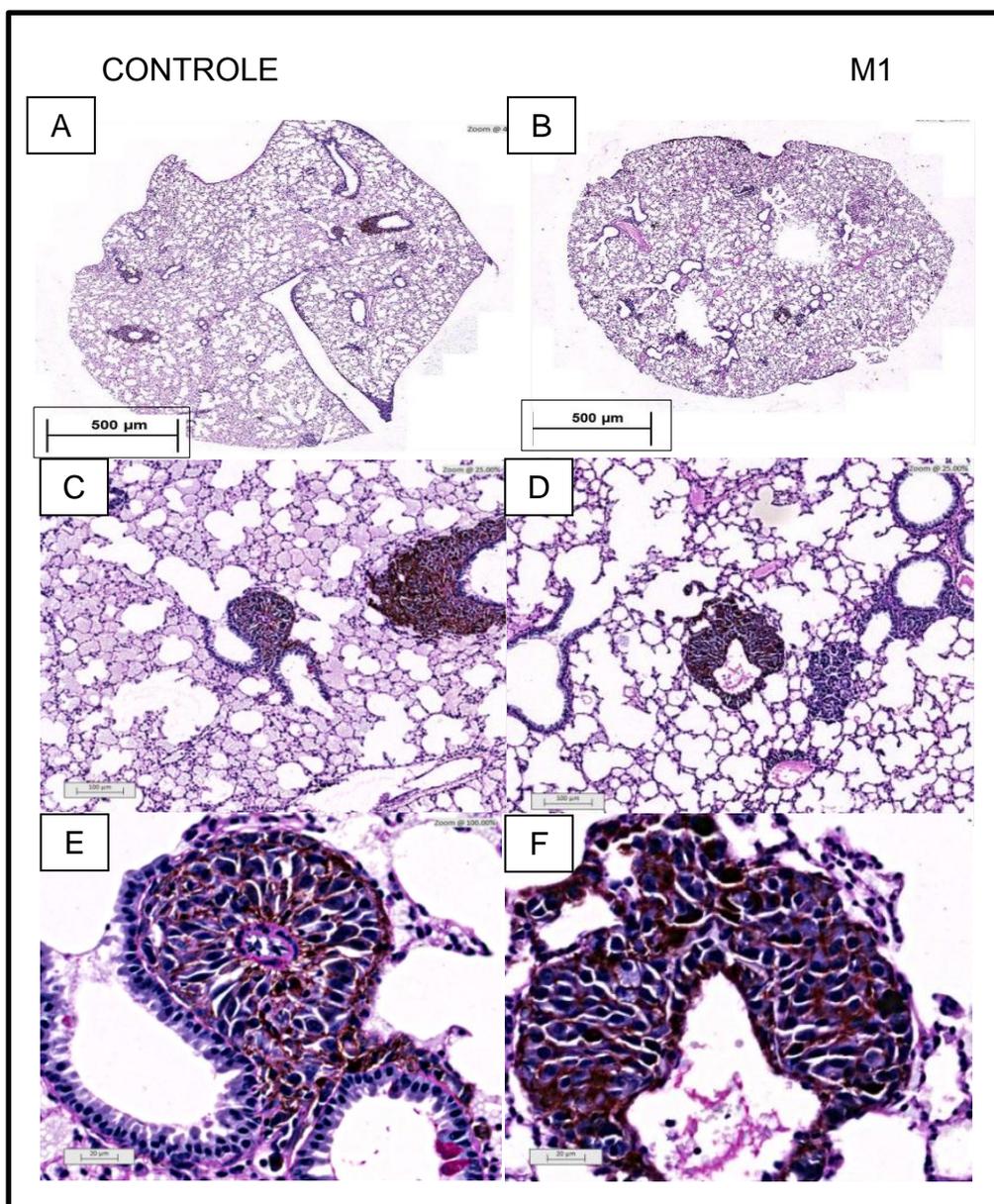


FIGURA 15. COLORAÇÃO PAS REALIZADA EM TUMOR PULMONAR TRATADOS OU NÃO COM M1. Imagens obtidas em microscopia de campo claro, utilizando scanner de lâminas histológicas Vslide (Metasystem em parceria com a Carl Zeiss). A, C e E – Controle; B, D e F – Tratado com M1. Os cortes histológicos de pulmão foram processados para coloração de PAS, como descrito em Materiais e Métodos. A marcação dos carboidratos neutros é evidenciada em róseo. Não é evidente uma diferença visual, quando comparada ao grupo tratado com o controle.

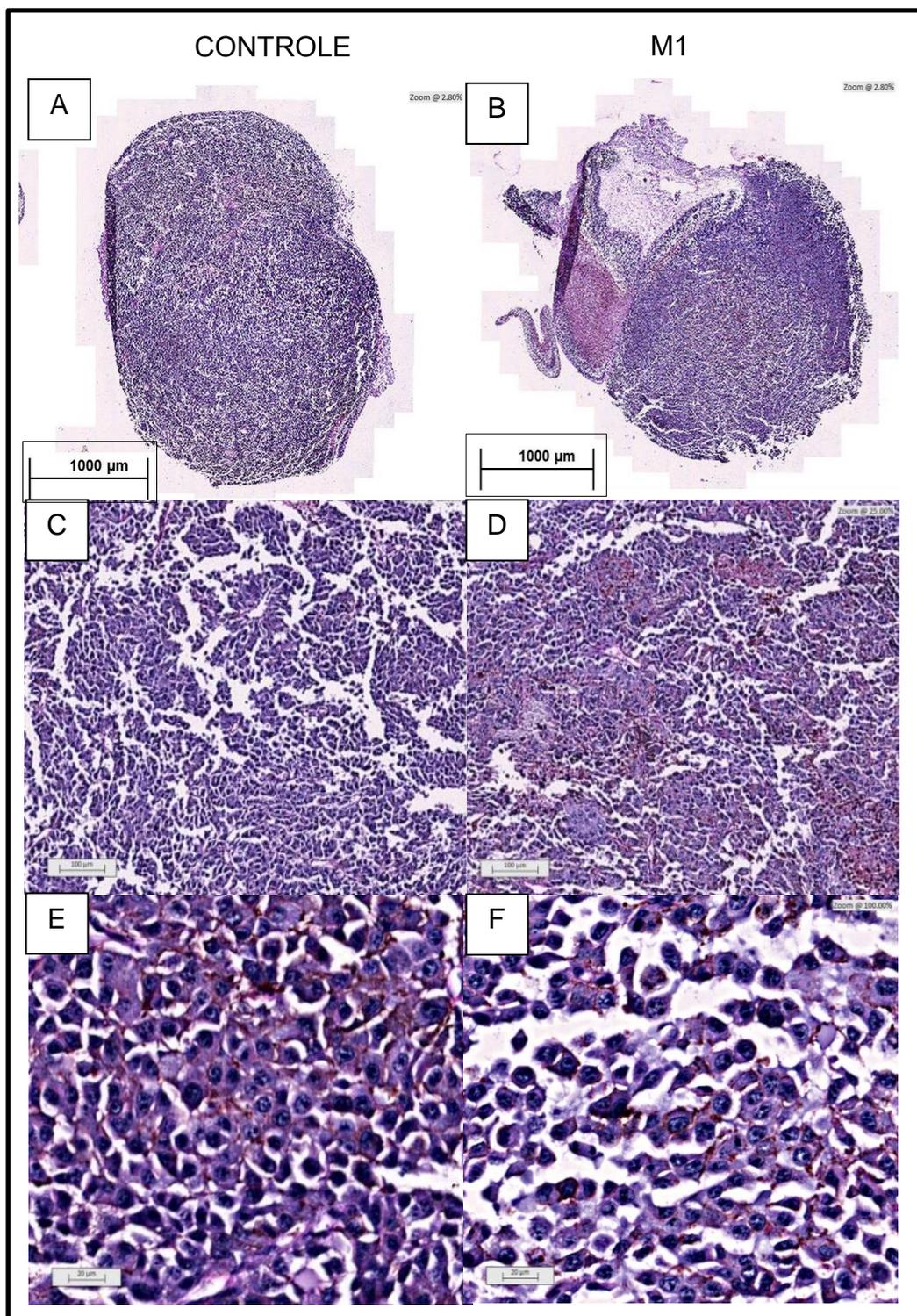


FIGURA 16. COLORAÇÃO PAS REALIZADA EM TUMOR SUBCUTÂNEO TRATADOS OU NÃO COM M1. Imagens obtidas em microscopia de campo claro, utilizando scanner de lâminas histológicas Vslide (Metasystem em parceria com a Carl Zeiss). A, C e E – Controle; B, D e F – Tratado com M1. Os cortes histológicos de tumor subcutâneo foram processados para coloração de PAS, como descrito em Materiais e Métodos. A marcação dos carboidratos neutros é evidenciada em róseo. Não é evidente uma diferença visual, quando comparada ao grupo tratado com o controle.

Aparentemente, é possível concluir que não ocorreu alteração nos carboidratos neutros ao comparar o grupo tratado com M1 com o controle, em ambos os ambientes tumorais.

Com os dados apresentados, tanto no modelo de metástase tumoral, quanto no tumor subcutâneo, não é possível concluir que houve alteração de carboidratos neutros entre os tratamentos. Para ter uma melhor compreensão de possíveis alterações em carboidratos de células tumorais é preciso realizar novas investigações, nas quais sejam realizadas análises quantitativas somente da coloração da reação de PAS, sem que tenha contracoloração, o que dificulta a separação de cores e sua quantificação por softwares como o ImageJ (NIH).

Segundo a literatura, sabe-se da importante ação de carboidratos ácidos nos processos inflamatórios, portanto, mesmo aparentemente não havendo diferenças na distribuição de carboidratos neutros ao realizar o tratamento com M1, nosso próximo passo foi investigar se o M1 poderia alterar a expressão destas moléculas.

## 6.5 Ácido Hialurônico

Para investigar a atuação do M1 sobre carboidratos ácidos, foi realizada a identificação de ácido hialurônico, que está intimamente relacionada com a ocorrência de processos inflamatórios no microambiente tumoral. De acordo com a presença de ácido hialurônico de diferentes pesos moleculares, os tumores são estimulados a proliferarem.

Cortes de ambas as origens foram marcados com um “probe” para detecção histoquímica do ácido hialurônico, como descrito em Materiais e Métodos. Após a reação, é possível verificar diferenças na distribuição e na quantidade de ácido hialurônico presente nos diferentes grupos de tratamento, tanto no tumor pulmonar, quanto no subcutâneo. As figuras 17 e 18 ilustram as imagens obtidas desta marcação.

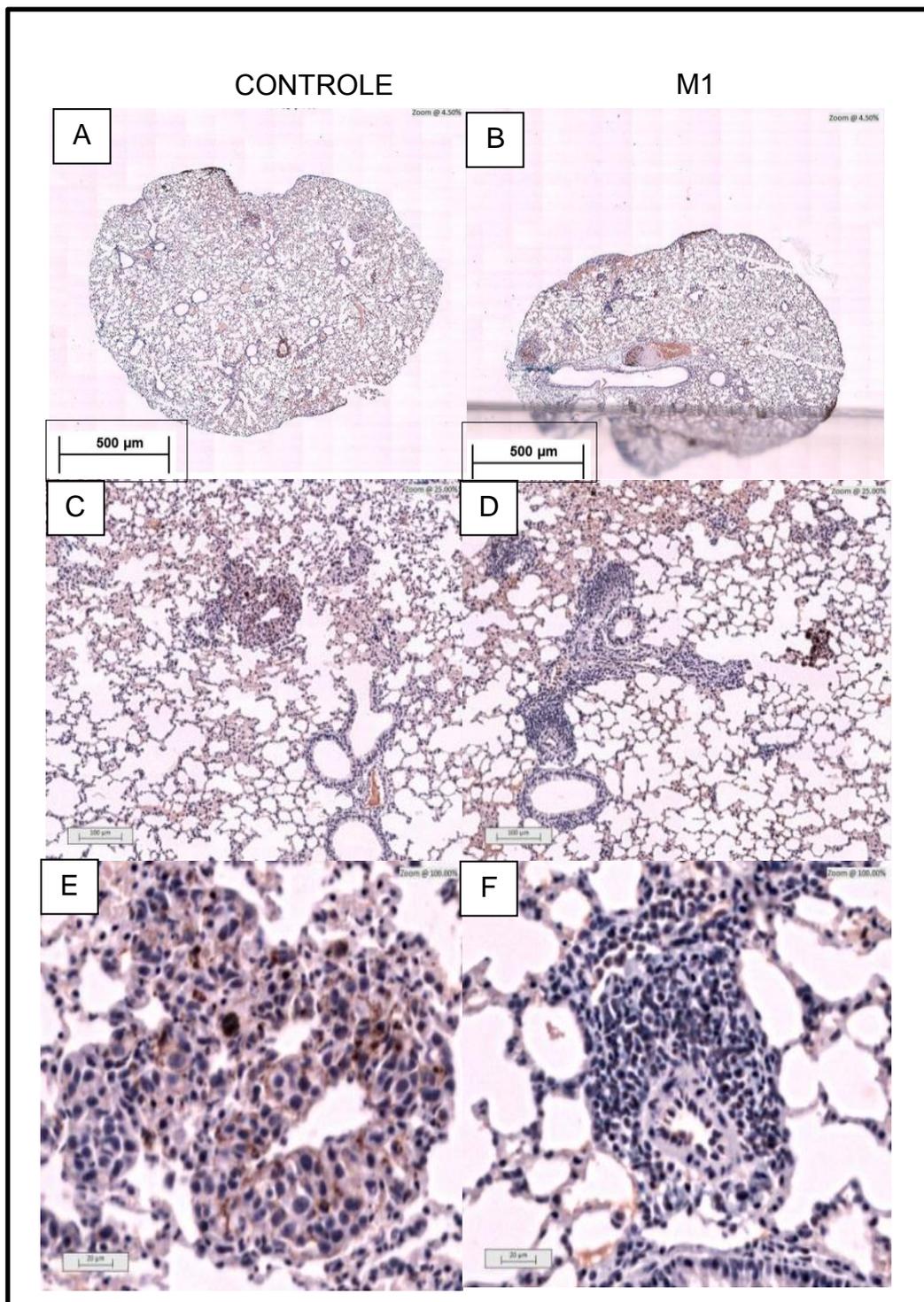


FIGURA 17. DETECÇÃO HISTOQUÍMICA DE ÁCIDO HIALURÔNICO EM TUMOR PULMONAR TRATADOS OU NÃO COM M1. Imagens obtidas em microscopia de campo claro, utilizando scanner de lâminas histológicas Vslide (Metasystem em parceria com a Carl Zeiss). A, C e E – Controle; B, D e F – Tratado com M1. Os cortes histológicos de tumor pulmonar foram submetidos à detecção de ácido hialurônico, utilizando probe biotilado, com revelação utilizando estreptavidina peroxidase e posterior reação com DAB, como descrito em Materiais e Métodos. A marcação é evidenciada em castanho/marrom. Observe que a amostra tratada com M1 mostra uma diminuição da marcação de ácido hialurônico, quando comparada com o controle (A, C e E).

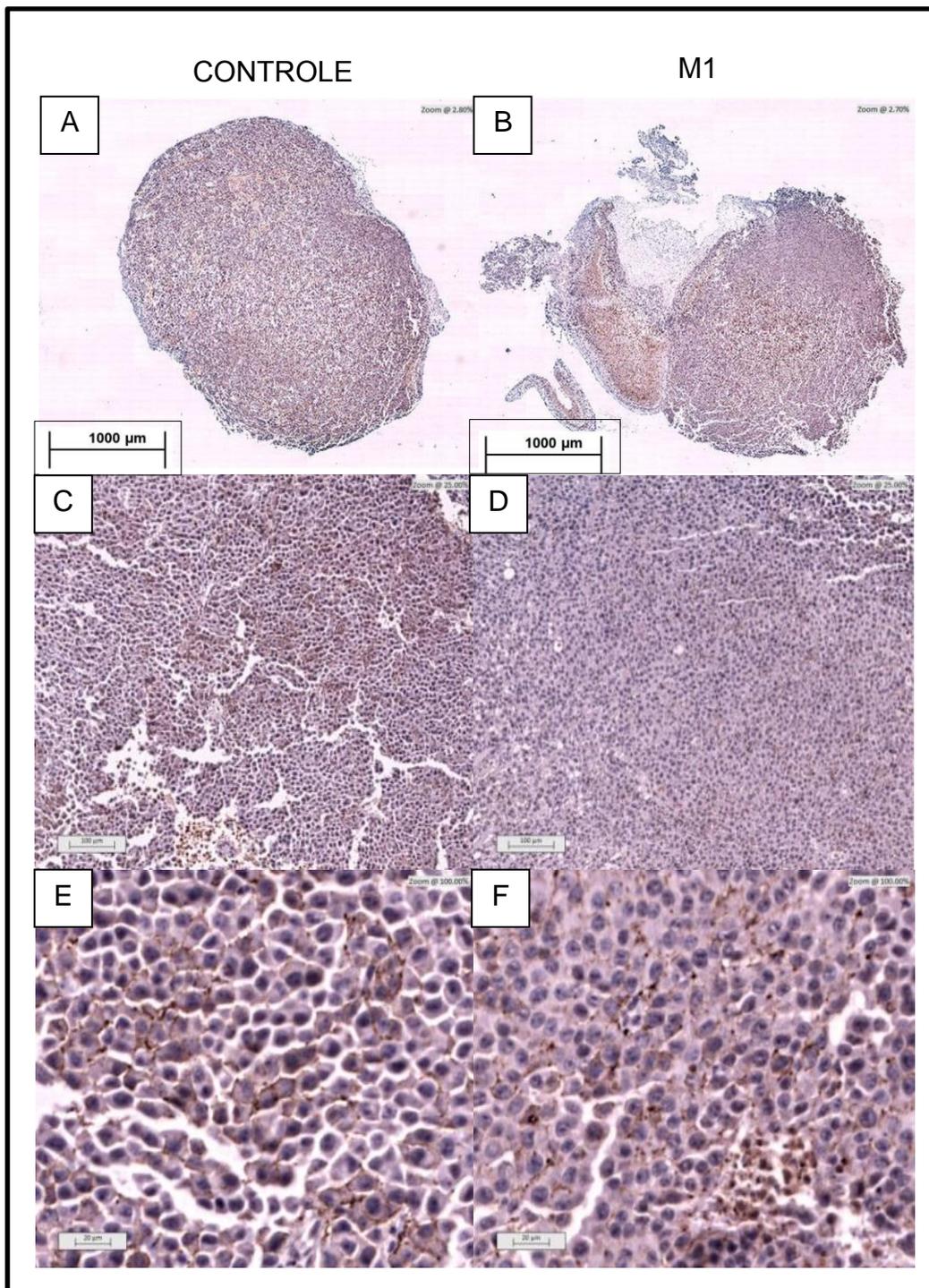


FIGURA 18. DETECÇÃO HISTOQUÍMICA DE ÁCIDO HIALURÔNICO EM TUMOR SUBCUTÂNEO TRATADOS OU NÃO COM M1. Imagens obtidas em microscopia de campo claro, utilizando scanner de lâminas histológicas Vslide (Metasystem em parceria com a Carl Zeiss). A, C e E – Controle; B, D e F – Tratado com M1. Os cortes histológicos de tumor subcutâneo foram submetidos à detecção de ácido hialurônico, utilizando probe biotilado, com revelação utilizando estreptavidina peroxidase e posterior reação com DAB, como descrito em Materiais e Métodos. A marcação é evidenciada em castanho/marrom. Observe que a amostra tratada com M1 mostra uma diminuição da marcação de ácido hialurônico, quando comparada com o controle (A, C e E).

Avaliando qualitativamente é clara a diferença na distribuição e quantidade de ácido hialurônico entre os grupos tratados com M1 e seus respectivos controles em ambos os ambientes tumorais. No grupo controle, o ácido hialurônico apresenta-se homogeneamente distribuído sobre as células (membrana ou citoplasmática – neste modelo não é possível diferenciar, pois como são cortes, o que é visto pode ser tanto superficial quanto citoplasmático) e em quantidade mais acentuada quando comparado com o grupo tratado com M1. Já neste grupo, a quantidade de ácido hialurônico é reduzida e sua localização é praticamente localizada na região pericelular, sugerindo somente na matriz extracelular.

Visando ter uma estimativa voltada para o aspecto quantitativo, foi quantificado cinco áreas aleatórias de dois cortes de cada grupo, e avaliado o somatório das áreas referente à quantidade de pixels marcados com DAB. A seguir foi calculada a média de todas as áreas quantificadas de cada grupo experimental para estas áreas obtidas. Essa estratégia foi realizada, devido a dificuldade em quantificar o DAB, tendo em vista que é uma reação enzimática, muito autores não acreditam que este seja um bom marcador utilizado para análises qualitativas, visto que sua diferença de intensidade, pode não ser referente a maior ou menor marcação.

Vale ressaltar que neste trabalho os cortes histológicos dos dois grupos foram submetidos às reações apresentadas, na mesma lâmina histológica. Isto é, uma mesma lâmina continha diferentes cortes dos grupos M1 ou controle. Assim, o tempo de reação foi o mesmo para todos os cortes, o que diminuiria esta crítica. Como o scanner de lâminas coleta diferentes imagens ao longo de um corte histológico e, ao final, faz a “costura” das imagens apresentando o corte como um todo, o ideal seria fazer a quantificação da marcação de todo o corte. No entanto, os programas disponíveis no Setor, não conseguem ler a imagem reduzida e a imagem no tamanho correto é muito grande, também impossibilitando a leitura. Há softwares específicos para quantificação de imagens obtidas deste equipamento, mas é um opcional que ainda não está presente. Assim objetivou-se concluir se há diferença de marcação entre o grupo tratado com M1 e seu controle no tumor subcutâneo, como ilustrado na figura 19.

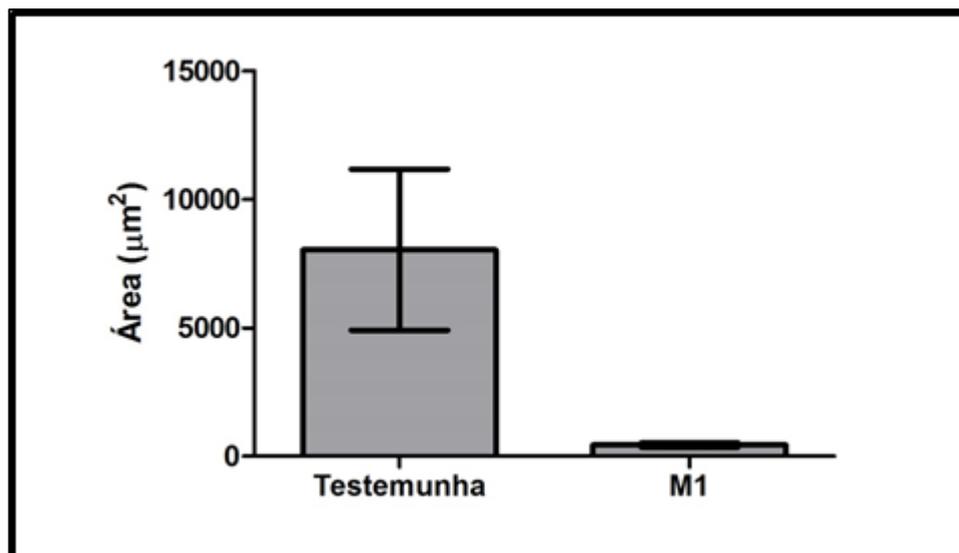


FIGURA 19. QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO ATRAVÉS DA CONTAGEM DA ÁREA DE PIXELS MARCADOS COM DAB EM LÂMINAS DE TUMOR SUBCUTÂNEO TRATADOS OU NÃO COM M1. Através das lâminas de ácido hialurônico reveladas com DAB foi realizada quantificação da área dos cortes referentes à marcação obtida pela reação peroxidase e DAB. Devido a diferença de cores do tumor e da marcação, foi possível quantificar a área dos pixels referentes a marcação com DAB.

Face ao exposto acima, com os dados obtidos pode-se concluir que, apesar das limitações do método, o tratamento com M1 leva à uma redução na quantidade de ácido hialurônico no tumor subcutâneo.

Assim, a partir dos dados expostos nesse tópico, pode-se constatar que o composto altamente diluído M1 altera importantes moléculas associadas com processos inflamatórios, como verificado na expressão de COX-2 e ácido hialurônico.

São necessárias mais investigações para que possa ser compreendida a atuação do M1 na modificação da expressão dessas moléculas.

## 6.6 AÇÃO DO M1 SOBRE MELANOMA ESTABELECIDO

Devido ao alto grau de malignidade e a alta eficiência metastática do melanoma, é preciso que o combate a esta doença seja iniciado tão logo seja detectado no organismo.

Diversos tratamentos convencionais são utilizados no combate ao câncer, porém a grande maioria deles gera graves perdas (efeitos colaterais) ao organismo como um todo. Assim, a descoberta de novas terapias

alternativas e complementares é cada vez mais explorada, visto que estas podem auxiliar na minimização dos danos gerados pelos tratamentos convencionais ou mesmo atuar diretamente como um tratamento.

Dados prévios do nosso grupo de pesquisa apontam fortemente que o M1 pode ter atuação como tratamento (GUIMARÃES, 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2010; ANDRADE, 2011). No entanto, todos os tratamentos foram realizados no dia posterior à inoculação das células tumorais, tratamento que é corrente na literatura científica. Porém, infelizmente, não é desta forma que ocorre em pacientes. Nestes um determinado tratamento só é aplicado após ter sido diagnosticado.

Assim, parte do objetivo deste trabalho foi verificar se o M1 pode atuar em tumores já estabelecidos, simulando a dinâmica real de um tratamento, o que é de grande importância clínica, visto que isto amplia ainda mais o potencial do M1 como um tratamento.

Desta forma, o tratamento com M1 iniciou após os tumores terem adquirido o volume de 300mm<sup>3</sup>, sendo realizado uma vez ao dia. Para que fosse possível avaliar a ação do M1 no crescimento tumoral dois grupos experimentais foram realizados: O grupo Controle, composto por cinco camundongos machos que não receberam o tratamento, e o grupo M1, composto também por cinco camundongos machos, os quais receberam o tratamento com M1.

Células B16F10 foram injetadas no tecido subcutâneo de camundongos C57Bl/6 e aguardou-se o desenvolvimento tumoral nesta área. Diariamente foram realizadas medições para detecção do volume tumoral, e quando os tumores atingiram o volume desejado, iniciou-se o tratamento com M1, o qual durou por sete dias. Durante este período a medição tumoral foi realizada diariamente. Através dos dados de medições obtidos realizou-se uma análise pareada e a determinação do quanto o volume do tumor havia aumentado com relação ao início do tratamento, como ilustrado na figura 20.

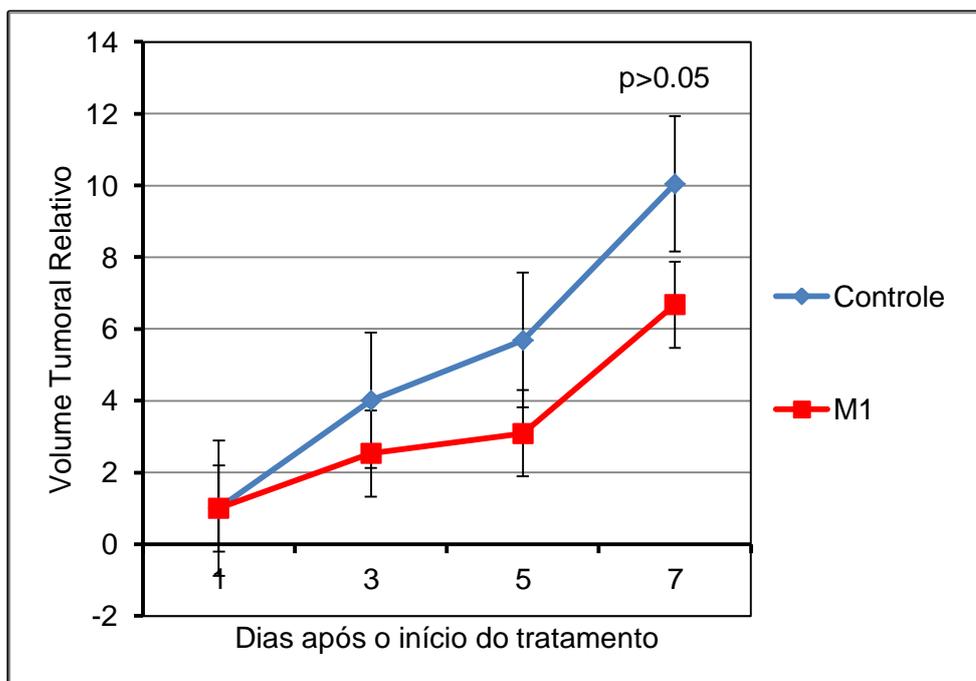


FIGURA 20. O TRATAMENTO COM M1 LEVA A UMA REDUÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL . Após o tumor subcutâneo ter atingido 300mm<sup>3</sup>, foi iniciado o tratamento com M1 e foi continuado a medições diárias com o auxílio de um paquímetro, pelo período de sete dias. Após, foi realizada uma análise pareada dos dados obtidos e os mesmos foram relacionados com o início do tratamento. O gráfico apresenta em seu eixo y o volume tumoral relativo ao início do tratamento, e a escala é referente ao aumento do volume tumoral com relação ao primeiro dia, assim, por exemplo, o dois na escala indica um volume referente a duas vezes o volume do início do tratamento.

Com os dados obtidos, representado no gráfico da figura 20, pode-se concluir que no modelo do tumor estabelecido, o M1 também atua diminuindo o crescimento tumoral, assim como descrito nos outros modelos testado por Guimarães (2009) e Andrade (2011).

Este é um importante indicativo do grande potencial antimelanoma do complexo natural altamente diluído M1. É significativa a sua ação no tumor pré-estabelecido, sendo inédita a avaliação neste modelo.

Através deste resultado, é importante a continuação das investigações, visando compreender como o M1 pode estar atuando nesta redução, mesmo no tumor pré-estabelecido.

## 6.7 AVALIAÇÃO DE MOLÉCULAS RELACIONADAS AO CRESCIMENTO TUMORAL E A INFLAMAÇÃO EM CÉLULAS OBTIDAS DA DISSOCIAÇÃO TUMORAL

Baseado no crescimento observado no modelo *in vivo*, nosso próximo passo foi avaliar moléculas importantes na proliferação celular, as quais poderiam confirmar a redução proliferativa observado no ensaio de crescimento tumoral *in vivo*. Assim, os tumores foram retirados dos animais e dissociados, obtendo-se células em suspensão. Com esse material foram realizadas citometrias de fluxo para marcação de PCNA e de P53, realizando-se incubações com os anticorpos específicos para detecção destas moléculas, como descrito em Materiais e Métodos.

A figura 21 ilustra a quantificação destas moléculas ao serem avaliadas sua presença em citometria de fluxo.

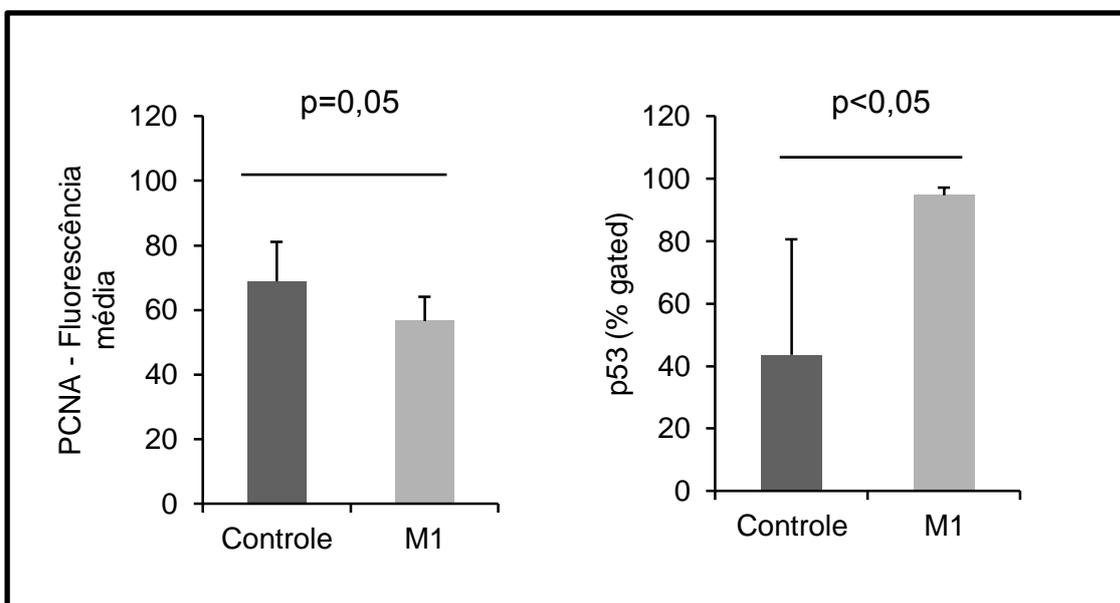


FIGURA 21. O TRATAMENTO COM M1 REDUZIU PCNA E AUMENTOU P53.

A FIGURA ilustra as diferenças entre os grupos experimentais. (a) através da média de fluorescência detectou-se maior expressão de PCNA no controle. (b) no citômetro foi criado um gated selecionando uma população de células, e dentro dele foi verificada a percentagem de p53 presente, sendo que a maior detecção foi verificada no grupo M1.

Como apresentado no gráfico da figura 21, a molécula PCNA, importante marcador de proliferação celular, é expressa em maior quantidade no grupo controle, o que é compatibilidade com o observado no modelo *in vivo*, onde este grupo apresentou maior crescimento tumoral.

Além deste marcador, outro avaliado foi a proteína p53, devido a sua relação aos processos de apoptose celular. Para sua investigação, a população de células que expressava p53 foi selecionada através de um gated, o que não foi necessário em PCNA porque a mesma está expressa em todas as células. Nesta avaliação foi detectada maior quantidade de p53 no grupo tratado com M1. A barra de erro se apresenta elevada devido ao baixo n experimental usado nos grupos.

Estes dois dados em conjunto justificam a ocorrência da diminuição do crescimento do tumoral, uma vez que M1 pode estar levando a uma menor proliferação e aumento da taxa de morte celular por apoptose.

Nosso próximo passo foi avaliar se a redução detectada na proliferação celular destes tumores poderia estar relacionada aos processos inflamatórios, assim como foi verificado anteriormente nos outros modelos.

Assim, COX-2 e ácido hialurônico, os marcadores inflamatórios utilizados anteriormente, foram avaliados em células dissociadas do tumor. Os resultados estão apresentados na figura 22.

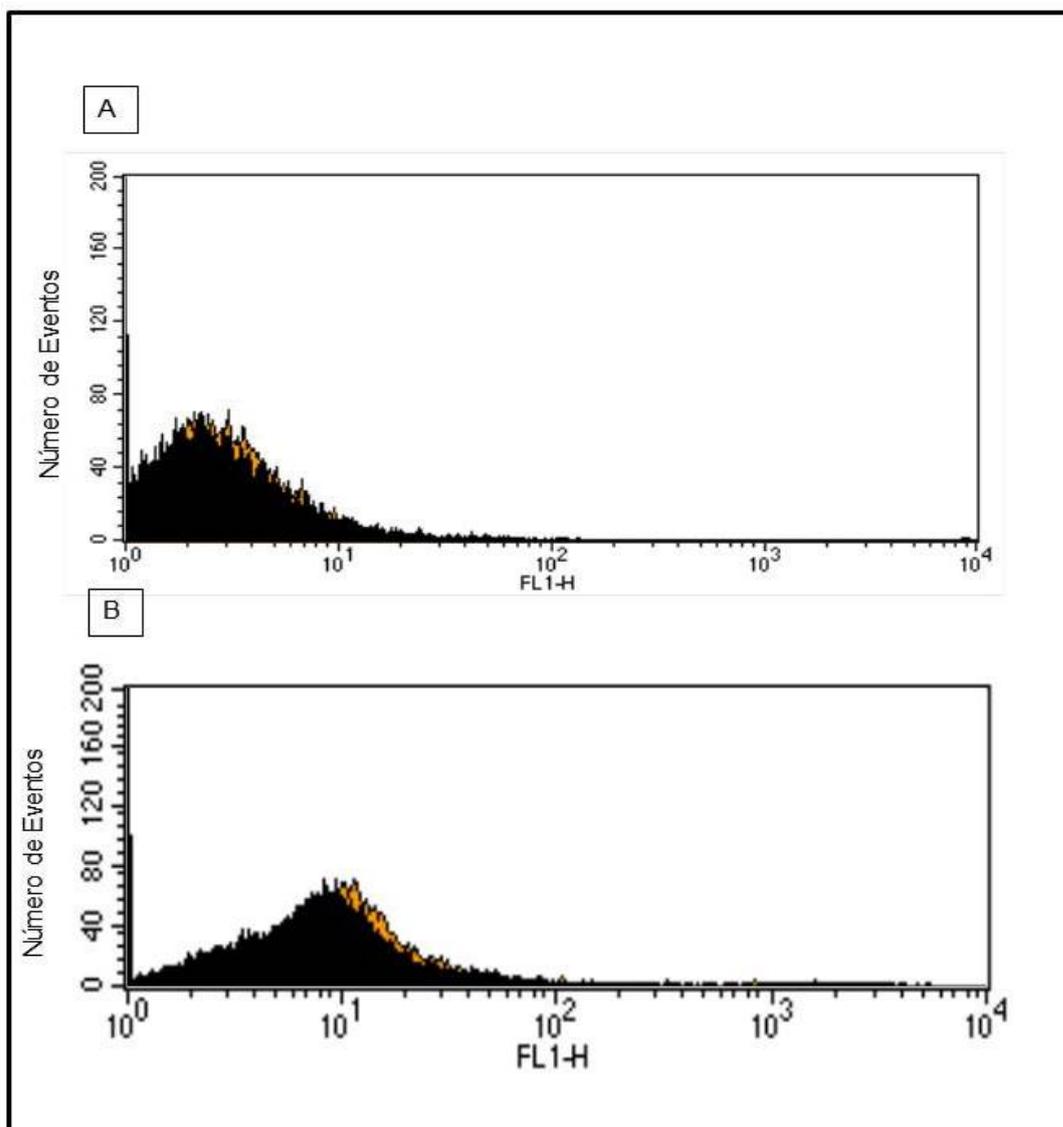


FIGURA 22. O TRATAMENTO COM M1 NÃO ALTERA A EXPRESSÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO.

Células dissociadas do tumor subcutâneo foram processadas para citometria de fluxo e marcadas para detecção de COX-2 e ácido hialurônico. Histogramas foram adquiridos através da leitura das amostras de ambos os grupos, sendo que as amostras referente ao grupo M1 estão representadas na curva em laranja e o pico em preto o grupo controle. Observe que ocorreu diferenças na quantidade destas moléculas entre os grupos. A) Marcação para COX-2. Observe que as curvas estão na região basal (entre  $10^0$  e  $10^1$ ), B) Marcação para ácido hialurônico. É possível observar que praticamente não há diferença entre os grupos.

Pode-se observar na imagem referente ao marcador para COX-2 na figura 22A do histograma, que não ocorreu deslocamento entre os picos, sendo que ambos estão posicionados abaixo de  $10^1$ , região que é identificada como branco amostral. Este resultado deve-se ao fato de que anticorpo utilizado não reagiu nas condições experimental realizada nesta ensaio (1 hora), que foi

diferente daquele utilizada nos cortes histológicos (overnight). Deve-se destacar que os cortes histológicos há todo o processamento do material (desidratação, emblocagem, reidratação e recuperação antigênica) que pode modificar a conformação do antígeno, que pode também estar presente nas células dissociadas, mas que não tiveram este processamento e, tão pouco, foram expostas para o anticorpo pelo mesmo período de tempo. Assim a marcação não funcionou, mas não é possível dizer que não está presente. Para confirmação esta afirmação, é preciso realizar novos ensaios modificando o anticorpo utilizado, de preferência utilizando um que o fabricante assegure o funcionamento para citometria de fluxo e realizando novas análises.

Na figura 22B do histograma é ilustrada a quantificação adquirida no citômetro de fluxo referente ao marcador para ácido hialurônico. Ambos os picos estão deslocados sobre a escala de  $10^1$ , o que indica que a marcação funcionou. Porém, a posição dos picos está muito próxima, desta forma é possível concluir que o tratamento com M1 não modificou a quantidade de ácido hialurônico produzida pela célula.

É importante lembrar que o ácido hialurônico é encontrado na superfície celular e na matriz extracelular (ECM), mas a maior quantidade é, realmente, depositada na ECM.

Durante este ensaio de citometria, foi detectado o ácido hialurônico presente na superfície celular, ou ainda, alguma parte que estivesse internalizada (visto que o receptor CD44 faz este papel). Desta forma, é preciso realizar novos ensaios, obtendo-se blocos histológicos, da mesma forma que a descrita para os modelos anteriores. Assim, seria possível detectar a presença do ácido hialurônico de origem da matriz extracelular e então poder concluir se realmente não há alteração desta importante molécula associada a tumores.

## 8 CONCLUSÕES

- Os resultados mostram claramente que M1 diminui importantes marcadores do processo inflamatório;
- A diminuição dos processos inflamatórios pode ser um dos mecanismos de ação do M1 para minimizar o desenvolvimento do tumor, tanto em modelo de metástase pulmonar, quanto em tumor sólido;
- O ácido hialurônico, possui sua distribuição alterada e sua quantidade reduzida após o tratamento com M1;
- De forma inédita aqui é mostrado que M1 também é capaz de reduzir o crescimento tumoral em tumor pré-estabelecido;
- A redução do tumor pré-estabelecido decorrente de uma menor proliferação celular e início de aumento da apoptose ou estagnação da proliferação celular;
- O M1 é um promissor agente antimelanoma.

## REFERÊNCIAS

- AFRATIS N.; GIALELI C.; NIKITOVIC D.; TSEGENIDIS T. Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. **FEBS Journal**, v. 279, n. 7, p. 1177-1197, 2012.
- ANDRADE, L. F. **Avaliação da ação do medicamento m1 sobre o melanoma murino “in vivo”**. 65 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências biológicas – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- ANDREEFF M.; GOODRICH D.; PARDEE A. Chapter 2 **Cell-Proliferation, differentiation, and apoptosis**. *Cancer Medicine*, 5 ed, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20860/>>. Acesso em: 14/06/2013.
- ASPORD C.; PEDROZA-GONZALEZ A.; GALLEGOS M.; TINDLE S.; BURTON EC.; SU D.; MARCHES F.; BANCHEREAU J.; PALUCKA AK. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. **J Exp Med**, v. 204, p. 1037–1047, 2007 [PubMed: 17438063].
- BACHI, A. L. L., KIM, F. J. K., NONOGAKI, S., CARNEIRO, C. R. W., LOPES, J. D., JASIULIONIS, M. G., CORREA, M. Leukotriene B4 Creates a Favorable Microenvironment for Murine Melanoma Growth. **Mol Cancer Res**, v.7 p.1417-1424, 2009.
- BAKER, S. R.; WILKINSON, C. F. The effects of pesticides on human health: proceedings of a workshop, Keystone, Colorado. Princeton: **Princeton Scientific Pub.**; May 9-11, v. 18, p. 438, 1990. (Advances in modern environmental toxicology).
- BELL, I. R.; KOITHAN, M. A model for homeopathic remedy effects: low dose nanoparticles, allostatic cross-adaptation, and time-dependent sensitization in a complex adaptive system. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, n. 1, p. 191, 2012.
- BISHOP, F. L.; PRESCOTT P.; CHAN K. Y.; SAVILLE J.; ELM V. E.; LEWITH T. G. Prevalence of complementary medicine use in pediatric cancer: a systematic review. **Pediatrics**, v. 125, n. 4, p. 768-776, 2010.
- CAMARGO, R. A. de; COSTA, E. D. da; CATISTI, R. Effect of the oral administration homeopathic Arnica montana on mitochondrial oxidative stress. **Homeopathy : the journal of the Faculty of Homeopathy**, v. 102, n. 1, p. 49–53, 2013.
- CHIKRAMANE, P. S.; KALITA, D.; SURESH, A. K.; KANE, S. G.; BELLARE, J. R. Nanoparticulate Hypothesis Based on Froth Flotation. **ACS Publications**, v. 28, p. 15864–15875, 2012.

CLARKE, J. H.; CHA, J. Y.; DWALSH, M.; GAMBONI-ROBERTSON, F.; BANERJEE, A.; REZNIKOV, L. L.; DINARELLO, C. A.; HARKEN, A. H.; MCCARTER, M. D. Melanoma Inhibits Macrophage Activation by Suppressing Toll-like Receptor 4 Signaling. **J Am Coll Surg**, v.201, p.408-425.

CLAUSEN, J.; WIJK, R. V.; ALBRECHT, H. Review of the use of high potencies in basic research on homeopathy. **Homeopathy : the journal of the Faculty of Homeopathy**, v. 100, n. 4, p. 288–292, 2011.

CONDEELIS J.; POLLARD JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell**, v.124, p. 263–266, 2006 [PubMed: 16439202].

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860–867, 2002.

DICH J.; ZAHM H. S.; HANBERG A.; ADAMI H. Pesticides and cancer. **Cancer Causes Control**, v. 8, n. 3, p. 420-443, 1997.

DOUGAN M.; DRANOFF G. Immune therapy for cancer. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 83–117, 2009 [PubMed: 19007331].

DUNLOP, R. J.; CAMPBELL, C. W. Cytokines and Advanced Cancer. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 20, n. 3, p. 214-232.

ERSHLER W. B.; KELLER E. T. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. **Annu Rev Med**, v. 51, p. 245–270, 2000 [PubMed: 10774463].

FIGUEIREDO, L. C.; CORDEIRO, L. N.; ARRUDA, A. P.; et al. Câncer de pele : estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 3, p. 179–183, 2003.

FRENKEL, M.; ARYE, E. BEN; CARLSON, C.; SIERPINA, V. Integrating complementary and alternative medicine into conventional primary care: the patient perspective. **Explore (New York, N.Y.)**, v. 4, n. 3, p. 178–186, 2008.

GALDEANO, G.; BOYANO D.; SMITH-ZUBIAGA I.; ALVAREZ, A.; CANTON, I.; CANAVATE, L. Involvement of interleukin-6 in the biology and metastatic activity of B16F10 melanoma cells. **European Citokine Network**, v. 9, n. 2, p. 187-192, 1998.

GAO S. P.; MARK K. G.; LESLIE K.; PAO W.; MOTOI N.; GERALD W. L.; TRAVIS W. D.; BORNMANN W.; VEACH D.; CLARKSON B. Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas. **J Clin Invest**, v.117, p. 3846–3856, 2007 [PubMed: 18060032].

GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J.; MIRA, L.; E CORVO, M. Molecular mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavonoids. **Current Medicinal Chemistry**, 15, pp. 1586-1605, 2008.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010.

GUIMARÃES, F. S. F. **Potencial antimelanoma de complexos imunomodulatórios homeopáticos**. 85 f. (Dissertação de Mestrado em Biologia Celular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

GUIMARÃES, F. S. F.; ANDRADE, L. F.; MARTINS, S. T.; ABUD, A. P. R.; SENE, R. V.; WANDERER, C. TISCORNIA, I.; FOGOLÍN, M. B.; BUCHIS, D. F.; TRINDADE, E. S. In vitro and in vivo anticancer properties of a *Calcareo carbonica* derivative complex (M8) treatment in a murine melanoma model. **BMC Cancer**, v. 10, p.1-14, 2010.

HAHNEMANN, S. Organon of medicine [Boericke W, Trans.]. 6th edn. **New Delhi: B Jain Publishers**, 1991.

HANADA T.; KOBAYASHI T.; CHINEN T.; SAEKI K.; TAKAKI H.; KOGA K.; MINODA Y.; SANADA T.; YOSHIOKA T.; MIMATA H. IFN gamma-dependent, spontaneous development of colorectal carcinomas in SOCS1-deficient mice. **J Exp Med**, v. 203, p. 1391–1397, 2006 [PubMed: 16717119].

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Review Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>>. Acesso em 23/07/2013.

HOUGHTON, A. L.; POLSKY, D. Focus on melanoma. **Cancer Cell**, v. 2, p. 275-278, 2002.

IARC, 2008 - BOYLE, P. and LEVIN, B. E. 2008. IARC. World Cancer Report, IARC. Press Lyon - Disponível em: <[http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/wcr\\_2008.pdf](http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/wcr_2008.pdf)>. Acesso em: 14/06/2013.

INCA, 2011 - Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/diretrizes\\_cancer\\_ocupa.pdf](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/diretrizes_cancer_ocupa.pdf)>. Acesso em: 14/06/2013.

INCA, 2012 a - Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/abc\\_do\\_cancer\\_2ed.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/abc_do_cancer_2ed.pdf)>. Acesso em: 15/06/2013. 2013.

INCA, 2012 b - Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/revistaredecancer/site/home/n17/revista\\_17](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/revistaredecancer/site/home/n17/revista_17)>. Acesso em 18/08/2013.

INCA, 2013 - Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer –Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>. Acesso em: 28/06/2013.

JÄGER, T.; SCHERR, C.; SIMON, M.; HEUSSER, P.; BAUMGARTNER, S. Development of a test system for homeopathic preparations using impaired duckweed (*Lemna gibba* L.). **Journal of alternative and complementary medicine**, v. 17, n. 4, p. 315–323, 2011.

KARIN M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. **Nature**, v. 441, p. 431–436, 2006 [PubMed: 16724054].

KOWALSKI, I. S. G. E SOUSA, C. P. Câncer: uma doença com representações historicamente construídas. **Acta Oncológica**, v. 22, 2002.

KUBY, J.; KINDT, T.; OSBORNE, B.; GOLDSBY, R. **Immunology**. 5 ed. W. H. Freeman and Company, 2003.

LANGOWSKI J. L.; ZHANG X. W. U. L.; MATTSON J. D.; CHEN T.; SMITH K.; BASHAM B.; MCCLANAHAN T.; KASTELEIN R. A. F. T. M. IL-23 promotes tumour incidence and growth. **Nature**, v. 442, p. 461–465, 2006 [PubMed: 16688182].

LI M.; SONG L.; QIN X.; J BIOSCI. Glycan changes: cancer metastasis and anti-cancer vaccines. **Curr Pharm Des**, v. 35, n 4, p. 665-673, 2010.

LIN W. W.; KARIN M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **J Clin Invest**, v.117, p. 1175–1183, 2007 [PubMed: 17476347].

LOPES, L.; GODOY, L. M. F.; OLIVEIRA, C. C.; GABARDO, J.; SCHADECK, R. J. G.; BUCHIS, D. F. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova® medication. **Micron**, v. 37, p. 277-287, 2006.

MANTOVANI A.; ALLAVENA P.; SICA A.; BALKWILL F. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, p. 436–444, 2008 [PubMed: 18650914].

MARTEL C.; FRANCESCHI S. Infections and cancer: established associations and new hypotheses. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 70, p. 183–194, 2009 [PubMed: 18805702].

MARTINS J. R.; PASSEROTTI C. C.; MACIEL R.M.; SAMPAIO L.O.; DIETRICH C.P.; NADER H.B. Practical determination of hyaluronan by a new non-competitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. **Anal Biochem**, v. 319, n. 1, p. 65-72, 2003.

MEDRANO, R. F.V. **Investigação da resposta imunológica antitumoral induzida por células B16F10 tratadas pela combinação p19Arf e Interferon-beta em um modelo de vacinação profilático para melanoma**

**murino**. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 12, 2013.

MEIROVITZ, A.; GOLDBERG R.; BINDER A.; RUBINSTEIN M. A.; HERMANO E.; ELKIN M. Heparanase in inflammation and inflammation-associated cancer. **FEBS Journal**, v. 280, n. 10, p. 2307–2319, 2013.

MICHAEL KARIN.; YIXUE CAO.; FLORIAN R.; GRETEN.; ZHI-WEI LI. NF- $\kappa$ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. **Nature**, v. 2, p. 301 - 310, 2002.

MILAZZO, S.; RUSSELL, N.; ERNST, E. Efficacy of homeopathic therapy in cancer treatment. **European journal of cancer**, v. 42, n. 3, p. 282–289, 2006.

MIZUMOTO, S.; SUGAHARA, K. Glycosaminoglycans are functional ligands for receptor for advanced glycation end-products in tumors. **The FEBS journal**, v. 280, n. 10, p. 2462–2470, 2013.

MOLASSIOTIS, A.; FERNANDEZ-ORTEGA, P.; PUD, D.; OZDEN G.; SCOTT A. J.; PANTELI V.; MARGULIES A.; BROWALL M.; MAGRI M.; SELVEKEROVA S.; MADSEN E.; MILIVIES L.; BRUYNS I.; GUDMUNDSDOTTIR G.; HUMMERSTON S.; AHMAD A. M A.; PLATIN N.; KEARNEY N.; PATIRAKI E. Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 16, n. 4, p. 655–663, 2005.

MONTEIRO, D. de A.; IRIART, J. A. B. Homeopatia no Sistema Único de Saúde: representações dos usuários sobre o tratamento homeopático. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n. 8, p. 1903–1912, 2007.

MORENO, M.; BATISTA, F. R. B.; BONETTI, T. C. Sobrevida de Pacientes com Melanoma Cutâneo na Região Oeste de Santa Catarina, Brasil Survival of Patients with Cutaneous Melanoma in the Western Region of Santa. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 4, p. 647–653, 2012.

MURDOCH C.; MUTHANA M.; COFFELT S. B.; LEWIS C. E. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis, **Nat Rev Cancer**, v. 8, p. 618–631, 2008 [PubMed: 18633355].

NARDO D. G.; BARRETO J. B.; ANDREU P.; VASQUEZ L.; TAWFIK D.; KOLHATKAR N.; COUSSENS L. M. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. **Cancer Cell**, v. 16, p. 91–102, 2009 [PubMed: 19647220].

NAOR, D.; NEDVETZKI S.; GOLAN I.; MELNIK L.; FAITELSON Y. CD44 in cancer. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 39, n. 6, p. 527–79, 2002.

NOBRE, P. W.; LIANG, J.; JIANG, D. NIH Public Access. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 1, p. 221–264, 2011.

NOGUEIRA, G. W. G.; RIMOLI, M. A.; TURCI, M. B.; GUILHERME, S. D.; MOLLO, S. A.; BARNABÉ, V. D. **Doutrina Médica Homeopática, São Paulo: Grupo de Estudos Homeopáticos de São Paulo “Benoit Mure”, 1986.**

OLAKU, O.; ZIA, F.; SANTANA, J. M.; WHITE, J. D. The National Cancer Institute Best Case Series Program: A Summary of Cases of Cancer Patients Treated With Unconventional Therapies in India. **Integrative cancer therapies**, v. 20, n. 10, p. 1–8, 2013.

OLIVEIRA, C. C.; OLIVEIRA, S. M.; GODOY, L. M. F.; GABARDO, J.; BUCHIS, D. F. Canova, a Brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of micemacrophages. **Journal of Infection**, v. 52, p. 420-432, 2006.

OLIVEIRA, S. M. "**Efeitos de medicamentos homeopáticos sobre a liberação de espécies reativas por macrófagos peritoneais e a expressão de marcadores de células de medula óssea de camundongos**". 165 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências biológicas – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

OLIVEIRA, C. C.; ABUD, A. P. R.; DE OLIVEIRA, S. M.; et al. Developments on drug discovery and on new therapeutics: highly diluted tinctures act as biological response modifiers. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 11, n. 1, p. 101, 2011. BioMed Central Ltd.

ONUCHIC, A. C.; MACHADO, C. M. L.; SAITO, R. F.; RIOS, F. J.; JANCAR, S.; CHAMMAS, R. Expression of PAFR as Part of a Prosurvival Response to Chemotherapy: A Novel Target for Combination Therapy in Melanoma. **Mediators of Inflammation**. p. 1-6, 2012.

PEREIRA, V. S. R. "**Mecanismos celulares de inflamação - avaliação da atividade anti-inflamatória de flavonóides**". 122 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Faculdade de Ciência - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.

PIEMONTE, M. R.; BUCHI, D. F. Analysis of IL-12, IFN-g and TNF-alpha production,  $\alpha 5 \beta 1$  integrins and actin filaments distribution in peritoneal mouse macrophages treated with homeopathic medicament. **Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology**, v. 33, p. 255-263, 2002.

ROBERTS S. J.; BY N. G.; FILLER R. B.; LEWIS J.; GLUSAC E. J.; HAYDAY A. C.; TIGELAAR R. E.; GIRARDI M. Characterizing tumor-promoting T cells in chemically induced cutaneous carcinogenesis, **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, p. 6770–6775, 2007 [PubMed: 17412837].

RODIER F.; COPPE J. P.; PATIL C. K.; HOEIJMAKERS W. A.; MUNOZ D. P.; RAZA S. R.; FREUND A.; CAMPEAU E.; DAVALOS A. R.; CAMPISI J. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. **Nat Cell Biol**, v. 11, p. 973–979, 2009 [PubMed: 19597488].

SATO, D. Y. O.; WAL, R.; OLIVEIRA, C. C.; CATTANEO, R. I. I.; MALVEZZI, M.; GABARDO, J.; BUCHI, D. F. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic medication. **Homeopathy**, v. 94, p. 26-32, 2005.

SCHREINEMACHERS DM. Cancer mortality in four northern wheat-producing states. **Environ Health Perspect**, V. 108, n. 9, p. 873-881. 2000.

SCITABLE, 2013 - Divisão celular e câncer – Nature education  
Disponível em: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-division-and-cancer-14046590>> Acesso em: 14/06/2013.

SEKULIC, A.; HALUSKA, P.; MILLER, A. J. Malignant melanoma in the 21<sup>st</sup> Century: The Emerging Molecular Landscape. NIH Public Access. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, n. 7, p. 825–846, 2009.

SOUCEK L.; LAWLOR E. R.; SOTO D.; SHCHORS K.; SWIGART L. B.; EVAN G. I. Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. **Nat Med**, v. 13, p. 1211–1218, 2007 [PubMed: 17906636].

SOUZA, S. R. P. DE; FISCHER, F. M.; SOUZA, J. M. P. DE. Bronzeamento e risco de melanoma cutâneo: revisão da literatura Sun tanning and risk of cutaneous melanoma: a literature review. **Revista Saúde Pública**, v. 38, n. 4, p. 588–598, 2004.

SPADACIO, C.; BARROS, N. F. DE. Uso de medicinas alternativas e complementares por pacientes com câncer: revisão sistemática. **Revista Saúde Pública**, v. 42, n. 1, p. 158–164, 2008.

SPARMANN A.; BAR-SAGI D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. **Cancer Cell**, v. 6, p. 447–458, 2004 [PubMed: 15542429].

TEIXEIRA, M. Z.; GUEDES, C. H. F. F.; BARRETO, P. V; MARTINS, M. A. The placebo effect and homeopathy. **Homeopathy: the journal of the Faculty of Homeopathy**, v. 99, n. 2, p. 119–129, 2010.

THE CELL 5<sup>a</sup> EDIÇÃO. FIGURA 20 – 17. PÁGINA 1221 - figura adaptada - etapas no processo de metástase.

VAKKILA J.; LOTZE M. T. Inflammation and necrosis promote tumour growth. **Nat Rev Immunol**, v. 4, p. 641– 648, 2004 [PubMed: 15286730].

VERONASE, L. A.; MARQUES, M. E. A. Critérios anatomopatológicos para melanoma maligno cutâneo: análise qualitativa de sua eficácia e revisão da literatura. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (JBPML)**, v. 40, n. 2, p. 99–112, 2004.

VIKSVEEN, P.; DYMITR, Z.; SIMOENS, S. Economic evaluations of homeopathy: a review. **The European Journal of Health Economics**, v. 013, p. 462–467, 2013.

VOELCKER, V; GEBHARDT C.; AVERBECK M.; SAALBACH A.; WOLF V.; WEIH F.; SLEEMAN J.; ANDEREGG U.; SIMON J. Hyaluronan fragments induce cytokine and metalloprotease upregulation in human melanoma cells in part by signalling via TLR4. **Experimental dermatology**, v. 17, n. 2, p. 100–107, 2007.

WANG L, YI T, KORTYLEWSKI M, PARDOLL DM, ZENG D, YU H. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. **J Exp Med**, v. 206, p. 1457–1464, 2009 [PubMed: 19564351].

WAINSTEIN, A. J. A.; BELFORT, F. A. Conduta para o melanoma cutâneo. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 31, n. 3, p. 204–214, 2004.

WAISSE, S. The science of high dilutions in historical context. **Homeopathy : the journal of the Faculty of Homeopathy**, v. 101, n. 2, p. 129–137, 2012.

WHO, 2013 - Organização Mundial da Saúde - Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>>. Acesso em: 28/06/2013.

ZAIDI, M. R.; DAY, C.; MERLINO, G. From UVs to Metastases : Modeling Melanoma Initiation and Progression in the Mouse. **Jornal de Investigação Dermatológica**, v. 128, p. 2381–2391, 2008.