

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDO DE SOUZA FONSECA GUIMARÃES

POTENCIAL ANTI-MELANOMA DE COMPLEXOS IMUNOMODULATÓRIOS
HOMEOPÁTICOS

CURITIBA

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDO DE SOUZA FONSECA GUIMARÃES

POTENCIAL ANTI-MELANOMA DE COMPLEXOS IMUNOMODULATÓRIOS
HOMEOPÁTICOS

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, área de concentração de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientador: Dr. Edvaldo da Silva Trindade.
Co-Orientadora: Dra. Dorly de Freitas Buchi.

CURITIBA

2009

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

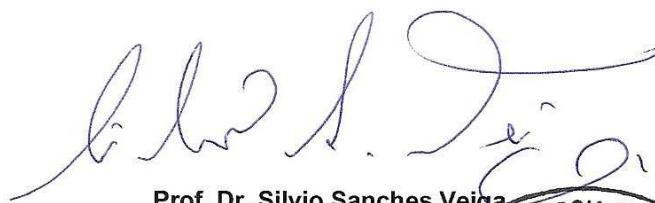
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Fernando de Souza Fonseca Guimarães**, no dia 27 de julho de 2009, defendeu sua Dissertação de Mestrado intitulada: "**Potencial anti-melanoma de complexos imunomoduladores homeopáticos**", com a Banca Examinadora constituída pelos professores: Dr. Michel Fleith Otuki (Universidade Estadual de Ponta Grossa), Dr. Luiz Cláudio Fernandes (Universidade Federal do Paraná), e Dr. Edvaldo da Silva Trindade (orientador e presidente da banca examinadora da Universidade Federal do Paraná), e tendo sido **Aprovado** recebendo o título de Mestre em Biologia Celular e Molecular, área de Concentração em Biologia Celular e Molecular.

Cumprindo todas as exigências estabelecidas nas Normas Internas deste Programa. Esta declaração tem validade por noventa dias (90), a partir da data da mesma.

Curitiba, 27 de julho 2009.



Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
Biologia Celular e Molecular



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Dr. Edvaldo da Silva Trindade

Orientador e presidente da Banca (Universidade Federal do Paraná - UFPR)


Dr. Michel Fleith Otuki

(Universidade Estadual Ponta Grossa - UFGP)


Dr. Luiz Claudio Fernandes

(Universidade Federal do Paraná - UFPR)

Como Suplente:


Dr. Daniela de Almeida Cabrini

(Universidade Federal do Paraná - UFPR)

Após argüir o(a) mestrando(a) **Fernando de Souza Fonseca Guimarães** em relação ao seu trabalho de dissertação intitulada: "**Potencial anti-melanoma de complexos imunomoduladores homeopáticos**", é de parecer favorável à **Aprovação** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de **Mestre** em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em **Biologia Celular e Molecular**.

A obtenção do título de Mestre está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação.

Curitiba, 27 de julho de 2009


Silvio Sanches Veiga
Coordenador do Curso

A minha querida mãe, Romilda
S. F. Guimarães, por originar-me à
vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos camundongos, pois sem eles esse trabalho não seria possível.

À Prof. Dorly de Freitas Buchi, Biologia Celular – UFPR, por permitir meu envolvimento com sua linha de pesquisa desde o começo de minha carreira acadêmica e me orientar em todos os aspectos pessoais e profissionais decorrentes de minha vida até então.

Ao Prof. Edvaldo da Silva Trindade, Biologia Celular – UFPR, por orientar-me durante o mestrado e ser presente e compreensível nos momentos felizes assim como nos difíceis.

Aos professores: Carla Wanderer, Célia R. C. Franco, Luis F. Fávaro, Biologia Celular – UFPR; Silvio M. Zanata, Patologia Básica – UFPR; Michel Otuki, Farmacologia – UFPR; Roger Chammas – USP; Zenilda L. Bouzon – UFSC; e a pesquisadora Mariela Bollati-Fogolín, Unidad de Biología Celular – Instituto Pasteur de Montevideú; por todo o suporte técnico – intelectual fornecido durante a execução deste projeto de mestrado. Aos bioteristas Cândido J. T. Pereira da UFPR e Rafael Zotz da PUCPR por todo o apoio e prontidão fornecido. Às técnicas Elisabeth, Eliane e Nino da Biologia Celular – UFPR; Vera Regina e Rosângela por todo o apoio e prontidão fornecido.

Aos alunos colaboradores deste projeto: Juliano Buba, Lucas F. Andrade, Ana Paula Abud, Sharon Martins, Kátia Paludo, Reginaldo V. Sene por todo o apoio e prontidão fornecido.

A minha querida Rafaela C. Stresser que tanta atenção, carinho e momentos bons me deu nos últimos quatro anos. E também aos amigos do mestrando: Bauru, Caro, Charuto, Diogão, Ediely, Fu, Gustavo Rossi, Japa, Mosca, Padre, Rafael, Raffaello, Schu, Wane... Sem pelos quais minha vida não seria tão agradável (e engraçada). Um agradecimento especial ao Rato da Kauande Capoeira, grande amigo e professor, a quem devo grande parte de minha inspiração.

A meu pai Archimedes e meus irmãos Elaine, Marcos, Sandra e Paulo pelo companheirismo e exemplo motivador.

Ao CNPq, SETI-PR e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

“A diferença entre o possível e o impossível, está na vontade humana.”

Louis Pasteur

RESUMO

O melanoma é a forma mais agressiva de câncer de pele e que se expande mais rapidamente em termos de incidência mundial. A terapia convencional tem demonstrado freqüente ineficiência associada a efeitos adversos em casos de melanoma maligno. Estudos prévios em camundongo demonstraram que complexos altamente diluídos derivados de extratos naturais, ativaram macrófagos, aumentando a produção de óxido nítrico, aumenta o número de células CD45R⁺ de medula óssea, o número de células CD8⁺ de linfonodo mesentérico e aumentaram a resposta tumoricida de linfócitos ativados contra células de melanoma murino B16F10 *in vitro*. Neste estudo foram realizados ensaios de triagem para avaliar o tratamento com diferentes complexos sob: a influencia imunológica do tratamento em camundongos suíços albinos, teste de expressão de interferon em linhagem celular repórter (MxRage), e teste de atividade de pNF-κB em linhagem de adenocarcinoma coloretal transfectada com GFP (HT29). Após os ensaios preliminares de triagem dois complexos foram selecionados para os estudos seguintes para avaliar: o comportamento de células B16F10 após tratamento *in vitro* e posterior comportamento da propagação de metástases pulmonares em camundongos C57BL/6 após inoculação com células B16F10 por veia caudal e tratamento *in vivo* por via inalante. Os resultados mostraram inibição *in vitro* da invasão de células B16F10 e *in vivo* potencial anti-metastático dos complexos derivados de *Calcareo carbonica* (M8) e de *Chelidonium majus*. O tratamento mostrou funções como antagonista da expressão do perlecan, inibidor da adesão e invasão celular, a diminuição da ativação do NF-κB induzida por TNF-α associada ao aumento da morte celular em células HT2. O perlecan é um importante componente da matriz extracelular e é considerado um fator metastático, angiogênico e de invasão em células tumorais em especial no melanoma. Estes resultados mostraram que compostos seguramente não tóxicos podem ser uma eficiente forma de terapia complementar promissora para a complementação de tratamento de melanoma e outros cânceres por promover a eficiência dos tratamentos convencionais, ou por melhorar a resposta imunológica contra tumores, ou suprimir fatores envolvidos com o comportamento maligno em células tumorais.

ABSTRACT

Melanoma is the most aggressive form of skin cancer, and the most rapidly expanding cancer in terms of worldwide incidence. Chemotherapeutic approaches to treat melanoma have been uniformly disappointing and induce adverse effects. Previous studies in mice have demonstrated that a high diluted complex derivates from natural extracts activated macrophages, increased nitric oxide production, increased the number of CD45R⁺ cells in bone marrow and CD8⁺ cells in mesenteric lymph node, and stimulated the tumoricidal response of activated lymphocytes against B16F10 melanoma cells *in vitro*. Here we performed screening assays to evaluate the immunological influence of treatment with different complexes in swiss albino mice, to test interferon activity in a reporter cell line (MxRage), and to test pNF-κB activity in a GFP transfected adenocarcinoma colorectal cell line (HT29). After the preliminary screening, two composts were selected to the further study of *in vitro* function evaluation of treated murine melanoma cells (B16F10) and the posterior *in vivo* evaluation of the inhalant treatment in a lung metastasis model with B16F10 in C57BL/6 mice. The results showed an *in vitro* inhibition of invasion associated with adhesion of B16F10 cells in the invasion assay and the *in vivo* anti-metastatic potential of a *Calcarea carbonica* (M8) and a *Chelidonium majus* derivate HDCs after inhalation treatment in the B16F10 lung metastasis model. Treatment showed functions, as a perlecan expression antagonist, inhibitor of cancer cell adhesion and invasion, decrease of NF-κB activation induced by TNF-α and increased cell dead were detected. Perlecan is an important component of extracellular matrix and is considered a metastatic, angiogenic and invasive factor for tumor cells, in special melanoma cells. These results showed that a safety, non-toxic and efficacy complementary therapy is possible and these high diluted compounds are a promising alternative approach to the complementary treatment of melanoma, or others cancers, which may enhance the efficacy of conventional medicines by improving the immune response against tumor cells or even inducing a direct dormancy in tumor cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema epidérmico de localização da transformação melanócito – melanoma. Exemplo de nódulo de melanoma em paciente.....	4
Figura 2: Uso da homeopatia no panorama mundial.....	17
Figura 3: Câmara inalante de camundongos para tratamento <i>in vivo</i>	29
Figura 4: Design experimental para o ensaio de fagocitose.....	32
Figura 5: Estratégia de “Gates” para aquisição de dados para citometria sobre a imunofenotipagem de células sanguíneas e de linfonodos.....	34
Figura 6: Triagem / CHIs sob a imunofenotipagem de células sanguíneas após tratamento <i>in vivo</i> sobre camundongos albinos suíços.....	39
Figura 7: Estudo do tratamento <i>in vitro</i> com M1 e M8 em células MxRAGE.....	40
Figura 8: Estudo do tratamento <i>in vitro</i> com M1 e M8 em células HT29.....	41
Figura 9: Tratamento <i>in vitro</i> com M1 e M8 sob macrófagos peritoneais de camundongo C57BL/6 e a capacidade fagocítica de beads fluorescentes.....	43
Figura 10: Expressão de CD74, E-caderina, ciclo celular e viabilidade celular após tratamento <i>in vitro</i> com M1 em células B16F10.....	47
Figura 11: Ensaio de invasão de células B16F10 tratadas <i>in vitro</i> com M1.....	49
Figura 12: Avaliação dos parâmetros físicos de camundongos C57BL/6 com metástase pulmonar de células B16F10 após tratamento <i>in vivo</i> com M1.....	51
Figura 13: Avaliação macroscópica do potencial metastático de nódulos metastático de células em pulmão de camundongo C57BL/6 após tratamento <i>in vivo</i> com M1.....	53
Figura 14: Fenotipagens e imunofenotipagens de células imunitárias sanguíneas de camundongos C57BL/6 com metástase pulmonar de células B16F10 após tratamento <i>in vivo</i> com M1.....	54
Figura 15: Avaliação histopatológica do potencial metastático de nódulos metastático de células em pulmão de camundongo C57BL/6 após tratamento <i>in vivo</i> com M1.....	56
Figura 16: Avaliação imuno-histopatológica da expressão de perlecan em nódulos metastático de células B16F10 em pulmão de camundongo C57BL/6 após tratamento <i>in vivo</i> com M1.....	57

Figura 17: Expressão de CD74, E-caderina, ciclo celular e viabilidade celular após tratamento <i>in vitro</i> com M8 em células B16F10.....	62
Figura 18: Ensaio de invasão de células B16F10 tratadas <i>in vitro</i> com M8.....	64
Figura 19: Avaliação dos parâmetros físicos de camundongos C57BL/6 com metástase pulmonar de células B16F10 após tratamento <i>in vivo</i> com M8.....	66
Figura 20: Avaliação macroscópica do potencial metastático de nódulos metastático de células em pulmão de camundongo C57BL/6 após tratamento <i>in vivo</i> com M8.....	67
Figura 21: Fenotipagens e imunofenotipagens de células imunitárias sanguíneas de camundongos C57BL/6 com metástase pulmonar de células B16F10 após tratamento <i>in vivo</i> com M8.....	69
Figura 22: Avaliação histopatológica do potencial metastático de nódulos metastático de células em pulmão de camundongo C57BL/6 após tratamento <i>in vivo</i> com M8.....	71
Figura 23: Avaliação imuno-histopatológica da expressão de perlecan em nódulos metastático de células B16F10 em pulmão de camundongo C57BL/6 após tratamento <i>in vivo</i> com M8.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	- 7-aminoactinomycinD.
ANOVA	- Análise de variância.
B	- Linfócitos B (CD3 ⁻ CD19 ⁺).
B16F10	- Cepa de melanoma murino.
B220	- Marcador de linfócitos B.
BSA	- Albumina do soro de bovino.
C57BL/6	- Linhagem de camundongos isogênicos.
CHI	- Composto homeopático imunomodulador.
CD3	- Cluster Differentiation (CD) 3. Co-receptor de linfócitos T.
CD4	- Co-receptor de células Th.
CD8	- Co-receptor de células Tc.
CD11b	- Subunidade αM da integrina CR3.
CD11c	- Subunidade αM da integrina CR4.
CD16/32	- Receptores Fc.
CD19	- Co-receptor de células B.
CD44	- Glicoproteína de membrana que se liga em ácido hialurônico.
CD74	- Cadeia invariante do MHCII.
CD45	- Antígeno comum de leucócitos.
CD95	- Fas.
CS	- Condroitim sulfato.
DAB	- Diamino benzidine tetrahydrochloride.
DMEM	- (Dulbeco`s Modified Eagle`s Medium): Meio para cultivo celular.
Dx5	- Receptor de células NK (PanNK).
FasL	- Ao ligar-se com Fas, trimeriza-se e induz apoptose na célula.
F4/80	- Glicoproteína específica de membrana de macrófagos.
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético.
FITC	- Fluoresceína, fluoroforo.
FSC	- Espalhamento frontal, indica tamanho celular na citometria.
HA	- Acido hialuronico.

HE	- Hematoxilina-Eosina, coloração histológica.
HEPES	- Ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazineetanesulfônico.
HS	- Heparum sulfato.
HSP	- "Horseradish peroxidase".
IFN- γ	- Interferon gama, envolvido na resposta Th1.
IGG	- Imunoglobulina G.
IL-2	- Interleucina 2, envolvida na resposta Th1.
IL-4	- Interleucina 4, envolvida na resposta Th2.
IL-5	- Interleucina 5, envolvida na resposta Th2.
IL-10	- Interleucina 10, envolvida na resposta Th3.
IL-12p40	- Subunidade p40 da interleucina 12.
IPMon	- Instituto Pasteur de Montevideú.
Ly6G	- Marcador de neutrófilos.
Med	- Codigo inicial dos CHIs codificados em sua fabricação. Cada medicamento possui numeração correspondente como sufixo e será recodificado dentro do estudo duplo cego.
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura.
MHCI	- Complexo principal de histocompatibilidade I.
MHCII	- Complexo principal de histocompatibilidade II.
MMP	- Metaloprotease de matriz.
NK	- Linfócitos Natural Killer ($CD3^+CD56^+$).
PAS	- Ácido periódico de Schiff.
PE	- Ficoeritrina, fluoroforo.
PI	- Iodeto de propídio.
PBS	- Salina tamponada com fosfato.
rpm	- Rotações por minuto.
SFB	- Soro fetal bovino.
SSC	- Espalhamento lateral, indica granulosidade na citometria.
Tc	- Linfócitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$).
TCR	- Receptor de célula T.
Th	- Linfócitos T helper C ($CD3^+CD4^+$).

- Th1 - Resposta T “helper” 1, citotóxica.
- Th2 - Resposta T “helper” 2, humoral.
- Th3 - Resposta T “helper” 3, regulatória (Treg).
- TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa.
- TRAIL - Indução de apoptose relacionada por ligação com TNF- α .
- VEGF - Fator de crescimento vascular e endotelial.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Justificativa.....	2
1.2. Objetivos.....	3
1.2.1. Objetivo geral.....	3
1.2.2. Objetivos específicos.....	3
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. O melanoma.....	4
2.2. Proteoglicanos e o melanoma.....	8
2.3. Respostas imunitárias anti-neoplásica.....	11
2.4. Mecanismos de escape do melanoma contra o sistema imunitário.....	14
2.5. Pesquisas com CHIs e sistema imunitário.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Plano de trabalho.....	20
3.2. Complexos homeopáticos imunomoduladores.....	22
3.3. Animais.....	23
3.4. Triagem <i>in vivo</i> com camundongos suíços albinos.....	23
3.5. Estudo <i>in vitro</i> sobre a atividade do IFN do tipo I e II, pNF-κB e fagocitose.....	24
3.6. Estudo <i>in vitro</i> com células de melanoma murino B16F10.....	25
3.7. Análises por citometria de fluxo de células B16F10 tratadas <i>in vitro</i>	25
3.8. Viabilidade celular por marcação com 7-AAD.....	25
3.9. Expressão de biomoléculas relacionadas com malignidade.....	26
3.10. Análise de ciclo celular.....	26
3.11. Detecção de capacidade invasiva sobre matrigel.....	27
3.12. Estudo em camundongos C57BL/6.....	28
3.13. Fagocitose de beads por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 tratados <i>in vitro</i>	30
3.14. Imunofenotipagem de células obtidas de linfonodo mesentérico após tratamento <i>in vivo</i>	33

3.15. Imunofenotipagem e contagem diferencial de células de sangue periférico após tratamento <i>in vivo</i> com camundongos C57BL/6 tratados após inoculação de células tumorais na veia caudal.....	36
3.16. Histoquímica e Imunohistoquímica.....	36
3.17. Análise estatística.....	38
3.18. Revelação do código duplo cego de M1 e M8.....	38
4. CAPÍTULO 1: ESTUDOS IN VITRO E IN VIVO DOS CHIs.....	39
4.1. Resultados.....	39
4.1.1. Triagem <i>in vivo</i> dos CHIs em camundongos suíços albinos.....	39
4.1.2. M1 e M8 não alteram a expressão de interferon tipo I e II.....	40
4.1.3. M1 altera a atividade de pNF-kB.....	41
4.1.4. M1 e M8 não alteram a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais obtidos de C57BL/6.....	42
4.2. DISCUSSÃO.....	44
5. CAPÍTULO 2: ESTUDOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DO M1 EM MODELO DE MELANOMA MURINO COM CÉLULAS B16F10.....	46
5.1. RESULTADOS.....	46
5.1.1. Células B16F10 expostas para o M1 não apresentam alterações em marcadores celulares.....	46
5.1.2. Análise do perfil de invasão celular <i>in vitro</i> após o tratamento com M1.....	48
5.1.3. Estudo <i>in vivo</i> com células B16F10 em modelo de metástase pulmonar	50
5.1.4. Quantificação de células imunitárias sanguíneas no modelo de metástase pulmonar.....	53
5.1.5. Estudo histopatológico.....	55
5.2. DISCUSSÃO.....	58
6. CAPÍTULO 3: ESTUDOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DO M8 EM MODELO DE MELANOMA MURINO.....	61
6.1. RESULTADOS.....	61

6.1.1. Células B16F10 expostas para o M8 não apresentam alterações em marcadores celulares.....	61
6.1.2. Análise do perfil de invasão celular <i>in vitro</i> após o tratamento com M8.....	63
6.1.3. Estudo <i>in vivo</i> com células B16F10 em modelo de metástase pulmonar.....	65
6.1.4. Detecção de células imunitárias sanguíneas no modelo de metástase pulmonar.....	68
6.1.5. Estudo histopatológico.....	70
6.2. DISCUSSÃO.....	73
7. CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS.....	77
ANEXO.....	84

1. INTRODUÇÃO

Dentre os diversos tipos de cânceres, destaca-se o melanoma maligno, cujos tumores possuem alta capacidade metastática. Sua ocorrência é frequente na população mundial, geralmente ocasionando a morte do paciente quando em estágios avançados. Por outro lado, é clinicamente reconhecido que cânceres, de uma forma geral, quando em metástases avançadas, são geralmente insensíveis aos tratamentos convencionais, os quais além de pouco eficientes, possuem diversos efeitos colaterais, geralmente, levando ao comprometimento da qualidade de vida dos pacientes.

A capacidade metastática consiste na habilidade das células tumorais de se estabelecerem em distintos órgãos (como por exemplo, cérebro, pulmão e fígado, entre outros) em relação a sua origem, o que resulta na formação de colônias secundárias, comprometendo assim a eliminação total dos tumores por via cirúrgica. Essa capacidade metastática é decorrente de vários fatores, dos quais se destaca a habilidade da célula tumoral em se tornar não “visível” à vigilância imunológica. Sendo esta caracterizada por um conjunto de células de defesa e moléculas bioativas que atuam proporcionando o equilíbrio altamente competente e controlado (THOMPSON *et al.*, 2005).

Assim, uma estratégia interessante para o combate ao câncer seria a sensibilização das células do sistema imune, para que estas possam reconhecer as células tumorais e, desta forma, realizar o seu extermínio. O ideal seria se este tratamento não ocasionasse efeitos colaterais e, conseqüentemente, que não minimizasse a qualidade de vida do paciente. Neste sentido destacam-se o uso de medicamentos homeopáticos combinados, ou compostos homeopáticos imunomoduladores (CHIs), que são medicamentos que compreendem uma combinação de várias matrizes diferentes, conhecidas como úteis para um determinado sintoma ou doença.

Nosso grupo de pesquisa está envolvido no estudo de medicamentos homeopáticos e suas correlações imunológicas há mais de quinze anos, por

acreditar que o desenvolvimento de terapias complementares de baixa, ou mesmo de nenhuma toxicidade, que estimulem células imunitárias é certamente relevante nas perspectivas de associação com tratamentos convencionais. Por outro lado, os CHIs podem permitir uma maior sobrevida e qualidade de vida do paciente. Desta forma, o objetivo do presente projeto é avaliar CHIs e sua eficácia em modelo de melanoma experimental em camundongo, bem como mecanismos celulares envolvidos no processo.

1.1. Justificativa

O melanoma é um tipo de tumor agressivo que exibe um grande potencial metastático. Infelizmente, os tratamentos convencionais existentes não têm sido eficientes contra o melanoma maligno, proporcionando taxas de recuperação inferiores a 25%. Por outro lado, como constatado em diversas observações clínicas, pacientes portadores de outras neoplasias que foram tratados com medicamentos CHIs mostraram uma maior efetividade no tratamento, permitindo que o próprio sistema imunitário do paciente possa auxiliar na resposta positiva. Especificamente no caso de melanomas, pesquisas recentes que também utilizaram CHIs, corroboram com esta maior eficácia. Resultados prévios em animais com Sarcoma-180 sob tratamento com CHI também mostraram resposta imunológica ativada e, conseqüentemente, uma redução significativa do volume tumoral e remissão total de 30% dos tumores. Dessa forma, o presente estudo visa avaliar a ação dos CHIs sobre células tumorais, em especial em melanoma, buscando contribuir para um maior conhecimento sobre os mecanismos de ação desse tipo de medicamento na atividade imunitária antitumoral, além de propor uma possibilidade terapêutica complementar no tratamento de neoplasias.

1.2. Objetivos

1.2.1. Geral

- Avaliar a ação dos CHIs *in vitro* sobre células MxRage e linhagens celulares tumorais (HT29 e B16F10), assim como *in vivo* em modelo de tumor maligno de melanoma murino.

1.2.2. Específicos:

Para alcançar o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos são propostos:

- a) Selecionar os CHIs que alterem a resposta imunológica Th1 ou Th2 em estudos *in vivo* com camundongos suíços albinos;
- b) Triar os CHIs que alterem a resposta *in vitro* sobre linhagens celulares repórteres para estimulação de IFN do tipo I e II (MxRage) e NF- κ B (HT29, GFP transfectada para p-NF- κ B).
- c) Avaliar atividade fagocitária de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 após tratamento *in vitro* com CHIs.
- d) Avaliar diversos parâmetros celulares, como viabilidade celular, proliferação celular, possíveis alterações morfológicas, invasividade, expressão de CD74 e E-caderina em estudos *in vitro* com células de melanoma murino B16F10.
- e) Avaliar, identificar e localizar a expressão de CD74 e E-caderina envolvidas com sinalização celular e com capacidade anti-tumoral após o tratamento.
- f) Avaliar os efeitos do tratamento de CHIs em metástases pulmonar de células B16F10, em camundongos C57BL/6.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O melanoma

Câncer é a classificação patológica a um conjunto de doenças cuja característica é a proliferação descontrolada de células no organismo, provocada geralmente por mutação no DNA, levando à perda do controle da divisão celular. Com este crescimento desordenado as células, como mostrado na Figura 1 (A-B), se desprendem e podem cair na corrente sanguínea ou linfática, nas quais são transportadas e se proliferam em outros órgãos, num processo conhecido como metástase. Os tumores benignos, diferentemente dos malignos, não têm a capacidade de se espalhar para outras partes do corpo, pois não são infiltrativos. Eles crescem lentamente e são semelhantes ao tecido normais e ainda, diferentes dos maligno, os tumores benignos não possuem a capacidade de proliferação em local distinto ao de origem. Geralmente são envolvidos por cápsula e podem ser

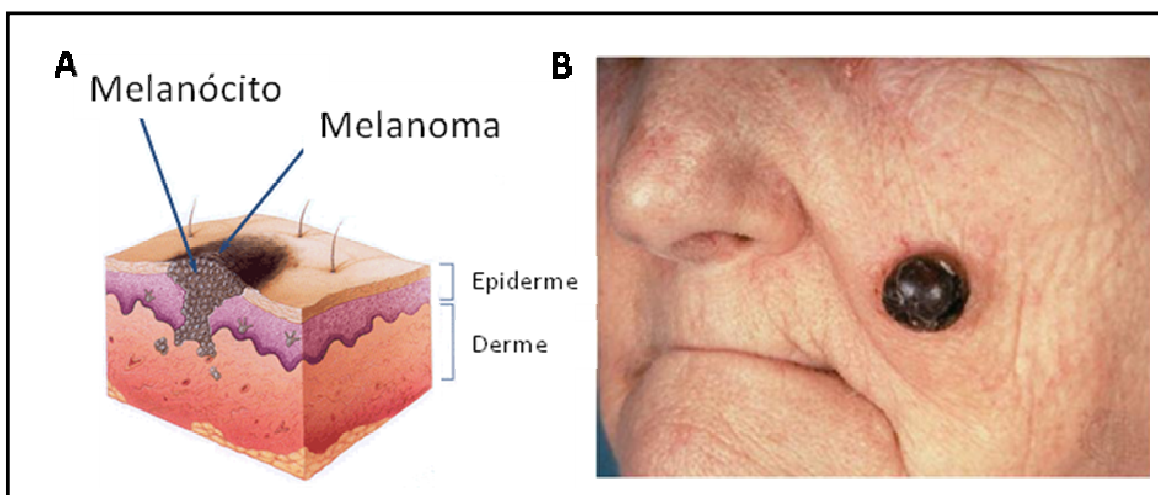


Figura 1: A: Esquema epidérmico de localização de um melanoma. B: Exemplo de nódulo facial de melanoma em paciente (Fonte: A: <http://www.melanoma.ca> e B: <http://www.topnews.in/health/diseases/skin-cancer>; acessadas em 22/08/2008).

removidos cirurgicamente, sendo que na maioria dos casos não voltam a crescer (ALBERTSSON *et al.*, 2003; JANEWAY *et al.*, 2007).

A célula que se torna anormal determinará o tipo de câncer. Neste sentido, o melanoma (Figura 1), que é um câncer resultante da transformação maligna de melanócitos, representa um significativo e crescente problema na saúde pública mundial. Quando detectado em estágios iniciais, os nódulos de melanoma podem ser removidos cirurgicamente. No entanto, em estágio avançado, leva a um comprometimento do paciente, que apresenta tempo médio de vida menor que um ano e a estimativa para cinco anos de sobrevivência é menor que 15% (RIGEL; CARUCCI, 2000). O melanoma é um câncer de pele agressivo, com grande potencial metastático, particularmente em linfonodos, pulmão e cérebro. Nestes casos, os tratamentos com quimioterápicos têm sido pouco eficientes e no momento há poucos agentes quimioterápicos para o tratamento de melanoma metastático que ofereçam taxas de resposta maiores que 25%; além disto, estes medicamentos apresentam efeitos colaterais severos. Por esta razão, no panorama mundial, aproximadamente 90% das mortes decorrentes de câncer, são devido a casos de cânceres desta natureza (RIGEL; CARUCCI, 2000; THOMPSON; SCOLYER; KEFFORD, 2005).

Dentre os tratamentos clínicos convencionais para melanoma maligno estão a administração de agentes quimioterapêuticos como: dacarbazine (DTIC), cisplatino, paquitaxel, docetaxel, temozolomida análoga de DTIC, entre outros. A imunoterapia também vem sendo utilizada clinicamente através de administração de imunoestimulantes como IL-2 e IFN. Porém, nenhum dos tratamentos mencionados oferecem taxa de sucesso maior que 30% para a regressão total ou cura da patologia. Além disto, todos os tratamentos acima são acompanhados de múltiplos efeitos colaterais em praticamente todos os pacientes, devido à agressividade do tratamento. Os sintomas do tratamento quimioterápico variam como: náusea, vômito, febre, hipotensão, distensão abdominal, fadiga, dores de cabeça, edemas periféricos, disfunção renal, mielossupressão. Já para os imunoterápicos, variam como: a síndrome do escape capilar que afeta a irrigação sanguínea em vários órgãos, hipotensão, fadiga, febre, aumento de creatinina no soro, congestão vascular pulmonar, edema generalizado, aumentada suscetibilidade a infecção por *Staphylococcus*,

supressão de medula óssea, depressão, chegando até a desenvolver um comportamento suicida (ATALLAH; FLAHERTY, 2005).

A célula de melanoma é originária de melanócitos epidérmicos que sofreram alterações genótípicas/fenótípicas resultando na transformação maligna. Estas alterações podem ser resultantes do excesso de radiação solar, contato com substâncias cancerígenas, predisposição genética, dentre outros fatores. A transformação maligna e a progressão do melanoma envolvem eventos de metástase e migração da célula maligna para outras partes do organismo. A metástase ocorre quando a célula transformada deixa de expressar marcadores de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, como E-caderina e β -catenina, que naturalmente a mantém aderido no tecido epitelial. A E-caderina é uma glicoproteína transmembrânica que ancora as células epiteliais em junções aderentes, a qual se liga ao citoesqueleto de actina, por intermédio da β -catenina. Desta maneira, em seu estado normal, os melanócitos encontram-se ligados a queratinócitos. Após a transformação maligna, células de melanoma diminuem a expressão ou deixam de expressar E-caderina, o que resulta na deficiência de ancoramento epidérmico e da regulação por queratinócitos. A baixa expressão desta molécula implica que a β -catenina, por sua vez, encontra-se na forma solúvel no citosol. Isto resulta na estimulação das proteínas envolvidas com a indução do ciclo celular, ocasionando proliferação desenfreada da célula transformada. A proliferação desordenada gera a difusão destas células pelo tecido e pela falta de aderência e, aliada com sua capacidade invasiva, pode penetrar em um vaso sanguíneo e ser levada para outros órgãos, podendo então estabelecer novas colônias (TUCCI *et al.*, 2007). A capacidade invasiva e migratória depende da expressão de metaloproteases que agem clivando proteínas da matriz extracelular, resultando na capacidade metastática (CURRAN; MURRAY, 1999).

Diversos modelos animais de melanoma são utilizados atualmente para a pesquisa básica de agentes antitumorais, sendo que, um dos modelos mais utilizados nestes estudos, consiste na proliferação das células B16F10 que foram obtidos de camundongos C57BL/6. A cepa de melanócitos transformados B16

originou-se espontaneamente neste tipo de camundongo. Ao longo do estabelecimento da linhagem separaram-se os clones celulares com maiores capacidades metastáticas, correlacionando-os com maior numeração final conforme o maior potencial de metástases. A célula B16F10 é considerada de alto potencial metastático, sendo ideal para os estudos *in vivo* porque, após a “pega tumoral”, confere ao animal um tempo significativo de vida, no qual é possível administrar agentes terapêuticos para pesquisa básica. Dos modelos *in vivo* utilizados para estudo com B16F10, há o modelo de inoculação destas células subcutaneamente, pois em poucos dias há o crescimento de um tumor sólido, palpável com intensa área necrótica e que resulta em baixa sobrevivência dos animais. O modelo mais utilizado e mais citado na literatura é o ensaio *in vivo* de metástase pulmonar, no qual se inocula a solução com células tumorais na veia caudal e as células são carregadas pela corrente sanguínea até os finos capilares pulmonares. Ao penetrar no tecido pulmonar, as células B16F10 resultam em diversos nódulos metastáticos escuros facilmente distinguíveis, devido à expressão de pigmentos de melanina pelas células. Este modelo de metástase pulmonar é amplamente utilizado, devido à aproximação das características com o melanoma metastático humano, desde a propagação de nódulos metastáticos em órgãos como o pulmão, como a resistência de ambos a agentes quimioterápicos quando o estágio de câncer está avançado (OVERWIJK; RESTIFO, 2000).

A célula B16F10 do modelo de metástase pulmonar apresenta um aumento da produção enzimática, destacando-se proteases que resultam na capacidade invasiva, que permite passar por barreiras teciduais como a matriz extracelular e a parede vascular (GHOSH; MAITY, 2007). Dentre as metaloproteases expressas pela célula B16F10, assim como em demais células tumorais metastáticas, estão a MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP, que conferem capacidade invasiva a estas células por degradarem colágeno IV, o maior componente da membrana basal (camada extracelular de sustentação que funciona como filtro seletivo, e separa o tecido epitelial do tecido conjuntivo) (KASAOKA *et al.*, 2007).

A célula B16F10, diferente de suas variações de menores malignidade como a B16F1, uma vez que esta apresenta alta expressão da integrina αV , a qual está relacionada com ligação com a molécula de matriz extracelular, em especial a fibronectina. A alta expressão desta integrina é necessária para a efetividade metastática, adesão no tecido pulmonar, assim como sobrevivência celular contra a “anoikis”, morte celular desadesão (QIAN *et al.*, 2005).

2.2. Proteoglicanos e o melanoma

Vários fatores podem estar alterados nas células tumorais. Como discutido anteriormente, as bases moleculares do câncer ainda não foram totalmente elucidadas, mas sabe-se que essas células, além de produzirem enzimas que clivam componentes da matriz extracelular, podem possuir alterações em diversas proteínas, como integrinas, caderinas, cateninas, além dos proteoglicanos, em especial os de heparam sulfato.

Os proteoglicanos (PGs) são constituídos de cadeias de glicosaminoglicanos covalentemente ligadas a um esqueleto protéico. Os glicosaminoglicanos, por sua vez, são heteropolissacarídeos lineares formados por unidades dissacarídicas repetitivas, constituídas por uma hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina) unida por ligação glicosídica a um açúcar não nitrogenado, que pode ser um ácido urônico (D-glucurônico ou L-idurônico) ou um açúcar neutro (D-galactose). A maioria desses compostos apresenta grupamentos sulfatos, que juntamente com as carboxilas dos ácidos urônicos, conferem uma alta densidade de cargas negativas a eles. São conhecidos os seguintes glicosaminoglicanos: heparina, heparam sulfato, condroitim-4-sulfato, condroitim-6-sulfato, dermatam sulfato, queratam sulfato e ácido hialurônico. Esses compostos podem ser diferenciados quanto ao tipo de hexosamina e açúcar não nitrogenado, quanto ao grau de sulfatação e a posição em que são sulfatados,

bem como quanto ao tipo de ligação glicosídica inter- e intradissacarídica (DIETRICH, 1984; GANDHI; MANCERA, 2008).

Virtualmente todas as células, desde invertebrados simples até humanos, são capazes de produzirem heparam sulfato (DIETRICH, 1984; LINDAHL, 2007). Existem 16 proteínas diferentes que carregam cadeias de heparam sulfato. Os proteoglicanos de heparam sulfato (PGHS) têm sido caracterizados como componentes da matriz extracelular, como Agrin, Perlecan e, recentemente, Colágeno XVIII (IOZZO; SAN ANTONIO, 2001), bem como da superfície celular, como os membros da família dos Sindecans e dos Glipicans (BERNFELD *et al.*, 1999; LINDAHL, 2007).

Os PGHS são responsáveis por várias funções biológicas como atuação como co-receptores, que potencializam eventos de sinalização celular (LOPES; DIETRICH; NADER, 2006).

Os PGHS presentes na superfície de células tumorais, podem ainda sofrer efeitos de “shedding” e heparanases secretadas pelas próprias células tumorais, que agem na liberação do ectodomínio deste proteoglicano ou na clivagem das cadeias sacarídicas, respectivamente. O efeito resultante é a distribuição de PGHS livres e de fragmentos de heparam sulfato, os quais podem agir como modulares celulares, na região de alojamento do tumor. Assim, podem atuar como moléculas efetoras na sinalização celular para eventos de angiogênese, contribuindo para o crescimento da massa tumoral e diminuição da hipóxia (SANDERSON *et al.*, 2005).

Cabe salientar que tumores metastáticos também podem agir utilizando os proteoglicanos da matriz extracelular, em especial o Perlecan. Este PGHS é um importante componente da membrana basal que frequentemente possui sua expressão regulada positivamente em nódulos metastáticos pelas células tumorais. O efeito resultante é a criação de um microambiente apto para o início de eventos de neovascularização, crescimento tumoral e invasividade. Tal associação do Perlecan com a capacidade metastática tem sido correlacionada principalmente a sua habilidade de acumular o maior fator de neovascularização (FGF-2) e de promover a integridade de novos vasos. Este proteoglicano constitui

em um alvo significativo para novas pesquisas, as quais visam à diminuição do potencial metastáticos de tumores, em especial o melanoma (JIANG *et al.*, 2004; FJELDSTAD, KOLSET, 2005).

Proteoglicanos de condroitim sulfato (PGCS) também possuem correlações com a malignidade da célula de melanoma. Estudos prévios em células de melanoma murino demonstraram que o aumento da expressão de PGCS está diretamente relacionado com o maior potencial metastático e tumorigênico (BURG *et al.*, 1998). A relação da malignidade associada a este proteoglicano é resultante do fato de uma metaloprotease de matriz do tipo membrana (MT3-MMP) se tornar funcional quando há interação entre ambos e facilitar a capacidade da célula tumoral de atravessar as barreiras de matriz extracelular, migrando para outras regiões (IIDA *et al.*, 2005).

2.3. Respostas imunitárias anti-neoplásica

O sistema imunitário corresponde ao conjunto de células capazes de manter a normalidade do organismo em um balanço altamente equilibrado. Uma das atribuições destas células são a identificação e eliminação de células infectadas, anormais e ou neoplásicas. Macrófagos, células dendríticas e linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, B e NK são células descritas como potenciais efetoras contra neoplasias e são exaustivamente estudadas em vias de ativação de resposta imunitária visando a imunoterapia contra células neoplásicas (MOLIFE; HANCOCK, 2002).

As células tumorais desenvolvem diversos mecanismos para se tornarem “invisíveis” à vigilância imunológica. Células anormais, que estejam com expressão gênica diferenciada do considerado normal, tendem a ser eliminadas por linfócitos T CD8⁺, evitando que essa célula cause algum dano ao organismo. Esta eliminação ocorre quando o linfócito T CD8⁺ entra em contato com a célula alvo e reconhece seu padrão de peptídeo apresentado pelo MHC I. Estes peptídeos são resultantes do processo de clivagem de proteínas, por endossomo ou no lisossomo no processo de reciclagem celular, sendo expostos no complexo MHC I para serem externalizados na membrana plasmática. Caso o perfil de proteínas esteja anormal ou com sequências não coerentes, há o início da indução da morte celular programada, a apoptose. Este evento ocorre quando a célula T CD8⁺ secreta moléculas como a perforina, granzima B, TNF- α ou interage o receptor Fas (ou CD95) com o receptor FasL da célula anormal, ativando a maquinaria de apoptose da célula alvo (BOON *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2004). No entanto, diversas células tumorais, incluindo células de melanoma, conseguem “burlar” a vigilância dos linfócitos T CD8⁺ por expressarem a cadeia invariante (CD74) do MHC II, receptor comum das células apresentadoras de antígenos. A expressão do CD74 em células tumorais não está associada à expressão do MHC II, mas confere às mesmas, a capacidade de passarem sem serem reconhecidas pelos linfócitos T CD8⁺, que não são capazes de iniciar uma

resposta por não identificarem padrão de anormalidade quando reconhecem esta molécula (BURTON *et al.*, 2004).

A célula imunitária que possui o maior potencial na imunovigilância e eliminação de células neoplásicas é o linfócito “Natural Killer” ou NK. Este linfócito compreende uma classe específica de linfócitos que não expressa marcadores característicos de linfócitos B como o B220⁺ ou CD19⁺ ou de linfócitos T como o CD3⁺. Estudos prévios demonstraram que células NK possuem papel de destaque na eliminação de diversas células tumorais humanas ou murinas, inclusive no modelo de melanoma metastático pulmonar em camundongos C57BL/6 com células B16F10 (GRUNG; ZHANG; SENTMAN, 2007). Linfócitos NK compartilham características com os linfócitos T CD8⁺ em termos de indução da célula alvo a apoptose, porém possuem características diferenciais que as tornam mais eficientes neste mecanismo. Células NK podem reconhecer a célula alvo sem a necessidade de serem ativadas por imunização prévia ou estimulação por contato com células apresentadoras de antígenos como ocorre em células T para tornarem-se eficientes em sua resposta. Possuem diversos receptores e moléculas co-estimulatórias capazes de testar e de detectar se a célula alvo está com infecção viral ou neoplásica. Expressam também largo repertório de moléculas citotóxicas a serem secretadas em direção à célula anormal como perforinas, granzimas A e B e granulinsina, além de receptores de superfície não secretados com potencial de indução a morte celular como o CD95, TRAIL, dentre outros. Um amplo infiltrado de linfócitos NK em tumores, está associado a um bom prognóstico da neoplasia, porém grande quantidade de NK na corrente sanguínea quando há avanço da neoplasia, indica ineficiência da capacidade anti-neoplásica desta célula. Fatores associados a alguns tumores inativam ou inviabilizam células NK que estejam em infiltração, como baixo pH, baixa concentração de glicose, hipóxia, grande liberação de reativos de oxigênio liberados por macrófagos em evento de inflamação e a grande quantidade de matriz extracelular associada com alguns tumores que acabam por se tornarem barreiras imunológicas. Tais fatores associados com a capacidade de resposta contra células imunitárias que algumas células tumorais possuem, impedem as células NK de erradicar o tumor (SMYTH

et al., 2002; ALBERTSSON *et al.*, 2003). Linfócitos NKT vem sido descritos como uma subclasse individual por apresentarem marcadores específicos de células NK e de linfócitos T simultaneamente, além de características celulares que diferem esse tipo celular destas células. Estas células NKT ($CD3^+Dx5^+$) apresentam auto-reatividade contra o complexo apresentador de antígenos CD1d (MHC like) e vem sido correlacionadas como citotóxicas contra tumores em características similares a células T $CD8^+$ e NK. Em modelos de metástase de células de melanoma murino B16, observou-se importante papel das células NKT na resposta antitumoral (BENDELAC; SAVAGE; TEYTON, 2007).

Linfócitos T $CD4^+$ são conhecidos usualmente como linfócitos T “helper” por possuírem funções de interação e ativação de outras células imunitárias de modo a direcionar e fortalecer respostas imunitárias específicas como Th1, Th2 ou Th3. A resposta Th1 é a resposta mediada por linfócitos T em perspectiva celular, sendo dirigida principalmente por linfócitos T $CD8^+$ e NK os quais são ativados por IL-4 e IL-5, citocinas secretadas por linfócitos T $CD4^+$ ativados de modo a direcionarem esta resposta. A resposta Th2 é a resposta humoral, sendo dirigida por linfócitos B quando secretam imunoglobulinas para neutralizar patógenos em lugares distantes do organismo. Os linfócitos B são ativados nesta via, após a ativação por linfócitos Th2, que ativam o linfócito B por secreção de citocinas IL-2 e IFN- γ . O resultado final foi à troca de classe de imunoglobulinas produzida pelo linfócito B e a ativação deste, de modo a produzi-las e secretá-las em larga escala (JANEWAY *et al.*, 2007). Ambas as respostas Th1/Th2, dependem da influência do linfócito T $CD4^+$ para promover a ativação e efetividade das células que executarão a resposta. A resposta Th3, ou Treg, foi descrita recentemente como sendo a resposta imunoregulatória por linfócitos T $CD4^+$ diferenciados, que apresentam marcadores específicos como o CD25 e o FOXP3, que irá reduzir ou neutralizar a resposta imunitária que estiver ocorrendo por outras células como macrófagos, neutrófilos, linfócitos T $CD8^+$ e NK. O Treg possui atividade regulatória por secretar a citocina IL-10, reguladora de células imunitárias. O linfócito Th3 tem sido correlacionado como promissor em estudos de imunoterapia em doenças auto-imune que o sistema imunitário esteja estimulado mais que o

necessário cronicamente. Porém este padrão de resposta também é associado com células tumorais, em especial células de melanoma, capazes de ativá-los e manipulá-los de modo que passem a regular a atividade anti-tumoral de células imunitárias que estejam nas proximidades tumorais (VOJDANI; ERDE, 2006; JANDUS *et al.*, 2008). Células dendríticas e macrófagos são capazes de fagocitar células anormais ou neoplásicas e iniciar apresentação de antígenos destas para apresentar e ativar linfócitos Tc para respostas anti-tumorais. O infiltrado leucocitário presente em tumores de melanoma, inclusive em tumores murino formados por células B16F10, consiste em sua maior parte em células como macrófagos e células dendríticas. No entanto o melanoma e outros cânceres possuem capacidade de manipulação destas células fagocíticas em seu favor. Células tumorais podem inativar a capacidade inflamatória e fagocítica destas células imunitárias por secretar fatores supressores como IL-10, IL-6 e VEGF ou até ativar células Treg de modo a secretar fatores supressores (STOITZNER *et al.*, 2008).

2.4. Mecanismos de escape do melanoma contra o sistema imunitário

As células tumorais, em especial as de melanoma, possuem diversos mecanismos de contra-ataque ou escape as respostas imunitárias além da capacidade de se tornarem imperceptíveis. Dentre estas estratégias está a manipulação de outras células imunitárias ou não, para o impedimento da resposta imunológica e até a indução à morte destas células antes de haver resposta tumoricida.

O ácido hialurônico (o único glicosaminoglicano que não é sulfatado e não se encontra covalentemente ligado a uma proteína, portanto não forma um proteoglicano), também conhecido como hialuronam, é encontrado abundantemente na matriz extracelular e é bem reconhecido como um importante determinante do comportamento das células tumorais. Os dados da literatura

mostram que o aumento da síntese de hialuronam nas células cancerígenas leva a formação de uma matriz fina e densa, que contribui para a mobilidade das células tumorais e a invasão tecidual. Ainda, foi demonstrado que os fragmentos de ácido hialurônico são capazes de promover angiogênese associada ao tumor (GÖTTE; YIP, 2006). Além disto, hialuronam é produzido por células tumorais ou por fibroblastos manipulados por mediadores secretados por células tumorais (EDWARD *et al.*, 2005). As moléculas de hialuronam na periferia do tecido tumoral são captadas, pelo respectivo receptor CD44, na membrana de macrófagos e monócitos no ato da infiltração tumoral, o que sinaliza a inativação destas células imunitárias. Dentre esta inativação ou disfunção do macrófago/monócito pela via HA-CD44 há a incapacidade do mesmo produzir significativamente citocinas pró-inflamatórias, importantes para a sinalização de resposta imunitária, como IFN- γ , TNF- α e IL-12p40, dentre outras (FRESNO *et al.*, 2005). Células de melanoma têm sua capacidade metastática diretamente relacionada com sua capacidade de produzir hialuronam, seu papel vem sido correlacionado com outros fatores além da inibição imunitária como crescimento tumoral, invasão de célula maligna, angiogênese e capacidade metastática. Células B16F10 captam moléculas de hialuronam no microambiente tumoral via CD44 presente em sua membrana e diferentemente de macrófagos/monócitos, tornam-se potencialmente mais malignas e ativadas. A produção de hialuronam por células B16F10 é resultante da sinalização por lactato liberado no tumor durante seu crescimento, resultando em maior agressividade dessa célula quanto maior se tornar o tumor (RUDRABHATLA; MAHAFFEY; MUMMERT, 2006).

Células de melanoma, incluindo a linhagem murina B16F10, possuem capacidade de contra-ataque às células imunitárias que tentam reconhecê-las. Isto ocorre devido ao fato de expressarem moléculas indutoras de apoptose como FasL, que ao se ligarem no receptor Fas/CD95 dos linfócitos, que entram em contato de reconhecimento com sua membrana, são induzidos a apoptose (SARRABAYROUSE *et al.*, 2007). Células tumorais que expressam FasL, possuem ampla resistência á sofrerem apoptose por esta via (IVANOV *et al.*, 2003). Células de melanoma possuem capacidade de secreção de vesículas

melanocíticas, contendo alta concentração de FasL em sua membrana externa, na periferia tumoral. Quando células imunitárias infiltram o tumor, freqüentemente encontram-se com estas vesículas depositadas na região e são induzidas á apoptose via Fas/FasL (ANDREOLA *et al.*, 2007).

2.5. Pesquisas com CHIs e sistema imunitário

Atualmente a imunoterapia é investigada intensivamente como possibilidade de terapia adjuvante. Há diversas pesquisas envolvendo a ativação do sistema imunitário do paciente portador de câncer, com a finalidade de melhorar a resposta do organismo. Como exemplo destaca-se o uso de vacinas produzidas a partir de fragmentos tumorais inativados (MOLIFE; HANCOCK, 2002). Por outro lado, recentemente tem-se discutido o uso de medicamentos homeopáticos combinados, ou compostos homeopáticos imunomoduladores (CHIs), que são medicamentos que compreendem uma combinação de várias matrizes diferentes. No entanto, pesquisas laboratoriais relacionando CHIs com imunoterapia são ainda escassas, na maioria das vezes restringem-se a estudos clínicos, com metodologias variadas, em muitos casos, controversas e com resultados duvidosos.

A homeopatia é um sistema terapêutico criado pelo médico alemão Samuel Christian Hahnemann (1755-1843) no final do século 18. O termo homeopatia é originado de *Pathos*, vocábulo grego que corresponde a sofrimento, e *Homoios* que significa semelhante (RUIZ, 1999). Utiliza uma série de substâncias derivadas de plantas, animais, minerais, substâncias químicas sintéticas ou drogas convencionais, todas em quantidades mínimas, usando um processo de preparação especial (JONAS; JACOBS, 1996) com repetidas diluições e succussões (agitação vigorosa) (JONAS; KAPTCHUK; LINDE, 2003). O poder curativo, segundo Hahnemann, se manifestaria com a menor dose possível do medicamento dinamizado, de modo que a dose contivesse, quase que

exclusivamente, só a força medicamentosa pura, livremente desenvolvida, do tipo não material, produzindo apenas dinamicamente efeitos tão poderosos que nunca seriam obtidos com a substância medicamentosa pura, mesmo que ingerida em grandes quantidades (RUIZ, 1999).

No Brasil a homeopatia deixou de ser considerada terapia alternativa quando foi reconhecida como especialidade médica pela portaria nº 1000 de 1980 pelo Conselho Federal de Medicina (NOGUEIRA *et al.*, 1986). Na Europa, por exemplo, a homeopatia é a terapia médica complementar mais comum (MILLAZO *et al.*, 2006). A Figura 2 ilustra os países que fazem uso da homeopatia no mundo.

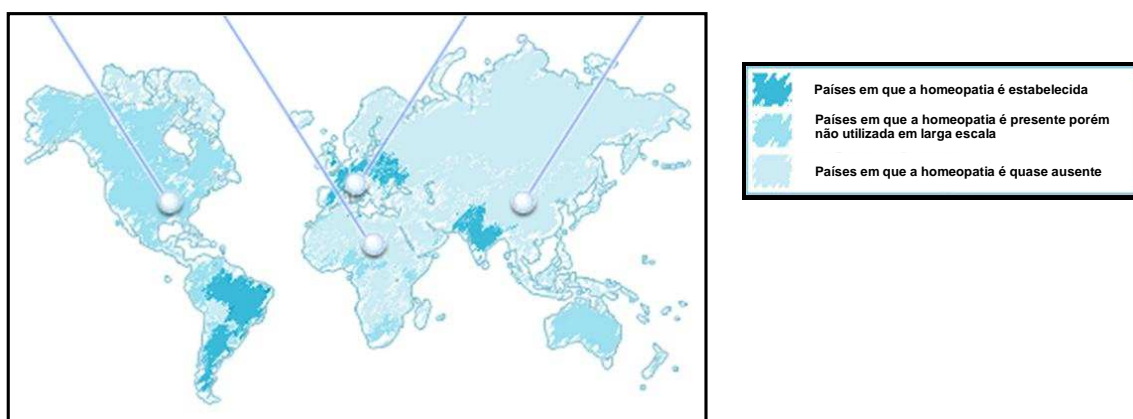


Figura 2 – Uso da homeopatia no panorama mundial (Fonte: <http://www.boiron.com/en>, acessado em 22/07/2008).

Desde 1998 o Laboratório de Pesquisa em Células Inflamatórias e Neoplásicas da UFPR vem encontrando resultados relevantes pesquisando medicamentos complexos homeopáticos (CHIs) que atuam como imunomoduladores. A manipulação destes complexos é baseada nas técnicas homeopáticas de Hahnemann, a qual usa substâncias altamente diluídas e dinamizadas durante a preparação. Observações clínicas confirmam o sucesso do tratamento complementar com esta categoria de medicamentos, que permite que o próprio sistema imunológico do paciente responda positivamente a diversas condições patológicas. Muitos pacientes e médicos relatam resultados similares, tais como o aumento de apetite, redução de dores e retorno às atividades diárias (BELLAVITE *et al.*, 2006).

Os CHIs são produtos naturais que representam uma nova forma de terapia imunomoduladora. São aquosos, inodoros e incolores. Atualmente nosso grupo de pesquisa trabalha com cinco diferentes CHIs. Estudos prévios demonstraram que estes complexos ativam macrófagos tanto *in vivo* como *in vitro*. Dentre estes estudos, destacam-se os seguintes resultados com um dos CHI: a) a produção do fator de necrose tumoral (TNF- α) por macrófagos *in vitro* foi significativamente diminuída (PIEMONTE; BUCHI, 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 endosomal/lisosomal assim como a atividade fagocítica dos macrófagos em interação com *Saccharomyces cerevisiae* e *Trypanosoma cruzi* epimastigotas foi aumentada (LOPES *et al.*, 2006); d) os efeitos modulatórios também foram observados tanto *in vivo* como *in vitro* na infecção experimental por *Leishmania amazonensis* e *Paracoccidioides brasiliensis*, controlando a progressão e disseminação da infecção (PEREIRA *et al.*, 2005; TAKAHACHI *et al.*, 2006). Além destas propriedades, os CHIs testados nas concentrações das matrizes em sua composição não se demonstraram tóxicos e nem mutagênicos em ensaios citogenéticos (SELIGMANN *et al.*, 2003).

A resposta imunitária proveniente do tratamento em questão também foi demonstrada em estudos com Sarcoma 180, que mostrou uma remissão de 30% dos tumores. Nas massas tumorais que permaneceram, houve significante redução do volume tumoral, assim como significante infiltração leucocitária, granulação tecidual e fibrose circundante ao tumor. No grupo tratado, todos os animais sobreviveram. Ainda, o tratamento aumentou o número total de leucócitos, especialmente os linfócitos T, onde houve aumento proporcional de células Th, B e NK (SATO *et al.*, 2005), sugerindo uma ação direta ou indireta na hematopoiese. Conseqüentemente, estudos *in vitro* e *in vivo* com células de medula óssea foram realizados utilizando técnicas microscópicas, bem como a citometria de fluxo, os quais revelaram que a linhagem monocítica (CD11b⁺) e as células estromais foram ativadas pelo tratamento (ABUD *et al.*, 2006; CESAR *et al.*, 2008).

A análise da expressão gênica de macrófagos tratados demonstrou alterações na expressão de diversos genes relacionados à imunidade, dentre estes o aumento da expressão do MHCII e das células CD11c⁺ (células dendríticas – apresentadoras de antígenos), bem como da citoproteção (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Com o aumento de diversas moléculas que conferem a citoproteção, existe a perspectiva de melhor tolerância e até possibilidade de aumento da dose dos medicamentos convencionais, levando a uma maior aderência ao tratamento. O tratamento homeopático é também utilizado como forma de medicina complementar a tratamentos convencionais na oncologia. Neste caso, objetiva-se principalmente a minimização dos diversos efeitos colaterais provenientes da quimioterapia. Resultados promissores com relatos positivos de melhora da qualidade de vida dos pacientes vem sido relatados (LAENGLER *et al.*, 2008).

Assim, fazem-se necessários novos estudos que envolvam a ação dos CHIs sobre células tumorais, em especial em melanoma, buscando contribuir para um maior conhecimento sobre os mecanismos de ação desse tipo de medicamento na atividade imunitária antitumoral, além de propor uma possibilidade terapêutica complementar no tratamento de neoplasias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Plano de trabalho

- 3.1.1. Os CHIs que alteram a resposta imunológica, baseado na capacidade de influência das concentrações de células imunitárias, foram selecionados por: estudo *in vivo* com camundongos suíços albinos, visando a análise da concentração de células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD11b⁺, CD19⁺, CD45⁺, Dx5⁺ (pan-NK), por citometria de fluxo, obtidas de linfonodos murino, após tratamento *in vivo*;
- 3.1.2. Os CHIs selecionados foram avaliados *in vitro* sob: o potencial de ativação fagocitária de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 por ensaio de fagocitose de beads-FITC opsonizados por soro fetal bovino, analisados por citometria de fluxo e microscopia confocal e avaliação em modelos com linhagens repórteres para a atividade do IFN do tipo I e II (MxRage) e pNF-κB (HT29 GFP transfectada para p-NF-κB).
- 3.1.3. As alterações celulares ocasionadas pelos CHIs utilizados nas células de melanoma murino B16F10 em cultura, foram avaliadas com as seguintes estratégias:
 - 3.1.3.1. Estudo da viabilidade celular pela incubação com marcador fluorescente intercalante no DNA (7-AAD) e análise em citometria de fluxo.
 - 3.1.3.2. Análise do comportamento proliferativo das células tratadas ou não com CHIs, pela observação das diferentes fases do ciclo

celular, após incubação com o marcador iodeto de propídeo (ao DNA total) e análise em citometria de fluxo.

3.1.3.3. Expressão das biomoléculas: CD74 e E-Caderina.

3.1.3.4. Avaliação da capacidade invasiva das células tumorais, submetidas à adesão previa em “coat” de Matrigel em placas Transwell e atraídas quimiotaticamente pela cobertura inferior de fibronectina.

3.1.4. Os estudos do efeito do tratamento de CHIs em modelo de metástase pulmonar de células B16F10, em camundongos C57BL/6, foram realizados com as seguintes abordagens:

3.1.4.1. Avaliação dos leucócitos do sangue periférico coletado, avaliando a contagem diferencial de neutrófilos, linfócitos, monócitos, basófilos e eosinófilos, por esfregaço sanguíneo.

3.1.4.2. Imunofenotipagem de linfócitos (CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, PanNK⁺) em leitura por citometria de fluxo.

3.1.4.3. Por avaliação da histopatologia de diferentes tecidos, como baço e pulmão, por técnicas de coloração padrão (Hematoxilina/Eosina e ácido periódico de Shiff) e análise em microscopia óptica convencional, buscou-se evidenciar a presença ou ausência de nódulos metastáticos e infiltrado leucocitário.

3.1.4.4. Por marcação histoquímica e imunomarcção de cortes histológicos de pulmão, e observação em microscopia óptica, buscou-se evidenciar a presença ou ausência de infiltrado leucocitário e expressão de perlecan em nódulos metastáticos.

3.2. Complexos homeopáticos imunomoduladores

Os complexos homeopáticos representam nova forma de imunoterapia e segue as técnicas homeopáticas de Hahnemann. Tinturas-mãe são adquiridas a partir de agências autorizadas e indicadas pelo Ministério de Saúde que asseguram a qualidade (livre de endotoxinas) e a composição físico-química dos produtos. A partir destas tinturas-mães originais e padronizadas, são realizadas diversas diluições decimais de Hahnemann (dH) em água destilada. Assim, os CHIs constituindo compostos altamente diluídos. Em nossos experimentos, combinações de CHIs e o veículo dos mesmos (controle) foram manipulados e codificados por Narciso da Lozzo Neto (CRF-PR 5604, Homeoterápica (<http://www.homeoterapica.com.br/>)). Estes medicamentos, assim como o veículo dos mesmos, foram codificados aleatoriamente em números. Assim, ao recebermos os CHIs não tivemos idéia de quais são e, muito menos, qual destes e o controle. De qualquer forma, os compostos em questão foram re-codificados aleatoriamente pelo Prof. Edvaldo Trindade, o qual esteve presente na parte experimental de tratamento e levantamento de dados. Desta forma, esperou-se efetuar um estudo duplo cego randomizado no qual os códigos determinados foram revelados no final do estudo. Para ensaios *in vitro* os medicamentos foram esterilizados por filtração em membranas estéreis 0,22 µm (Millipore). Todos os CHIs foram mantidos em local escuro à temperatura ambiente e vigorosamente sucussionados antes de cada tratamento experimental. Os seguintes complexos, cujo código duplo cego só foi revelado no final do projeto, foram utilizados neste estudo:

- *Calcarea carbonica* e associações;
- *Cinnamomum verum* e associações;
- *Chelidonium majus* e associações;
- *Curcuma longa* e associações;
- *Echinacea purpurea* e associações;
- Solução hidroalcolica (veículo de diluição dos complexos acima).

3.3. Animais

Todas as recomendações da Lei Nacional (No. 6.638, 5 de Novembro de 1979) para procedimentos científicos com animais foram seguidas e as práticas foram previamente aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animais da UFPR (Cópia do certificado anexada). Os linfócitos utilizados nos ensaios experimentais de imunofenotipagem de resposta Th1/Th2 da triagem prévia dos medicamentos imunomoduladores foram retirados de camundongos suíços albinos de 2-3 meses de idade do Biotério da UFPR. Para ensaios com o modelo de melanoma foram utilizados camundongos da cepa C57BL/6. Antes da extração das células/tecidos, os animais foram anestesiados com administração intraperitoneal de 100 µl de tiopental sódico diluído conforme instrução do fabricante (Tiopentax – Cristalia®). Ao ser detectado inconsciência, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical ou por guilhotina no caso dos camundongos C57BL/6 para a extração de maior volume do sangue periférico.

3.4. Triagem *in vivo* em camundongos suíços albinos

Camundongos suíços albinos de 2-3 meses de idade, foram tratados por sete dias, com os devidos medicamentos acima, sendo que estes foram à única fonte de bebida dos animais. Os animais foram pesados antes e após o tratamento, assim como o volume de medicamento ingerido pelos animais diariamente. Controles foram incorporados em grupos de animais durante o tratamento e consistirão em: a) Grupo Solução Hidroalcolica (diluyente convencional dos medicamentos) e b) Grupo Controle (apenas água normal/Ouro Fino sendo ministrada). No oitavo dia, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os linfonodos mesentéricos foram extraídos para análises. O tecido linfóide foi dissociado em PBS utilizando dissociadores teciduais

Medicons (BD) e a suspensão resultante foi filtrada em Filcons 100 μm (BD) para a remoção de fragmentos teciduais. A suspensão celular foi lavada por centrifugação com PBS, por três vezes a 1200 rpm por 5 minutos cada, sendo posteriormente as células contadas com contador automatizado de células (CELM).

3.5. Estudo *in vitro* sobre a atividade do IFN do tipo I e II, pNF- κ B e fagocitose

Células MxRage: Células fibroblásticas embrionárias murinas transformadas, para indicarem a expressão de interferon do tipo I e II por eGFP, através do sistema CRE-recombinase dirigida para o promotor Mx1 que promove expressão conjunta de GFP com IFN do tipo I e II (BOLLATI-FOGOLÍN, MULLER, 2006). As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), em atmosfera úmida a 35° C contendo 5% CO₂.

Células HT29: Células de adenocarcinoma colo-retal humano transfectadas com o plasmídeo pNF- κ B-hrGFP do PathDetect Signal Transduction Pathway cis-Reporting System Kit (Stratagene) foram utilizadas. As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, em atmosfera úmida a 37° C contendo 5% CO₂.

Durante os experimentos ambas as células MxRage como HT29 foram plaqueadas em placas 96 poços (5x10⁵/ml) e mantidas por 24 h para a entrada na fase log. O meio de cultura foi descartado e substituído por novo e então as células foram tratadas durante 24 h com dose inicial de 20% dos CHIs. No final do tratamento, as células foram soltas da placa pelo tratamento enzimático (tripsina), lavadas com DMEM contendo 10% de SFB, e ressuspensas com PBS na presença de 1% de SFB. As células foram aliqüotadas em tubos que foram divididos em análises de viabilidade, e expressão de GFP. Foram adquiridos 20.000 eventos por amostras em citômetro de fluxo CyAn (DakoCytomation), através do software Summit 4.3. (DakoCytomation).

3.6. Estudo *in vitro* com células de melanoma murino B16F10

Células de melanoma murino: Células da linhagem B16F10 foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Sílvio Marques Zanata do Departamento de Patologia Básica, para serem utilizadas nos ensaios. As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, contendo penicilina 1 U/ml, estreptomicina 1 µg/ml, e anfotericina 2,5 µg/l, em atmosfera úmida a 37° C contendo 5% CO₂.

3.7. Análises por citometria de fluxo de células B16F10 tratadas *in vitro*

Células B16F10 foram plaqueadas (5×10^4 /ml) e mantidas por 48 h para a entrada na fase log. O meio de cultura foi descartado e substituído por novo e então as células foram tratadas durante 48 h com dose inicial de 20% dos medicamentos selecionados em 3.4. e posterior dose reforço de 1% em intervalos de 24 h. No final do tratamento, as células foram soltas da placa pelo tratamento enzimático (tripsina), lavadas com DMEM contendo 10% de SFB, e ressuspendidas com PBS na presença de 1% de SFB. As células foram aliqüotadas em tubos de análise que foram divididos em análises de viabilidade, proliferação e marcação para averiguação de expressão de determinados marcadores. Foi adquirido 20.000 eventos por amostras em citômetro de fluxo FACSCalibur, através do software CellQuest (BD).

3.8. Viabilidade celular por marcação com 7-AAD

Para o ensaio de viabilidade, em células B16F10, MxRage e HT29, foi adicionado o marcador 7-AAD (BD Pharmingen) na concentração final de 0,25

$\mu\text{g/ml}$ na solução celular com incubação de 5 minutos prévia a análise. As células positivas para o marcador, que é um intercalante de DNA e penetra apenas em células com ruptura de membrana, foram quantificadas como inviáveis.

3.9. Expressão de biomoléculas relacionadas com malignidade

A expressão de CD74 intra e extracelular e E-Caderina em células B16F10 foram detectadas por marcação com o respectivo anticorpo/anticorpo secundário conjugado com PE conforme diluição e tempo de incubação sugerido pelo fabricante. O protocolo de incubação com o anticorpo varia conforme o fabricante, usualmente consiste na diluição do mesmo em PBS contendo 1% de SFB e incubação por 1h. Antes da incubação do anticorpo secundário, que é da mesma maneira, há etapas de lavagens com PBS da solução de células previamente marcadas com o primário. O CD74 endógeno e a E-Caderina, pelo fato de serem marcadores intracelulares, foram analisados após permeabilização celular em solução de saponina 0,01% em PBS por 10 minutos.

3.10. Análise de ciclo celular

Para detecção e quantificação das respectivas fases do ciclo celular ($G_{0/1}$, S e G_2) para análise de potencial de proliferação, as células foram processadas conforme descrito por Dua e Gude, 2006 com modificações. As soluções contendo 10^6 células por amostra foram lavadas 2 vezes em PBS e então ressuspendidas em álcool etílico 70% e mantidas em -20°C por ao menos 20 h. As amostras foram lavadas com PBS e incubadas com solução de RNase a 5mg/ml e iodeto de propídio a $50\mu\text{g/ml}$ por 1 h.

3.11. Detecção de capacidade invasiva sobre matrigel

A capacidade invasiva das células B16F10 após tratamento *in vitro*, como descritos no item 3.7., com os medicamentos utilizados nos ensaios *in vivo* foi avaliado sobre a capacidade das células de transporem uma barreira de matrigel em placas Transwell de poros de 8 μm . O ensaio foi realizado conforme descrito por Zhao *et al.*, 2001. Membranas de policarbonato com poros de 8 μm de placas de co-cultura 24-wells (Corning-Costar, Cambridge, MA) foram pré-revestidas com 5 μg de fibronectina em um volume de 10 μl no lado inferior para indução de quimiotaxia celular para esta região e secadas a temperatura ambiente. Matrigel (BD) foi diluído a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ com PBS gelado e aplicado na superfície superior da membrana a 5 μg e secada a temperatura ambiente. Células B16F10 tratadas foram tripsinizadas na fase log para sua desaderência, lavadas com DMEM contendo 10% de SFB, e ressuspensas com DMEM contendo 0,1% BSA. Suspensões celulares foram adicionadas nos compartimentos superiores em 100 μl a uma concentração de 2×10^6 células/ml. As câmaras foram incubadas por 8 h em atmosfera úmida a 37°C contendo 5% CO_2 . Após este período, os filtros foram processados para microscopia eletrônica de varredura (MEV). Após o cultivo, as membranas com as células foram lavadas 2x com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e a 37°C. Posteriormente Após o tempo de cultivo, as células foram fixadas com glutaraldeído 2,5% (0,1 M tampão cacodilato, pH 7,2), lavadas e pós-fixadas com OsO_4 1% por 30 minutos em temperatura ambiente e no escuro. Após lavagem com tampão cacodilato 0,1 M, as células foram desidratadas utilizando concentrações crescentes de etanol, desidratadas por ponto crítico de CO_2 , metalizadas com ouro e analisadas no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM – 6360 LV SEM no Centro de Microscopia da UFPR ou no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC. As eletromicrografias foram analisadas pelo software ImageJ (NIH) na qual foi selecionado e quantificado a área em pixels dos poros 8 μm da membrana do transwell. Quanto mais

degradação do matrigel sobre a membrana, maior a exposição dos poços e maior a área negra exposta e detectada pela ferramenta “threshold” do software.

3.12. Estudo em camundongos C57BL/6

Camundongos C57BL/6 de 2-3 meses de idade, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR ou da Unidad de Animales Transgênicos y de Experimentación do Instituto Pasteur de Montevideu (IPMon) foram utilizados. Para os ensaios *in vitro*, macrófagos peritoneais destinados a experimentos de fagocitose foram adquiridos por lavagem peritoneal com PBS a 4°C após a eutanásia dos animais por deslocamento cervical. A solução celular foi plaqueada em placas de 24 poços para análise por citometria de fluxo e em placas LabTeK II 8 poços (Nunc, Thermo Fisher Scientific) para análise em por microscopia confocal. A solução de células do lavado peritoneal foi mantida a 37°C por 15 minutos para a seleção por aderência de macrófagos, com posterior remoção do sobrenadante com células não aderidas e deposição de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com contendo penicilina 1 U/ml, estreptomicina 1 µg/ml, e anfotericina 2,5 µg/l e 10% SFB (BUCHI, de SOUZA, *et al.* 1993).

Para os ensaios *in vivo* de melanoma metastático pulmonar, os camundongos desenvolveram a patologia experimental após injeção intra-venosa de 5×10^5 células de melanoma murino B16F10 em DMEM sem soro (grupo B16F10) na veia caudal dos animais. Após 24 horas da inoculação, foram tratados por 15 dias com os medicamentos previamente selecionados como os candidatos imunomoduladores mais significativos dentre a triagem *in vivo* nos camundongos albinos suíços. O tratamento consistiu na administração inalante dos medicamentos a cada 12 horas durante 10 min. em câmara inalante modificada, acoplada a inalador convencional Inalar (NS) adaptada conforme descrito por

McConville et al., 2005 para tratamento inalante de pequenos roedores em ensaios in vivo (Figura 3).

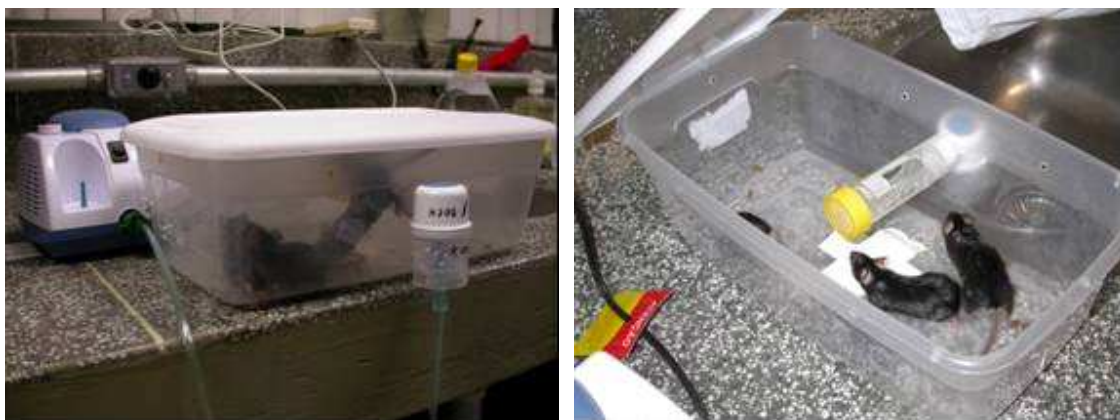


Figura 3: Câmara inalante adaptada conforme McConville *et al.*, 2005 a um inalador convencional para o tratamento por via respiratória de modo que a biodisponibilidade dos medicamentos esteja destinado principalmente ao local da patologia, o pulmão. Os tratamentos foram realizados na câmara em grupos de até 5 animais por vez, durante 10 min a cada 12 h por 15 dias. Cada grupo possuiu câmara e acessórios exclusivos para cada tratamento.

Após a indução á inconsciência por injeção de 100 μ l intraperitoneal de tiopental sódico (Thiopentax, Cristalia), os animais foram pesados e fotografados para detecção de alteração de massa corpórea. A seguir, os animais foram ortotunaziados e dissecados cirurgicamente de modo a obter-se os pulmões após a decapitação para coleta previa do sangue periférico total em tubo com EDTA dissódico (BD Vacutainer). Os pulmões foram analisados sobre estereomicroscopio e os nódulos metastáticos (negros devido à produção de melanina das células de melanoma) foram quantificados macroscopicamente. Os pulmões e baço foram submetidos a processamento histológico com fixação com paraformaldeído a 4% em PBS pH 7,2 durante 1 hora, seguida da desidratação progressiva em etanol, xilol e ao final, inclusão em parafina. Do sangue coletado, foram retiradas alíquotas para imunofenotipagem de células imunitárias periféricas por citometria de fluxo e contagem diferencial por esfregaço sanguíneo, conforme descrito a seguir.

3.13. Fagocitose de beads por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 tratados *in vitro*

A atividade fagocítica de macrófagos peritoneais dos camundongos C57BL/6 foi acessada por cultivo por 48 h dos macrófagos a 10^6 células/ml em placas 24 poços para análise por citometria de fluxo e em placas LabTeK II 8 poços (Nunc, Thermo Fisher Scientific) sob tratamento inicial de 20% dos medicamentos com dose reforço de 1% após 24 h. Para o cultivo celular, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e as células foram retiradas da cavidade peritoneal por lavagem com PBS pH 7,4 a 4°C. As células foram plaqueadas e incubadas a 37°C em estufa de CO₂. Após 15 minutos de incubação, as células não aderentes foram removidas por lavagem com PBS pH 7,4 a 37°C e as aderentes foram cultivadas em DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal, contendo penicilina 1 U/ml, estreptomicina 1 µg/ml, e anfotericina 2,5 µg/l, em atmosfera úmida a 37°C contendo 5% CO₂.

Após as 48 h de tratamento, o sobrenadante foi removido, as células foram lavadas com DMEM a 37°C 2x, e então incubadas com solução de DMEM com beads aldeído-sulfatados conjugados com FITC e opsonizados com SFB (Molecular Probes, Invitrogen). Os beads foram sonificados 1x e diluídos 1:1000 em solução de DMEM, foram então incubados com os macrófagos na proporção 10^6 células / 200 µl de solução de beads durante 40 minutos. As células foram lavadas com PBS a 37°C 2x e desaderidas com fluxo de PBS a 4°C. Alíquotas das células desaderidas foram incubadas com o anticorpo anti-F4/80-PE para a quantificação da proporção de macrófagos e regionalização dos mesmos em Gates de FSC e SSC para a correta mensuração da fagocitose dos mesmos. 5000 células foram adquiridas e analisadas pelo software Summit 4.3 no citômetro de fluxo de alta performance CyAn (DakoCytomation).

Para a análise de fagocitose por microscopia confocal, as células nas placas LabTeK II foram fixadas com paraformaldeído 2% em PBS por 30 min.,

lavadas, incubadas com solução de Glicina 0,1M em PBS por 2 min. para bloqueio de radicais aldeídos provenientes da fixação, incubadas com solução de saponina 0,01% e TO-PRO 3 diluído a 1:500 (Molecular Probes, Invitrogen) em solução de PBS por 15 minutos para a marcação nuclear. Após a incubação com solução de TO-PRO 3, as células foram lavadas 2x com PBS e as lamínas foram confeccionadas com solução de glicerol / PBS a 1:1 e analisadas em microscópio confocal LEICA TCS SP5. As imagens foram adquiridas no software LAS AF Lite 1.8.2. O diagrama esquemático a seguir mostra a estratégia experimental utilizada na análise de fagocitose.

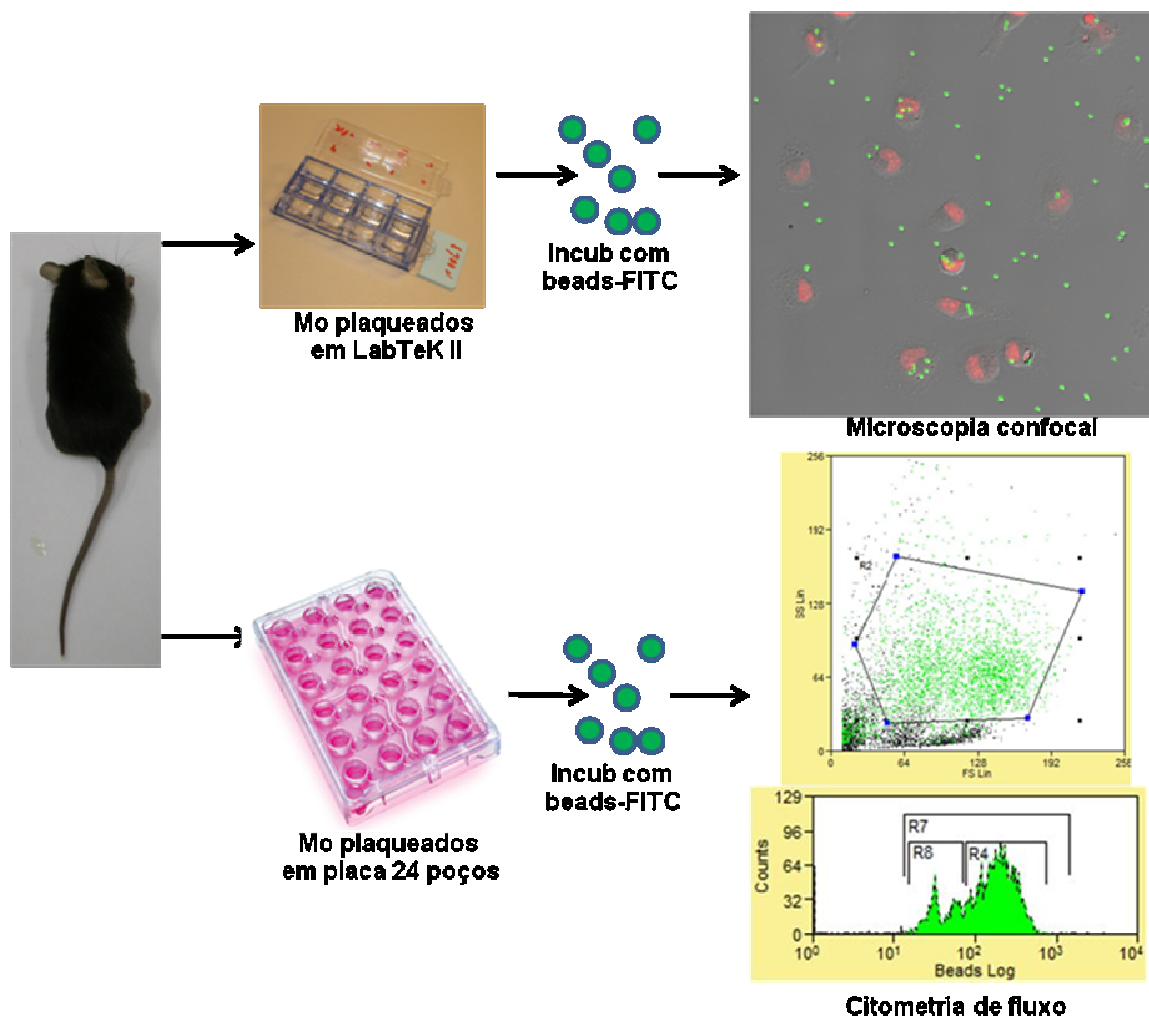


Figura 4: Diagrama esquemático representando a estratégia utilizada para o ensaio de fagocitose de Beads-FITC *in vitro* por macrófagos peritoneais extraídos de camundongos C57BL/6 eutanasiados. Na microscopia confocal a fagocitose foi analisada pela sobreposição das imagens adquiridas do campo claro, fluorescência vermelha (TO-PRO 3 – marcação nuclear dos macrófagos) e fluorescência verde (FITC). Na citometria de fluxo, a partir da marcação do anticorpo-F4/80, o “gate” dos macrófagos foi conFigurado nos parâmetros SSC e FSC e deste foi gerado histogramas representando valores de células que fagocitaram poucos beads (R8), muitos (R4) ou nenhum, sendo este os valores afora de R7.

3.14. Imunofenotipagem de células obtidas de linfonodo mesentérico após tratamento *in vivo*

Para conhecer os subtipos da população de células imunitárias, presentes nos linfonodos dos camundongos tratados e analisar a capacidade de alterações das concentrações dos subtipos, foram realizadas imunofenotipagens por citometria de fluxo dos animais tratados ou não com CHIs (controle). Os camundongos foram eunatanaziados no oitavo dia de tratamento e as células obtidas de seus linfonodos, como descrito anteriormente, foram incubadas (10^6 /ml) com os anticorpos descritos na tabela 1 na concentração recomendada pelo fabricante, por 30 minutos, lavadas 3x por centrifugação a 2000 rpm por 3 min e ressuspensão em PBS. A seguir, as células marcadas foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur conforme plataforma gráfica ilustrada na Figura 4.

Ainda, puderam ser avaliadas quanto à morfologia (FSC) e quanto à complexidade celular (SSC). Em ambos os casos, foi adquirido 20.000 eventos por amostra, os quais foram avaliados no software CellQuest (BD). As médias de cada subpopulação de células e a correspondente significância estatística (ANOVA unifatorial e teste Tuckey) foram tabuladas e analisadas para cada medicamento.

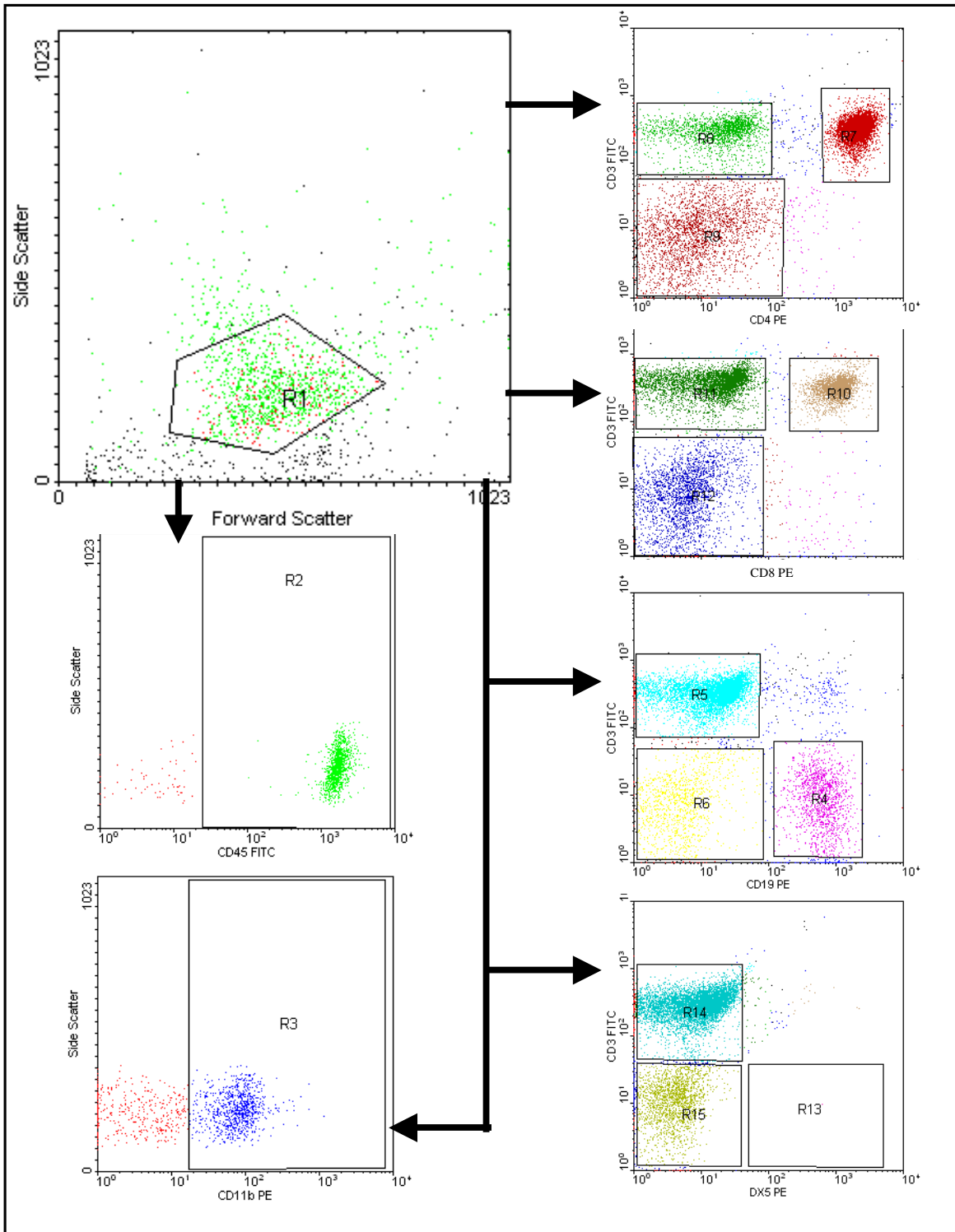


Figura 5: Plataforma de aquisição demonstrando a estratégia de Gates a partir do gráfico inicial de morfologia (Foward Scater – Tamanho; Side Scater – Granulosidade celular).

Tabela 1: Anticorpos utilizados na imunofenotipagem por citometria de fluxo

Anticorpo	Marcação	Combinação
Isotype IGG-PE	Marcação não específica	Isotype IGG-FITC
Isotype IGG-FITC	Marcação não específica	Isotype IGG-PE
Anti CD3-FITC	Linfócitos T	Anti CD4-PE, CD8-PE, CD19-PE, PanNK(Dx5)-PE
Anti CD4-PE	Linfócitos T (Resp. TH2)	Anti CD3-FITC
Anti CD8-PE	Linfócitos T (Resp. TH1)	Anti CD3-FITC
Anti CD19-PE	Linfócitos B (Resp. TH2)	Anti CD3-FITC
Anti PanNK(Dx5)-PE	Linfócitos NK (Resp. TH1)	Anti CD3-FITC
Anti CD11b-PE	Células dendríticas, macrófagos	-----
Anti CD45-FITC	Leucócitos gerais	-----
Anti CD16/32	Fc block	Marcação prévia a todos os anticorpos anteriores
Anti F4/80-PE	Macrófagos	Marcação prévia ao ensaio de fagocitose por citometria

Os anticorpos acima foram utilizados na imunofenotipagem de células de linfonodo ou de sangue periférico por citometria de fluxo. Todos os anticorpos abaixo foram adquiridos da BD Pharmingen. Os controles isotípicos ("Isotype control") foram utilizados para detectar marcações inespecíficas dos anticorpos às células. O Fc block (Anti CD16/32) foi marcado em todas as amostras antes da marcação dos demais anticorpos para minimizar a possibilidade de marcação inespecífica de IGG em receptores Fc de células dendríticas / macrófagos. As combinações de anticorpos anti CD4, CD8, CD19, PanNK(Dx5) foram realizadas em conjunto ao anti CD3 para maior precisão de detecção, onde células CD4⁺ e CD8⁺ são CD3⁺ enquanto células CD19⁺ e PanNK(Dx5)⁺ são CD3⁻. O anticorpo anti F4/80 foi utilizado para posicionar e delimitar o gate específico à subpopulação celular dos macrófagos no ensaio de fagocitose.

3.15. Imunofenotipagem e contagem diferencial de células de sangue periférico após tratamento *in vivo* com camundongos C57BL/6 tratados após inoculação de células tumorais na veia caudal

Para conhecer os subtipos da população de células imunitárias presentes no sangue periférico de camundongos, portadores de melanoma metastático pulmonar a partir de indução por injeção de células B16F10 por via caudal e analisar alterações dentre os subtipos para averiguação de tendência de padrão de resposta imunológica baseado nas concentrações de subtipos celulares, foi realizado imunofenotipagem dos grupos por citometria de fluxo. A combinação de anticorpos de detecção celular e a estratégia de “gates” foram realizadas conforme o mesmo procedimento descrito anteriormente. As células de sangue periférico colhido no décimo quinto dia após o tratamento nos camundongos C57BL/6 foram analisadas com os mesmos anticorpos descritos na tabela 1. Porém, o número de leucócitos foi determinado em contador automatizado CELM e as hemácias foram lisadas por incubação com BD PharmLise após a incubação com os anticorpos. Para contagem de polimorfonucleares e monócitos foi realizado esfregaço sanguíneo e coloração de May-Gründ-Giemsa (Kit. Instant Prov, NewProv), para posterior contagem diferencial de neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos em microscópio óptico.

3.16. Histoquímica e Imunohistoquímica

Os órgãos dissecados (pulmão e baço) foram processados para histologia conforme descrito anteriormente. Foram obtidos cortes de 5 µm por microtomia, utilizados em análise histopatológica por coloração de hematoxilina / eosina (HE).

Para detecção de marcadores relacionados com malignidade em nódulos metastáticos e de infiltrados de células imunitárias, foi realizada a técnica de

imunoperoxidase para a identificação da marcação dos anticorpos, conforme descritos na tabela 2. A partir da reação da peroxidase associada à estreptavidina, que reconhece biotina associada ao anticorpo secundária biotinilados e precipitará o substrato DAB ou o TMB após reação com o peróxido de hidrogênio nos cortes histológicos. Os cortes histológicos foram obtidos em ultramicrótomo LEICA RM2145 sob espessura de 5 μ m e depositados em lâminas previamente cobertas de TissueTack (EMS), para a aderência do corte. Os cortes foram desparafinizados e hidratados por 3 imersões em xilol P.A. por 5 min cada, 3 imersões em álcool etílico P.A. por 5 min cada, 1 imersão em álcool etílico 95% por 2 min e 1 imersão em PBS pH-7.2 por 5 min. Em seguida as lâminas foram incubadas em solução de metanol com peróxido de hidrogênio a 3% por 40 minutos para bloqueio de peroxidases endógenas. Após lavagem com PBS, as lâminas foram: incubadas com glicina 0,1M em PBS por 2 minutos para bloquear sítios aldeídicos provenientes da fixação; lavadas com PBS; incubadas com solução de BSA 1% em PBS por 30 min para bloqueio dos sítios inespecíficos. Em seguida as lâminas foram incubadas inicialmente com os anticorpos primários seguidos pelos secundários/HSP ou com streptavidina/HSP por 2 h a temperatura ambiente. Os anticorpos, citados na tabela 2, foram diluídos conforme instrução do fabricante em PBS com BSA a 1%. A reação foi feita por incubação com BD DAB Substract Kit ou com BD TMB Substract Kit por 20 minutos sob proteção da luz. A reação foi interrompida após o término da incubação por lavagem com água destilada e as lâminas foram contra-coradas com Giemsa por 5 min. As lâminas foram lavadas 3 vezes com água destilada, desidratadas por álcool etílico (95 a 100 GL) e xilol 3x por 5 min cada. A seguir as lâminas foram montadas com entellan (EMS) e lamínulas.

Tabela 2: Anticorpos utilizados na técnica de imunohistoquímica/histoquímica

Anticorpo ou marcador	Marcação	Combinação
BD mouse Isotype IGG	Marcação não específica	IGG/HSP
Affinity Bior. mouse Anti-Perlecam	Perlecam (proteoglicano de HS)	IGG/HSP
BD rat Anti-mouse/HSP	Marcação secundária de anticorpos	Reação com DAB

Os anticorpos foram utilizados na imunohistoquímica/histoquímica dos tecidos processados para microscopia óptica. O controle isotípico (Isotype control - BD mouse Isotype IGG) foi utilizado para detectar marcações inespecíficas dos anticorpos às células. A combinação dos anticorpos primários foi feita com o anticorpo primário proveniente de "mouse", seguido pelo anticorpo secundário correspondente, proveniente de "rat" e conjugado com HSP.

3.17. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados ao menos três vezes e em triplicata para serem submetidos à análise de variância (ANOVA) fator único e pós-teste de Tukey para determinar significância à *P < 0.05 e **P < 0.01. A análise estatística foi realizada após a transformação dos dados pela equação $T = \sqrt{x+0.5}$ para conferir a distribuição normal dos dados.

3.18. Revelação do código duplo cego de M1 e M8

M1 = *Chelidonium majus* e associações; M8 = *Calcarea carbonica* e associações.

4. CAPÍTULO 1: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DOS CHIS

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Triagem *in vivo* dos CHIs em camundongos suíços albinos

Inicialmente os diversos CHIs a serem estudados foram previamente testados em camundongos suíços albinos, com o propósito de averiguar o potencial de influência nas proporções de células imunitárias. Para tanto, foram utilizados anticorpos específicos, com posterior análise do perfil de marcação, obtidos em citometria de fluxo. Os resultados estão expressos na Figura 6, onde observa-se que após o tratamento *in vivo* observa-se diversas alterações nas concentrações celulares de: CD3⁺CD4⁺ (Th), CD3⁺CD8⁺ (Tc), CD3⁻CD19⁺ (B), CD3⁻Dx5⁺ (NK) e CD11b⁺ (Monócitos).

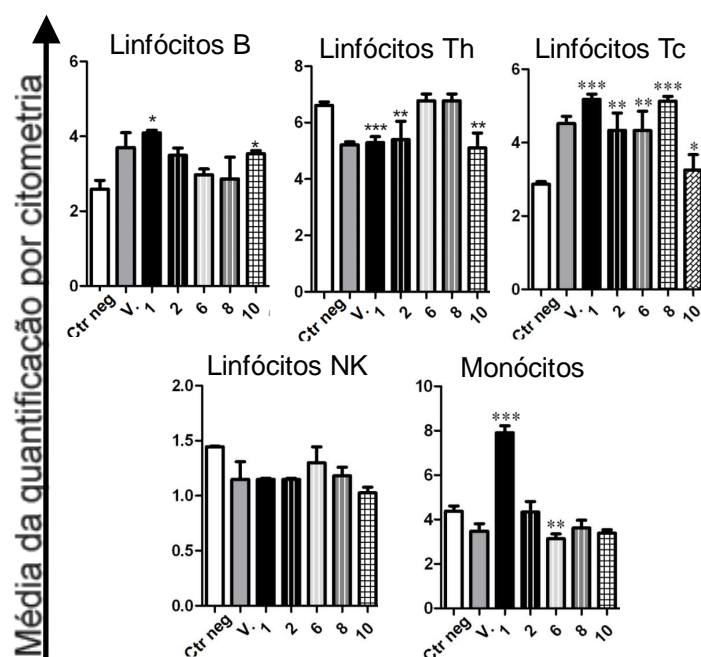


Figura 6: Avaliação dos diferentes CHIs sobre o potencial de influência sob as proporções de células imunitárias (tendências de respostas Th1/Th2). Camundongos suíços albinos foram tratados por 1 semana com os diferentes CHIs. Após o tratamento os linfonodos mesentéricos foram removidos e seu conteúdo celular foi avaliado por imunomarcagem específica para linfócitos, utilizando anticorpos específicos conjugados com marcadores fluorescentes a posterior análise em citometria de fluxo. M1 foi o composto com maior influência sobre diversos linfócitos. O eixo y representa a média após distribuição normal. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

M1 foi o composto que apresentou maior aumento nas concentrações de células $CD3^+CD8^+$, $CD3^+CD19^+$ e $CD11b^+$ (Fig. 6), as quais são envolvidas nas respostas imunes celulares e humorais em diversas patologias. O composto M8 por sua vez, aumentou as proporções das células $CD3^+CD8^+$, que são envolvidas nas respostas celulares. Este composto também exerceu grande influência em macrófagos e em células de medula óssea, promovendo a produção de óxido nítrico e o aumento de produção de células $CD45R/B220^+$, respectivamente (dados não mostrados). Dentre os diversos compostos testados, o M1 e o M8 foram então selecionados para os estudos posteriores.

4.1.2. M1 e M8 não alteram a expressão de interferon tipo I e II

O ensaio *in vitro* com células MxRage objetivou averiguar a influência dos CHIs sobre a expressão do interferon tipo I e II. Porém, quando as células foram tratadas com M1 ou com M8, não foram detectadas alterações na expressão do IFN, tanto na presença, quando na ausência do agonista IFN- α (Figura 7).

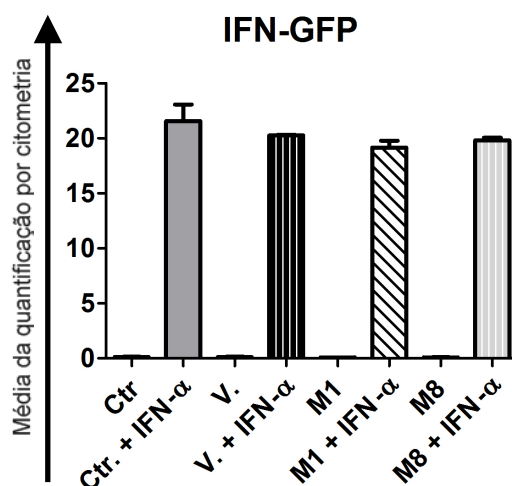


Figura 7: Detecção da capacidade de influência do M1 e do M8 sobre a expressão de IFN do tipo I e II. Células MxRage, quando estimuladas com IFN- α produzem um IFN com GFP flanqueado. Assim, as células foram tratadas com M1 ou M8 por 24 hrs na ausência ou na presença de IFN- α (agonista). Após o tratamento, as células foram avaliadas em citometria de fluxo. Não foram observadas diferenças na expressão do interferon tipo I e II (GFP^+) após tratamento com M1 ou M8. Ctr. = controle (células sem nenhum tratamento); V. = Células tratadas com o veículo dos compostos. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

4.1.3. M1 altera a atividade de pNF-κB

Para avaliar a possível ação de M1 e de M8 sobre a ativação do pNF-κB foi utilizado células de adenocarcinoma de colon-retal humano (linhagem HT29) alteradas geneticamente para produzir GFP quando pNF-κB está ativado. Assim, as células foram expostas para os compostos (M1 ou M8), na ausência ou na presença do agonista (TNF-α) por 24 horas. Após o período de exposição, foi observado alterações na ativação do pNF-κB induzida por TNF-α, somente com o tratamento de M1 (Fig. 8). A partir deste resultado foi realizada uma segunda triagem nas células HT29 com o M1, agora utilizando diferentes concentrações (10% e 30%, isto é, uma concentração inferior e outra superior a dose convencionalmente utilizada, que é de 20%). Os resultados obtidos foram similares, mostrando a significativa redução na ativação do pNF-κB nos grupos com tratamento conjunto ao TNF-α (Fig. 8).

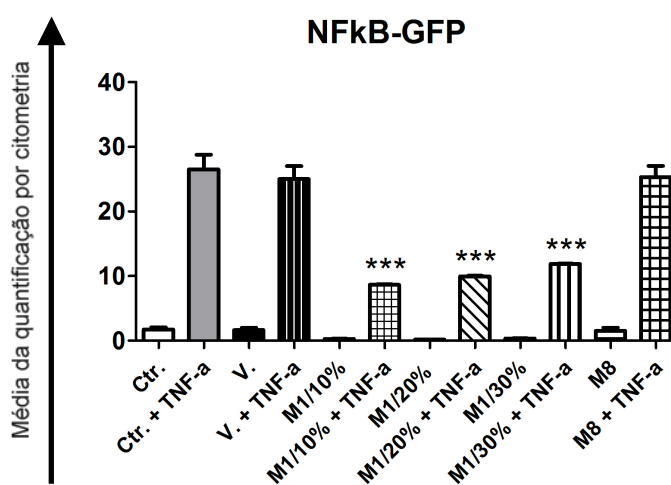


Figura 8: Avaliação do potencial de influência sobre a ativação do pNF-κB em células tumorais. As células HT29 foram tratadas com M1 ou com M8 por 24 horas, na ausência ou na presença de TNF-α (agonista). A seguir, as células foram avaliadas quanto a expressão de pNF-κB, em citometria de fluxo, observando o pico para a emissão de GFP. M1 demonstrou grande potencial de diminuição da ativação do pNF-κB induzida por TNF-α, mesmo em diferentes concentrações (10%, 20% e 30%). M8 não influenciou as células na ativação do pNF-κB induzida por TNF-α. Ctr. = controle (células sem nenhum tratamento); V. = Células tratadas com o veículo dos compostos. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

4.4. M1 e M8 não alteram a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais obtidos de C56BL/6

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram tratados por 48 h com os CHIs e submetidos a ensaio de fagocitose, utilizando fluorosferas opsonizadas com SFB. Os resultados estão ilustrados na Figura 9, onde pode-se verificar que não houve diferenças significativas entre as células analisadas nos seguintes parâmetros: macrófagos que não mostraram fagocitose, macrófagos que fagocitaram pouco - de 1 a três "beads" e macrófagos que fagocitaram muito - mais de 4 "beads" (Figura 9).

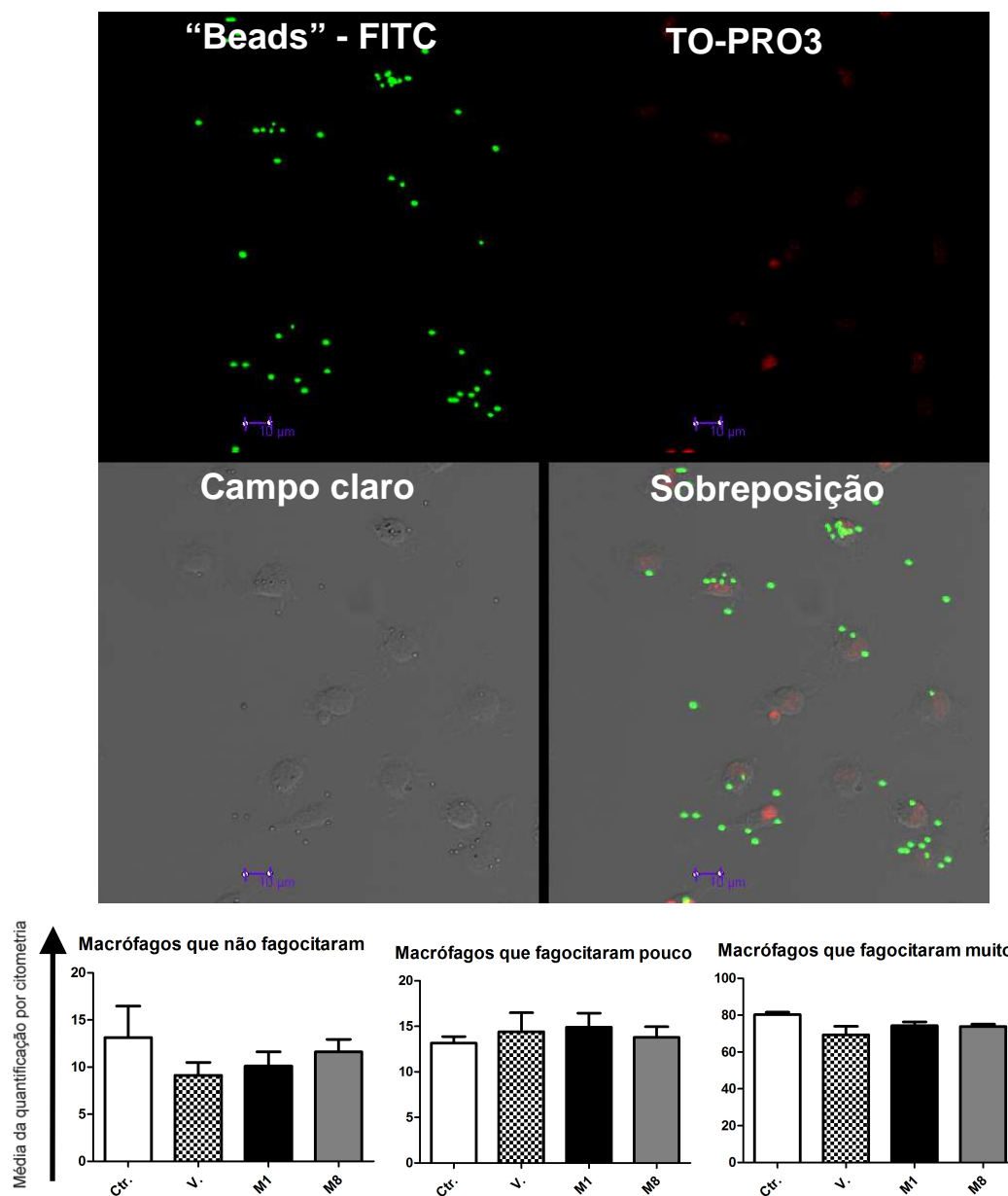


Figura 9: Avaliação da capacidade fagocítica de macrófagos de camundongos C57BL/6 na presença de M1 ou M8. Não foram observadas diferenças significativas por microscopia confocal, utilizando a sobreposição de imagens adquiridas em campo claro, em fluorescência para o marcador em verde (fluorosferas) ou para o marcador em vermelho (TO-PRO3, marcador nuclear). No ensaio quantitativo por citometria de fluxo também não foram verificadas diferenças significativas sobre a fagocitose (gráficos) quando avaliado: Macrófagos que não fagocitaram; macrófagos que fagocitaram pouco (1 a 3 esferas); macrófagos que fagocitaram muito (mais que 3 esferas). O eixo y dos gráficos representa a média após distribuição normal. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

4.2. DISCUSSÃO

Como triagem inicial para detecção de potencial imunestimulante, foi realizada o experimento *in vivo* com camundongos albinos suíços para detecção das concentrações de subtipos leucocitários de linfonodos periféricos após tratamento com os CHIs. Esta triagem prévia visou analisar o potencial de influência nas proporções de células imunitárias envolvidas nas respostas imunológicas e demonstrou várias mudanças significativas nas concentrações celulares de linfócitos $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD3^-CD19^+$, $CD3^-Dx5^+$ e $CD11b^+$, após tratamento *in vivo* (Fig. 6). Estes resultados possibilitaram a seleção do M1, como promissor composto imunomodulador a ser utilizado nos ensaios posteriores.

M1 demonstrou grande capacidade de aumentar a concentração de monócitos, linfócitos B e Tc, que são células envolvidas em resposta imune celular e humoral em diversas patologias. O composto M8 por sua vez, aumentou as proporções dos linfócitos Tc, que são importantes componentes das respostas celulares. Por outro lado, este composto também exerceu uma grande influência em macrófagos e em células de medula óssea (dados não mostrados), assim M8 também foi selecionado para os posteriores estudos.

Considerando que a imunestimulação baseada em administração de interferon do tipo I (IFN- α) tem sido indicada como uma efetiva imunoterapia para casos de melanoma (ASCIERTO; KIRKWO, 2008), o próximo passo foi avaliar *in vitro* a possibilidade da influência do M1 ou do M8 de serem estimulantes ou não da expressão do IFN do tipo I e II. Para tanto, foi utilizado um modelo desenvolvido por Bollati-Fogollín e Müller, 2005, que consiste de linhagem celular repórter MxRage, a qual co-expressa GFP flanqueado por IFN do tipo I e do tipo II. Esta linhagem foi testada com tratamento dos CHIs tanto na ausência do IFN- α (para averiguação da capacidade estimulante da expressão do IFN do tipo I e II), quanto na presença (para averiguação da capacidade inibitória da expressão do IFN do tipo I e II). No entanto, os resultados obtidos não mostraram diferenças significativas nos tratamentos com os CHIs testados (Fig. 7).

A possível ação de M1 e de M8 também foi avaliada sobre a estimulação de NF- κ B em células tumorais de adenocarcinoma colon-retal. O NF- κ B é um fator de transcrição nuclear, que nas células tumorais está relacionado com tumorigênese, progressão de metástases, promoção de atividade anti-apoptótica, quimioresistência e atua como regulador positivo do ciclo celular e de outros fatores de sobrevivência (PIKARSKY; BEN-NERIAH, 2006, NAKANISHI; TOI, 2005). O tratamento *in vitro* com M1 em diferentes concentrações diminuiu a ativação do NF- κ B induzida por TNF- α nas células de adenocarcinoma colon-retal humano - HT29 (Fig. 8).

Normalmente a sinalização de TNF- α não exerce efetiva indução de morte em células tumorais. Porém, foi observado que a inibição *in vitro* da atividade de NF- κ B promove morte celular induzida por TNF- α em diversas linhagens celulares tumorais (WANG *et al.*, 1999).

Os resultados são relevantes por demonstrarem que o composto M1 pode influenciar diretamente em células tumorais. Além disto, cabe destacar que o câncer colon-retal é metastático e possui alta taxa de mortalidade, além de ser frequentemente recorrente após remoção cirúrgica. Aliado a este fato, há poucos agentes quimioterapêuticos disponíveis para tratar cânceres metastáticos com efetividade (ABULAFI; WILLIAMS, 2005, HIND *et al.*, 2008), o que reforça mais ainda a importância da ação do M1 sobre estas células.

O ensaio para avaliar a estimulação do potencial fagocitário não mostrou significância estatística após os tratamentos *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos da cepa C57BL/6 e fagocitose de beads opsonizados. No entanto, cabe salientar que diferenças em potencial de estimulação imunológica podem ser encontradas em camundongos C57BL/6 em comparação com outros. Possivelmente isto se deve ao fato de que esta cepa murina possui respostas inatas e Th1 fortemente estabelecidas, as quais limitam o uso desta para questões imunológicas (RIVERA; TESSAROLLO, 2008). Porém, esta cepa é a mais utilizada para ensaios com melanoma metastático, por refletir diversas características do melanoma humano e ser a única compatível com ensaios de metástase pulmonar com células B16F10 (OVERWIJK; REST, 2001).

5. CAPÍTULO 2: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DO M1 EM MODELO DE MELANOMA MURINO COM CÉLULAS B16F10

5.1. RESULTADOS

5.1.1. Células B16F10 expostas para o M1 não apresentam alterações em marcadores celulares

As células B16F10 foram tratadas *in vitro* por 48 h com M1 ou com o veículo. Primeiramente foi analisado a possibilidade do tratamento desencadear morte celular. Assim, a viabilidade foi avaliada utilizando o corante fluorescente 7-AAD e análise em citometria de fluxo. No entanto, não houve alterações significativas (dados não mostrados).

Possíveis alterações em moléculas envolvidas com malignidade também foram analisadas. Assim, a expressão de E-caderina (Fig. 17A), CD74 intracelular (Fig. 17B), bem como CD74 extracelular (Fig. 17C) foram avaliadas com o uso de anticorpos específicos, seguido das análises em citômetro de fluxo. Os resultados mostram que não houve diferenças significativas entre os tratamentos, com M1 ou com o veículo (Fig. 10 A-C).

O próximo passo foi avaliar o ciclo celular. Assim, com o uso de iodeto de propídeo e análise em citometria de fluxo, foi constatado que as concentrações de células em fases $G_{1/0}$, S e G_2/M , não apresentaram diferenças significativas, quando comparado o tratado com o veículo (Fig. 10D) com o tratado com M1 (Fig. 10E).

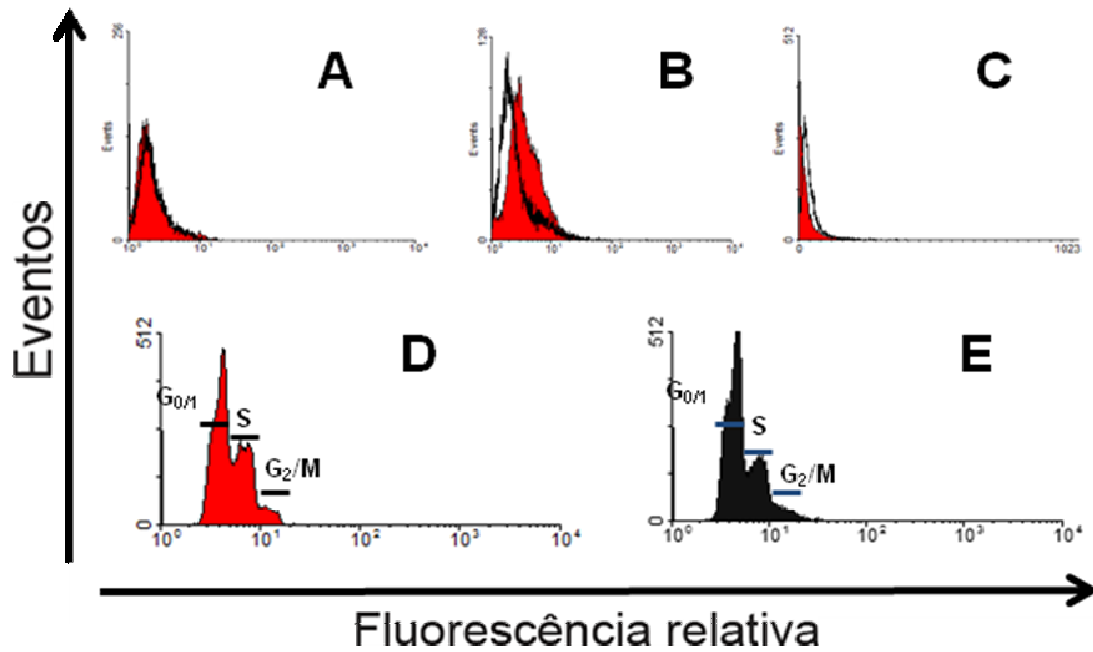


Figura 10: A expressão das moléculas envolvida com malignidade foi avaliada por citometria de fluxo nas células B16F10 tratadas por 48 h com M1 ou com veículo. A E-caderina (A), o CD74 intracelular (B) e o CD74 extracelular (C) não apresentaram alterações significativas. A linha preta indica o tratamento com M1 e a linha preenchida em vermelho, indica o grupo veículo (A-C). A influência sobre a proliferação foi avaliada por citometria de fluxo após coloração com iodeto de propídio (PI). Os grupos avaliados não apresentaram diferenças significativas. D – Veículo e E – M1.

5.1.2. Análise do perfil de invasão celular *in vitro* após o tratamento com M1

A possibilidade do tratamento com M1 influenciar no perfil de adesão celular, bem como na capacidade de invasão das células de melanoma murino (*in vitro*) foram avaliados. Assim, as células foram previamente tratadas ou não (controle) com veículo (V.) ou com M1, por 48 h. Após o tratamento as células foram plaqueadas em “Transwell” previamente recobertos com matrigel, conforme descrito em detalhes em Materiais e Métodos.

Na análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) é nítido que no grupo M8 houve uma diminuição da adesão celular, bem como uma menor capacidade invasiva (Fig. 11). A invasão celular foi revelada pela exposição dos poros do “Transwell”, os quais não estavam visíveis devido à cobertura com matrigel, e foram expostos após a degradação das proteínas de matriz extracelular.

A capacidade de invasão foi avaliada com o uso do software ImageJ, o qual quantificou em pixel (Px) as áreas expostas dos poros resultantes da atividade proteolítica das células B16F10. A análise revela que há uma nítida diferença da capacidade invasiva das células que foram expostas ao M1, mostrando que houve redução da invasão para aproximadamente 1/3, quando comparado com o grupo controle (Px 8400 para o controle e 3100 para o M1).

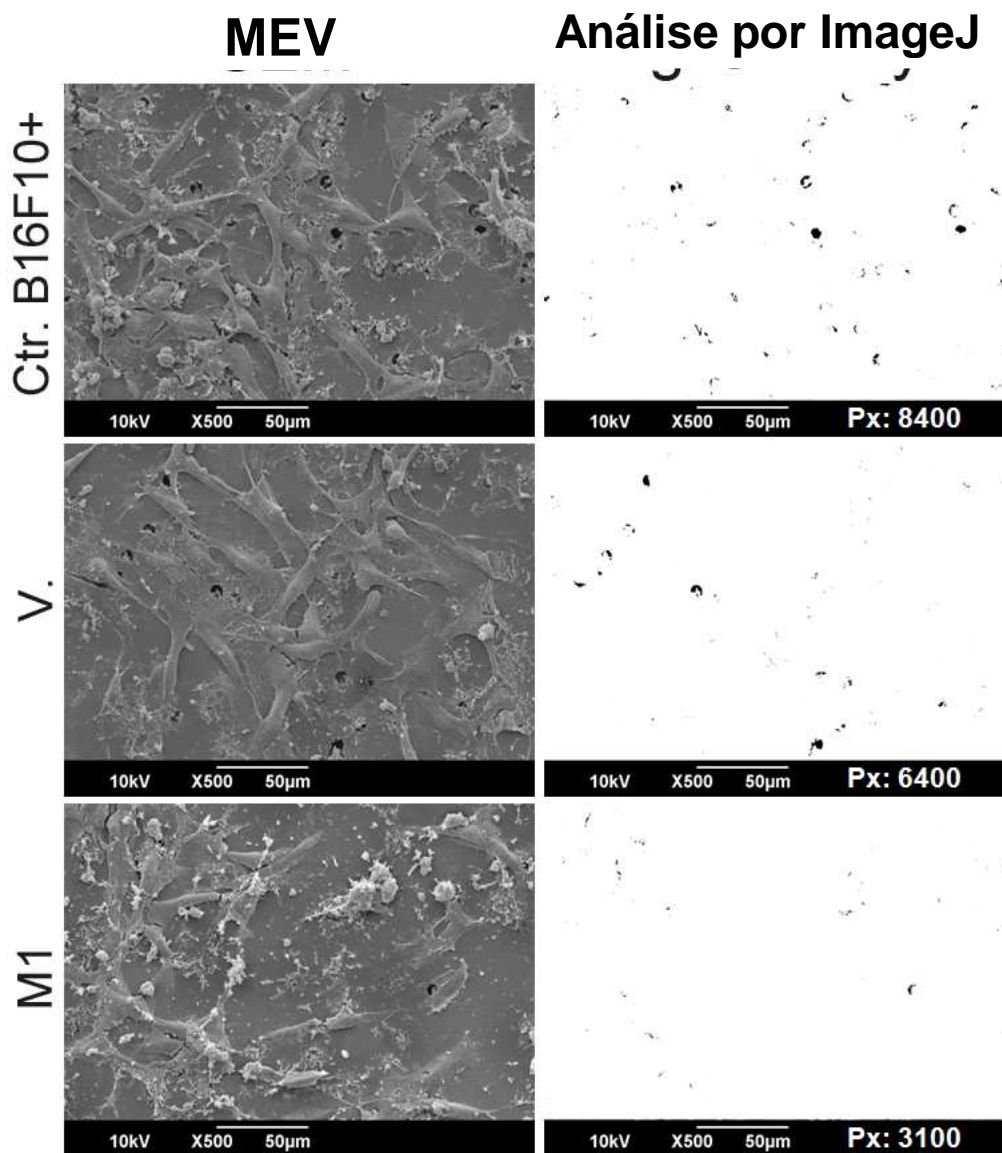


Figura 11: A capacidade invasiva de células B16F10, tratadas *in vitro* por 48 h, foi mensurada por sistema Transwell-Matrigel, no qual as células com maior potencial invasivo demonstram maior degradação de matrigel e conseqüente maior exposição dos poros de 8µm do inserto. No grupo tratado com M1 houve uma intensa alteração morfológica e diminuição da capacidade de adesão das células B16F10 sobre o matrigel. Fotos por MEV e análise de densitometria da área dos poros por pixels (Px) pelo software ImageJ. Ctr. B16F10+ = Células B16F10 sem nenhum tratamento; V. = Células B16F10 tratadas com o veículo dos compostos.

5.1.3. Estudo *in vivo* com células B16F10 em modelo de metástase pulmonar

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram submetidos ou não (controle negativo) à inoculação com as células B16F10 na veia caudal. Posteriormente, os animais foram tratados ou não (Ctr + B16F10) com veículo ou com M1 por inalação por 15 dias. Após o período de tratamento foi avaliada a massa corpórea dos animais, antes da eutanásia. Como representado na Fig. 12, não houve diferenças significativas entre a relação massa antes e após o período de inoculação das células tumorais, bem como após o período de tratamento.

O pulmão de cada animal foi devidamente removido e avaliado. A Figura 13A mostra o pulmão normal (animal não inoculado com células de melanoma). Já as Figuras 13B-D ilustra os animais que receberam inoculação com células B16F10, mostrando que houve a implantação destas células no pulmão, com o desenvolvimento de diversos nódulos tumorais. No entanto é nítido que o tratamento com M1 leva a um menor número de nódulos (Fig. 13D). A análise estatística, a partir da contagem dos nódulos tumorais, confirmou que a diminuição observada após tratamento com M1 é significativa ($p < 0,001$) (Fig. 13E).

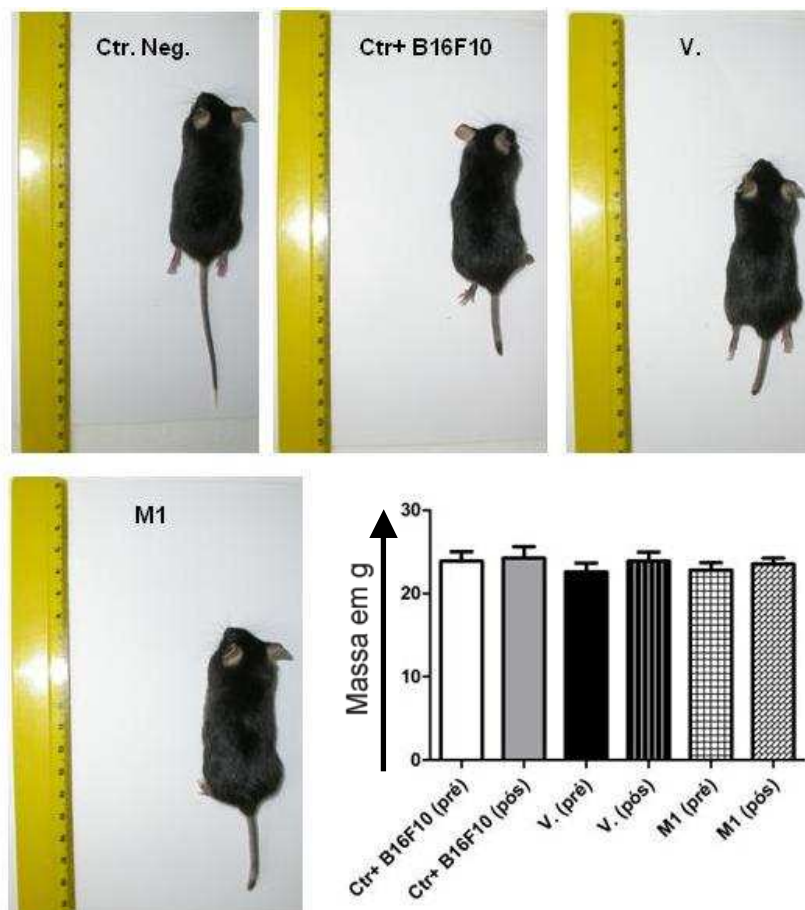


Figura 12: Avaliação da massa corpórea dos animais que desenvolveram ou não (controle negativo) metástases após inoculação com melanoma e posterior tratamento ou não (Ctr+ B16F10) com veículo (V.) ou com M1. Não houve diferenças significativas de variação de massa entre os grupos. Observa-se também que todos os animais apresentaram um discreto ganho de massa após o período de tratamento (pós). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

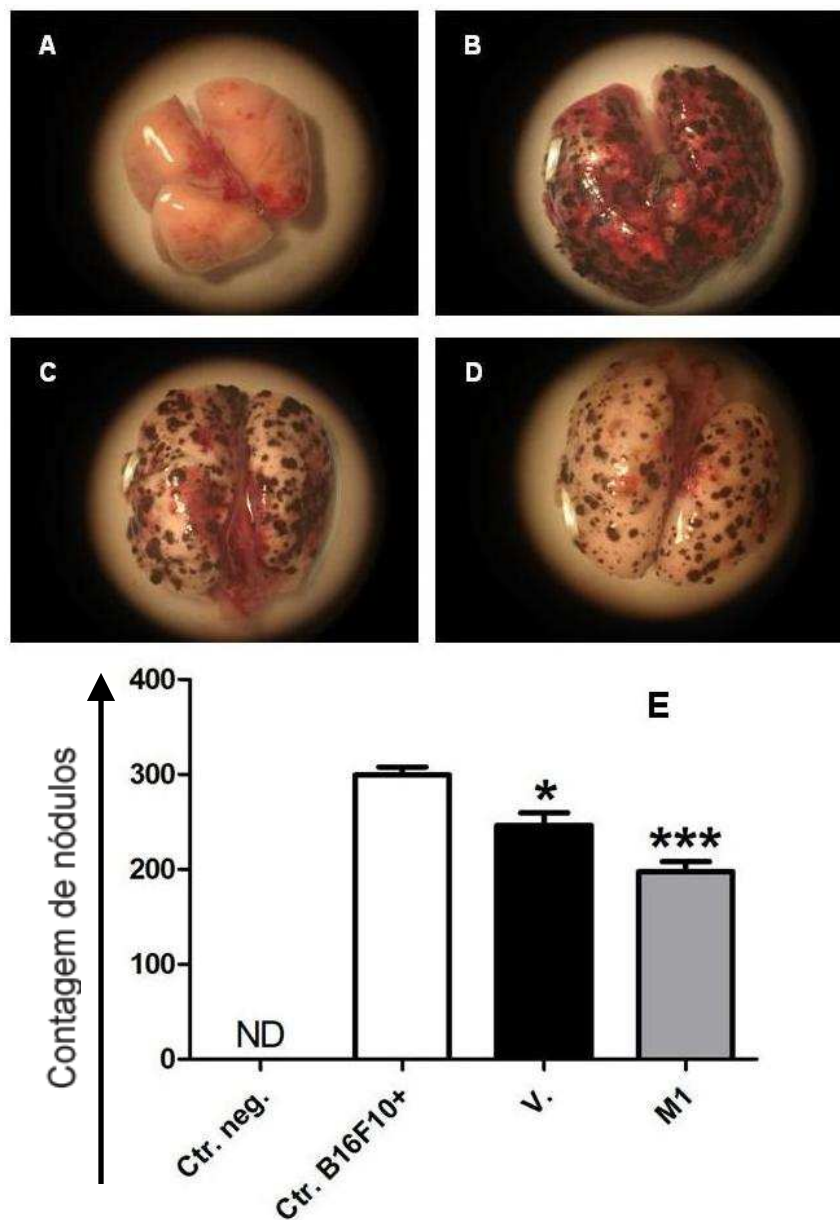


Figura 13: Avaliação do potencial metastático. Fotografia obtida da hemiface dorsal do pulmão. O tratamento por 15 dias por via inalante com o composto M1 (D) regrediu significativamente a contagem de nódulos metastáticos. **A** = Controle negativo, pulmão de animal isento da inoculação de células tumorais; **B** = Controle positivo para metástase por B16F10, de animal inoculado (i.v.), porém não submetido ao tratamento por inalação. **C** = Animal inoculado e exposto ao tratamento por inalação com o veículo; **D** = Animal inoculado e exposto ao tratamento por inalação com M1; **E** = Contagens de nódulos metastáticos. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

5.1.4. Quantificação de células imunitárias sanguíneas no modelo de metástase pulmonar

O sangue coletado dos animais foi submetido a dois tipos de processamento: o esfregaço sanguíneo seguido de coloração diferencial para contagem de células polimorfonucleares por microscopia óptica e o processamento para citometria de fluxo, utilizando anticorpos específicos para distinção dos subtipos linfocitários conforme a Tabela 1 em Materiais e Métodos. No entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas dentre as análises realizadas (Fig. 14).

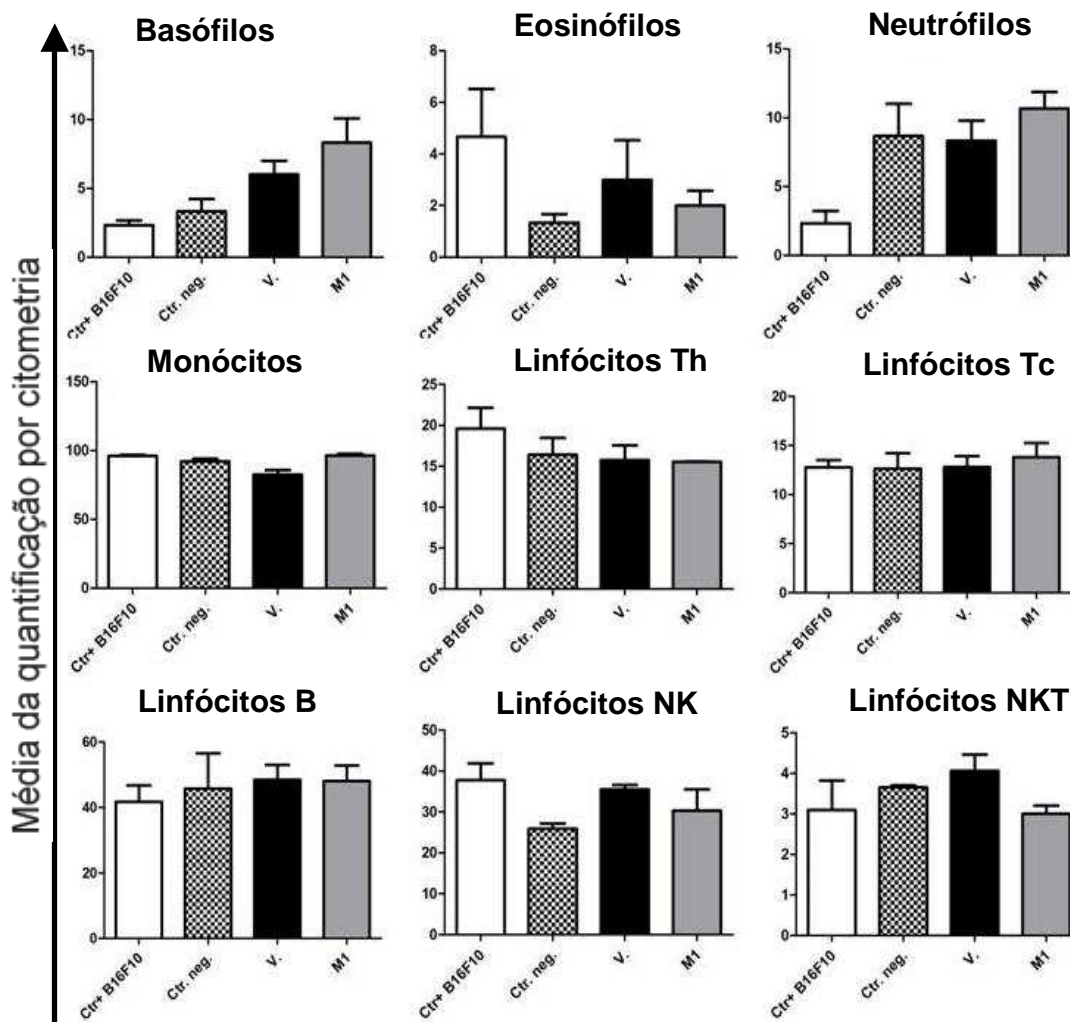


Figura 14: Fenotipagens e imunofenotipagens de células imunitárias sanguíneas. Basófilos, eosinófilos, monócitos e neutrófilos foram identificados por sua morfologia celular característica, utilizando microscopia óptica após coloração diferencial. Não foram detectados mastócitos nas lâminas de esfregaço sanguíneo. Os linfócitos foram identificados por citometria de fluxo após imunomarcagem com anticorpos específicos, descritos na Tabela 1. Não houve diferenças significativas dentre os subtipos celulares desta análise no modelo de metástase pulmonar com tratamento com M1 por via inalante. Os eixos y representam a média após distribuição normal. V. = veículo.

5.1.5. Estudo histopatológico

Os cortes histológicos dos pulmões, dos animais inoculados ou não com células de melanoma e tratados ou não por inalação com veículo ou com M1, foram então avaliados com relação ao perfil histopatológico, após coloração com HE. Os resultados estão representados na Figura 15, onde observa-se que no panorama estrutural foram verificadas células de melanoma de morfologia poliédrica (epitelióide) com grandes quantidades de melanina citoplasmática em grânulos ou perinuclear. Foram observadas também padrões de proliferação aberrantes e nodulares nas regiões bronco-alveolares característicos do melanoma de padrão epitelióide (Fig. 15B). O tratamento com M1 promoveu uma visível diminuição do volume das massas tumorais dos nódulos metastáticos (Fig. 15D).

Com base nestas evidências, o estudo de mediadores de angiogênese e invasividade tornou-se importante. Assim, cortes histológicos do pulmão dos animais tratados ou não, foram submetidos ao ensaio de marcação imunohistoquímica do perlecam, um proteoglicano de heparam sulfato, característico da matriz extracelular e importante para a formação de novos vasos sanguíneos. Embora não estatisticamente significativa, a expressão do perlecam foi encontrada em forte tendência de diminuição após o tratamento com M1 (Fig. 16A-D). A análise estatística está expressa na Figura 16E.

Não foram verificadas lesões macroscópicas em outros órgãos que justificassem a execução do estudo histopatológico e posterior imunohistoquímica.

COLORAÇÃO HISTOLÓGICA HE

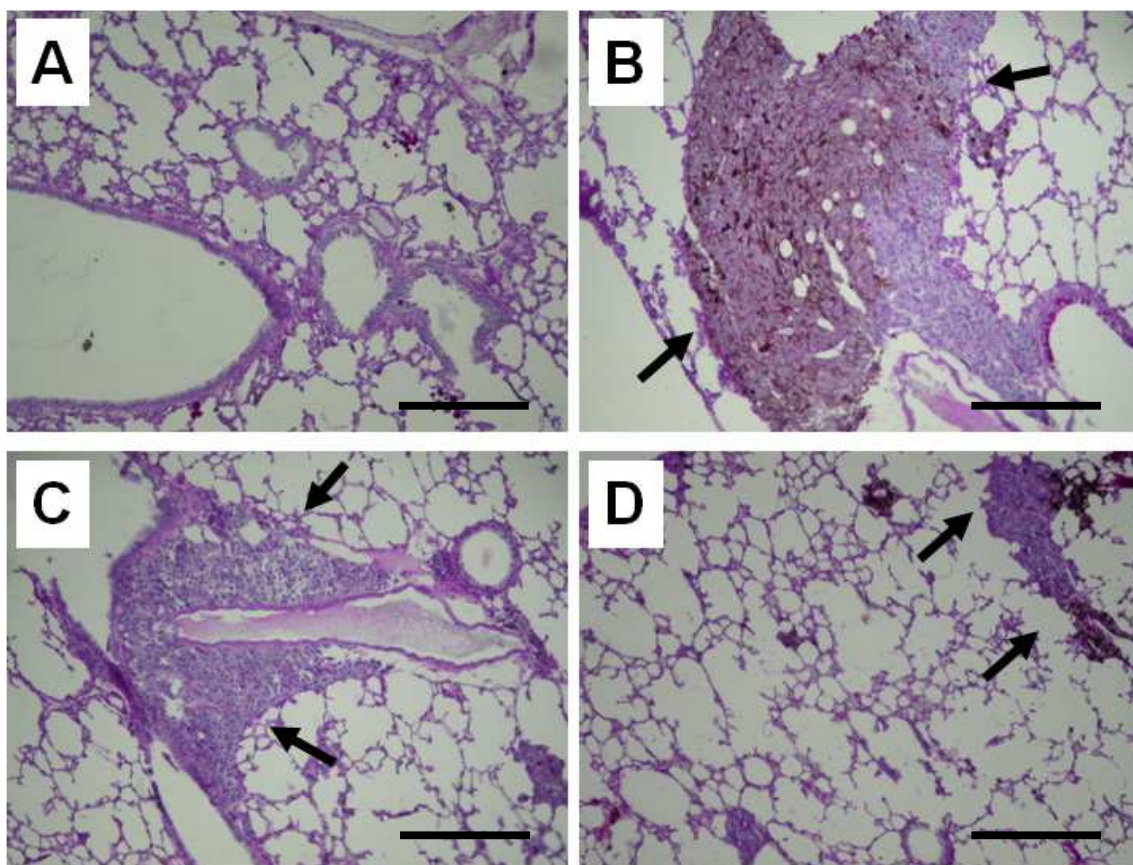


Figura 15: Fig. A: Pulmão normal isento de células tumorais e de tratamento. Fig. B a D: Pulmões de camundongos com de metástase pulmonar. Fig. B: Controle positivo, isenção de tratamento; Fig. C: Tratamento com o veículo; Fig. D: Tratamento com o M1. O tratamento com M1 promoveu a diminuição do volume e a quantidade dos nódulos tumorais. Barra = 50 μ m.

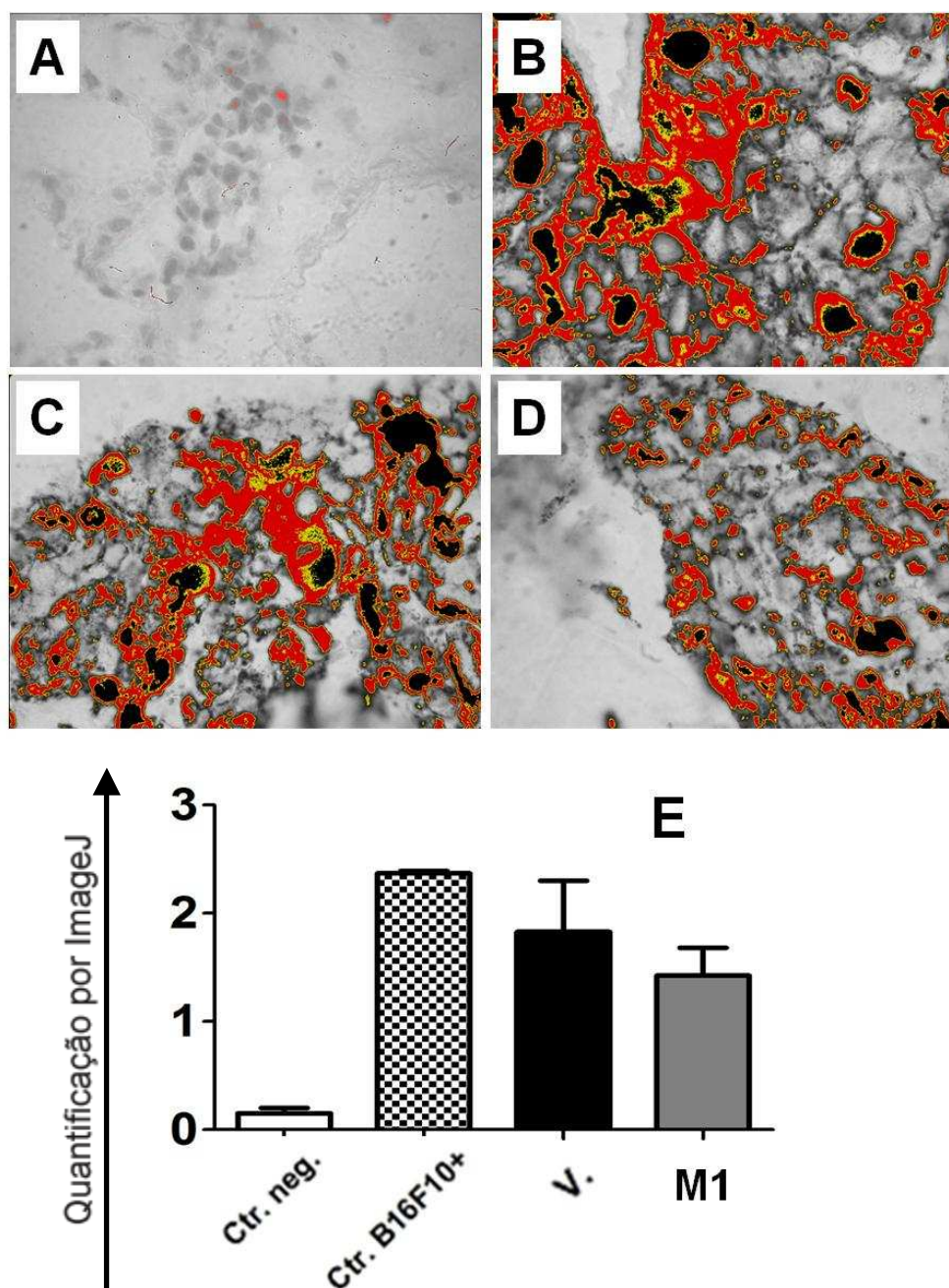


Figura 16: Fig. A: Pulmão normal. B a D: Pulmões de camundongos com de metástase pulmonar. Fig. A: Controle negativo, isenção de tratamento; Fig. B: Controle positivo, isenção de tratamento; Fig. C: Tratamento com o veículo; Fig. D: Tratamento com o M1. Análise por ImageJ da expressão de perlecan após imunohistoquímica e contra-coloração com Giemsa. A área do “threshold” específico da marcação do DAB foi selecionada para cada Figura, mensurada e dividida pela média dos valores obtidos para o mesmo “threshold” nas fotografias de grupos corados apenas com Giemsa para a eliminação de interferência de melanina. O grupo M1 demonstrou diminuição na expressão do perlecan (Fig. E). Gráfico: a = controle negativo; b = controle positivo para a metástase e sem tratamento; c = tratamento com o veículo; d = tratamento com M1. Os valores finais foram submetidos à ANOVA unifatorial com pós-teste de Tuckey. Os eixos y e x dos gráficos representam a média após distribuição normal e o grupo / tratamento respectivamente. *P < 0,05.

5.2. DISCUSSÃO

Células tumorais usam múltiplos mecanismos para escapar da vigilância imunológica. Pouco é conhecido a respeito da efetividade de terapias alternativas e complementares no câncer e os poucos estudos disponíveis na literatura foram realizados em escopo limitado. Apesar disto, a imunoestimulação por produtos naturais vem sendo pesquisada em modelos animais e em pacientes com câncer como uma possibilidade complementar aos procedimentos quimioterápicos convencionais (MILAZZO *et al.*, 2006; BELLAVITE *et al.* 2006).

Resultados prévios mostraram que CHIs podem ser importante imunoestimuladores, como por exemplo, do tratamento de macrófagos murino com um específico CHI que diminuiu a expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), aumentou a atividade da NADPH oxidase, a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e promoveu uma diferencial expressão gênica (PIEMONTE; BUCHI, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2008). Estudos prévios já demonstraram promissores resultados de CHIs como terapia complementar para imunomodulação em modelos de câncer (SATO *et al.*, 2005; GUIMARÃES *et al.*, 2009; PASCUAL *et al.*, 2006). Referente a complexos provenientes do extrato de *Chelidonium majus*, estudos prévios demonstraram promissores efeitos antitumorais em diferentes modelos animais até pesquisas clínicas (ERNST; SCHMIDT, 2005). Em modelos de câncer metastático em camundongos C57BL/6, extratos de *C. majus* mostraram uma diminuição significativa de metástases em pulmão de carcinoma de Lewis associado com imunoestimulação (GRINEVICH *et al.*, 2005). Além disto, tais extratos mostraram propriedade pró-apoptótica em diversas linhagens celulares tumorais (HABERMEHL *et al.*, 2006).

A progressão do melanoma assim como outros cânceres malignos envolve fatores como a diminuição da expressão da E-caderina e aumento da expressão do CD74 intra e extracelular que confere motilidade celular e escape da vigilância imunológica, respectivamente (BURTON *et al.*, 2004, TUCCI *et al.*, 2007). Apesar

disto a expressão da E-caderina e do CD74 intra e extracelular não demonstrou diferenças significativas após o tratamento com M1. Em um estudo com modelo de tratamento com CHIs em camundongos albinos suíços com inoculação de sarcoma-180, Sato *et al.*, 2005 demonstraram grande capacidade desta categoria deste tratamento de promover aumento dos níveis dos linfócitos TCD4, TCD8 e NK no compartimento sanguíneo dos animais. Diferentemente dos camundongos suíços albinos, os camundongos C57BL/6 não demonstraram grande influencia sobre os linfócitos circulantes da corrente sanguínea assim como a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais após o tratamento (Cap. 1). Isto pode ser resultante das características imunológicas “background” deste camundongo que possui um intrínseco e forte estabelecimento da imunidade inata e Th1 que limita o uso dessa cepa de camundongo para correlações imunológicas, como já comentadas no capítulo 1 (RIVERA; TESSAROLLO, 2008). Porém a cepa C57BL/6 é a mais utilizada para como modelo murino para simular melanoma metastático porque reflete várias características do melanoma metastático humano, além disto é a única cepa compatível com o modelo de inoculação de células de melanoma B16F10 (OVERWIJK; RESTIFO, 2001).

Em termos de mecanismos de ação do tratamento com M1 em células metastáticas B16F10 e seu respectivo modelo *in vivo*, podemos concluir que M1 age como um discreto inibidor da expressão do perlecan, inibidor da adesão celular e invasão e como supressor da atividade do NF- κ B associada com morte celular (Cap. 1). Perlecan é um importante componente da matriz extracelular que possui forte correlação com vários fatores de metástase, angiogênese e invasividade em células tumorais. Quando esta molécula é derivada do tumor, é distribuída em sua matriz e cria um microambiente capaz de induzir neovascularização, crescimento tumoral e invasão (JIANG *et al.*, 2003, JIANG *et al.*, 2004). O impedimento da adesão de células de melanoma nas moléculas de matriz extracelular induz perda de sobrevivência e apoptose, este mecanismo tem sido investigado como promissor via terapêutica contra cânceres metastáticos (SMITH *et al.*, 2005, HEHLGANS; HAASE; CORDES, 2007). O ensaio de invasão de células B16F10 em membranas de sistema transwell revestidas com matrigel

como substrato mostrou perda de adesão celular associada á diminuição da habilidade proteolítica das células sobre o substrato. Tais resultados reunidos, conjuntamente as informações do capítulo 1, sugerem que o M1 é um promissor agente indutor de dormência tumoral e diminuição dos nódulos metastáticos de melanoma em numero e massa assim como controle de respostas excessivas e ineficientes do organismo. Finalmente, estes resultados sugerem que este CHI é um potencial candidato como terapia complementar no qual pode favorecer a eficácia de terapias convencionais contra células tumorais ou por induzir dormência direta sobre as neoplasias malignas.

6. CAPÍTULO 3: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DO M8 EM MODELO DE MELANOMA MURINO

6.1. RESULTADOS

6.1.1. Células B16F10 expostas para o M8 não apresentam alterações em marcadores celulares

As células B16F10 foram tratadas *in vitro* por 48 h com M8 ou com o veículo. Primeiramente foi analisada a possibilidade de o tratamento desencadear morte celular. Assim, a viabilidade foi avaliada utilizando o corante fluorescente 7-AAD e análise em citometria de fluxo. No entanto, não houve alterações significativas (dados não mostrados).

Possíveis alterações em moléculas envolvidas com malignidade também foram analisadas. Assim, a expressão de E-caderina (Fig. 17A), CD74 intracelular (Fig. 17B), bem como CD74 extracelular (Fig. 17C) foram avaliadas com o uso de anticorpos específicos, seguido das análises em citômetro de fluxo. Os resultados mostram que não houve diferenças significativas entre o tratamento, com M8 ou com o veículo (Fig. 17 A-C).

O próximo passo foi avaliar o ciclo celular. Assim, com o uso de iodeto de propídeo e análise em citometria de fluxo, foi constatado que as concentrações de células em fases $G_{1/0}$, S e G_2/M , não apresentaram diferenças significativas, quando comparado o tratado com o veículo (Fig. 17D) com o tratado com M8 (Fig. 17E).

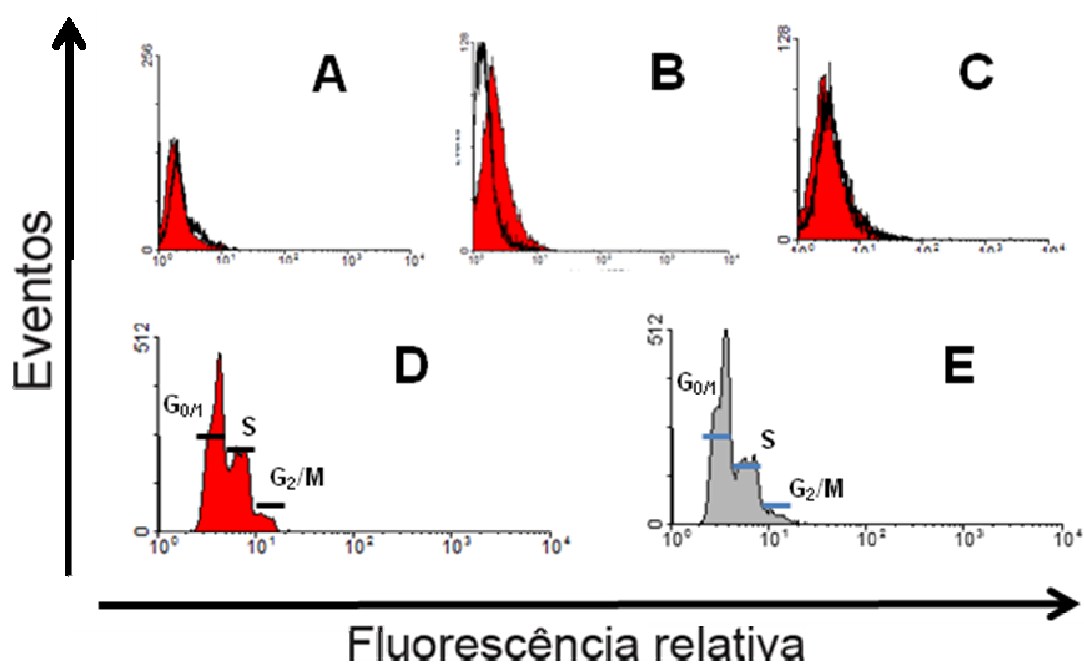


Figura 17: A expressão das moléculas envolvida com malignidade foi avaliada por citometria de fluxo nas células B16F10 tratadas por 48 h com M8 ou com veículo. A E-caderina (A), o CD74 intracelular (B) e o CD74 extracelular (C) não apresentaram alterações significativas. A linha preta indica o tratamento com M8 e a linha preenchida em vermelho, indica o grupo veículo (A-C). A influência sobre a proliferação foi avaliada por citometria de fluxo após coloração com iodeto de propídio (PI). Os grupos avaliados não apresentaram diferenças significativas. D – Veículo e E – M8.

6.1.2. Análise do perfil de invasão celular *in vitro* após o tratamento com M8

A possibilidade do tratamento com M8 influenciar no perfil de adesão celular, bem como na capacidade de invasão das células de melanoma murino (*in vitro*) foram avaliados. Assim, as células foram previamente tratadas ou não (controle) com veículo (V.) ou com M8, por 48 h. Após o tratamento as células foram ensaiadas para a adesão em placas “Transwell” previamente recobertos com matrigel, conforme descrito em detalhes em Materiais e Métodos.

Na análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) é nitido que no grupo M8 houve uma diminuição da adesão celular, bem como uma menor capacidade invasiva (Fig. 18). A invasão celular foi revelada pela exposição dos poros do “Transwell”, os quais não estavam visíveis devido à cobertura com matrigel, e foram expostos após a degradação das proteínas de matriz extracelular.

A capacidade de invasão foi avaliada com o uso do software ImageJ, o qual quantificou em pixel (Px) as áreas expostas dos poros resultantes da atividade proteolítica das células B16F10. A análise revela que há uma nítida diferença da capacidade invasiva das células que foram expostas ao M8, mostrando que houve redução da invasão para aproximadamente 1/3, quando comparado com o grupo controle (Px 6854 para o controle e 2116 para o M8).

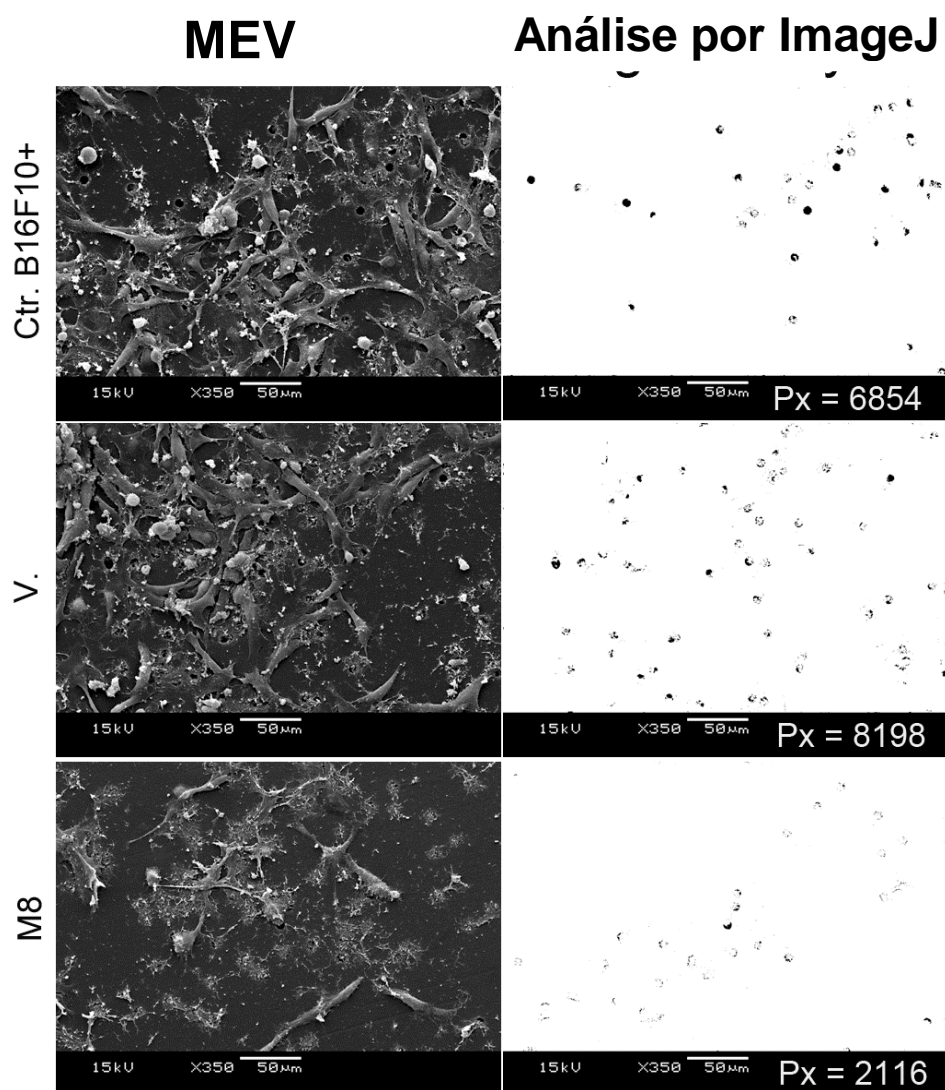


Figura 18: A capacidade invasiva de células B16F10, tratadas *in vitro* por 48 h, foi mensurada por sistema Transwell-Matrigel, no qual as células com maior potencial invasivo demonstram maior degradação de matrigel e conseqüente maior exposição dos poros de 8µm do inserto. No grupo tratado com M8 houve uma intensa alteração morfológica e diminuição da capacidade de adesão das células B16F10 sobre o matrigel. Fotos por MEV e análise de densitometria da área dos poros por pixels (Px) pelo software ImageJ. Ctrl. B16F10+ = Células B16F10 sem nenhum tratamento; V. = Células B16F10 tratadas com o veículo dos compostos.

6.1.3. Estudo *in vivo* com células B16F10 em modelo de metástase pulmonar

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram submetidos ou não (controle negativo) à inoculação com as células B16F10 na veia caudal. Posteriormente, os animais foram tratados ou não (Ctr + B16F10) com veículo ou com M8 por inalação por 15 dias. Após o período de tratamento foi avaliado a massa corpórea dos animais, antes da eutanásia. Como representado na Fig. 19, não houve diferenças significativas entre a relação massa antes e após o período de inoculação das células tumorais, bem como após o período de tratamento.

O pulmão de cada animal foi devidamente removido e avaliado. A Figura 20A mostra o pulmão normal (animal não inoculado com células de melanoma). Já as Figuras 20B-D ilustra os animais que receberam inoculação com células B16F10, mostrando que houve a implantação destas células no pulmão, com o desenvolvimento de diversos nódulos tumorais. No entanto é nítido que o tratamento com M8 leva a um menor número de nódulos (Fig. 20D). A análise estatística, à partir da contagem dos nódulos tumorais com o auxílio de lupa estereoscópica, confirmou que a diminuição observada é significativa ($***P<0,001$).

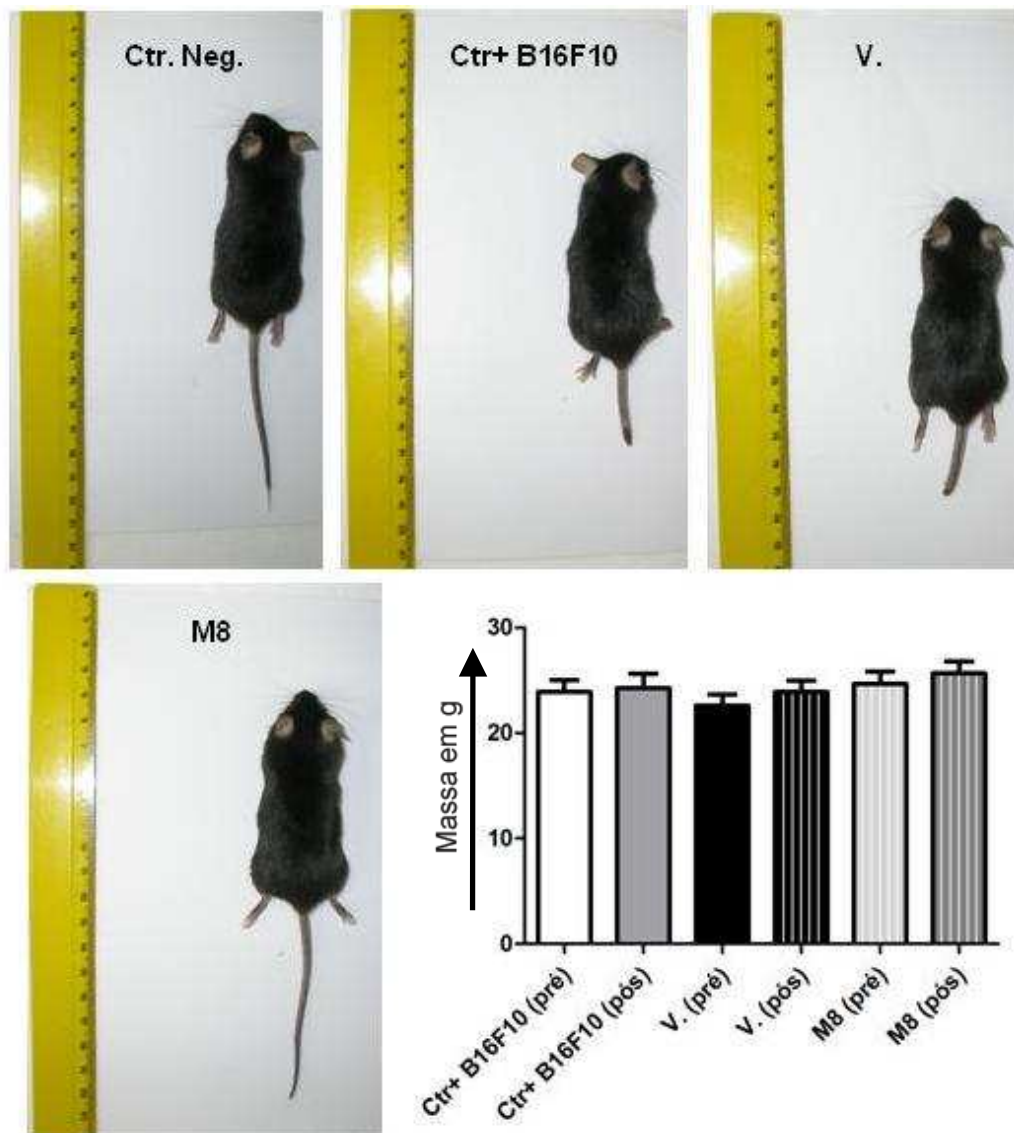


Figura 19: Avaliação dos parâmetros físicos dos animais que desenvolveram ou não (controle negativo) metástases após inoculação com melanoma e posterior tratamento ou não (Ctr+ B16F10) com veículo (V.) ou com M8. Os animais demonstraram similaridade em termos de tamanho relativo corporal e massa corpórea (expressa no gráfico em gramas). Não houve diferenças significativas de variação de massa entre os grupos. Observa-se também que todos os animais apresentaram um discreto ganho de massa após o período de tratamento (pós). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

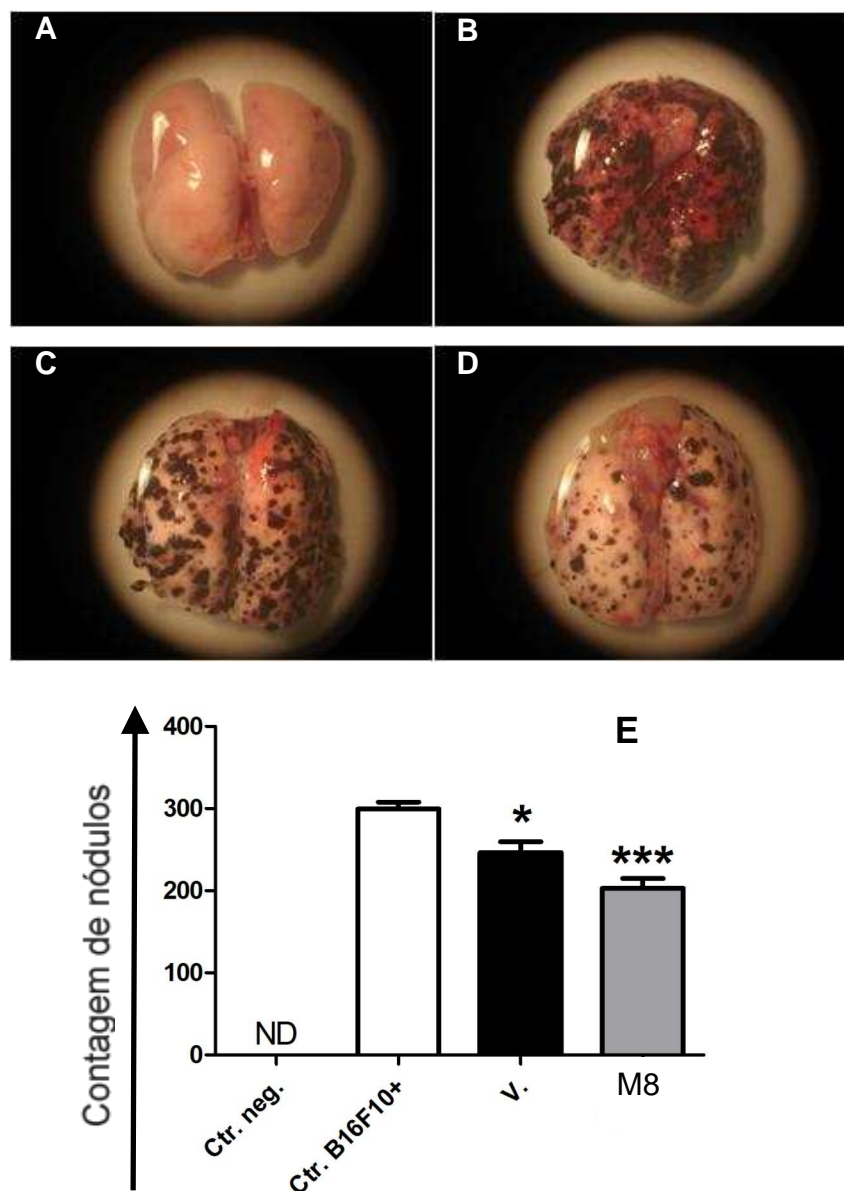


Figura 20: Avaliação do potencial metastático. Fotografia obtida da hemiface dorsal do pulmão. O tratamento por 15 dias por via inalante com o composto M8 (D) regrediu significativamente a contagem de nódulos metastáticos. **A** = Controle negativo, pulmão de animal isento da inoculação de células tumorais; **B** = Controle positivo para metástase por B16F10, de animal inoculado (i.v.), porém não submetido ao tratamento por inalação. **C** = Animal inoculado e exposto ao tratamento por inalação com o veículo; **D** = Animal inoculado e exposto ao tratamento por inalação com M8; **E** = Representação gráfica da ANOVA unifatorial com pós-teste de Tuckey sobre as contagens de nódulos metastáticos. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

6.1.4. Detecção de células imunitárias sanguíneas no modelo de metástase pulmonar

O sangue coletado dos animais foi submetido a dois tipos de processamento: o esfregaço sanguíneo seguido de coloração diferencial para contagem de células polimorfonucleares por microscopia óptica e o processamento para citometria de fluxo, utilizando anticorpos específicos para distinção dos subtipos linfocitários conforme a Tabela 1 em Materiais e Métodos. Os resultados estão expressos na Figura 21, onde observa-se que basófilos e neutrófilos apresentaram-se em maiores concentrações após o tratamento com M8. No entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas para as demais análises realizadas (Fig. 21).

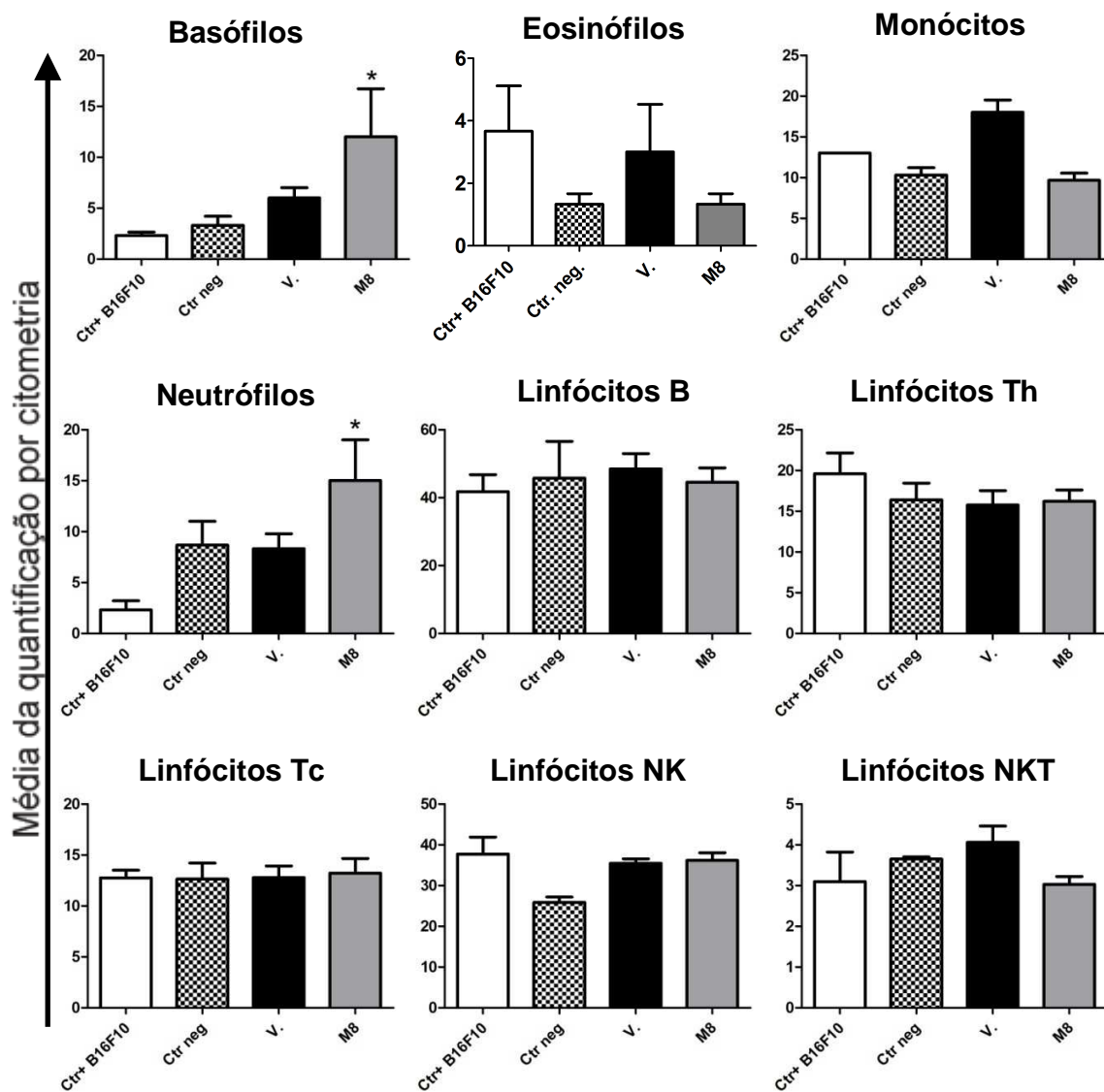


Figura 21: Fenotipagens e imunofenotipagens de células imunitárias sanguíneas. Basófilos, eosinófilos, monócitos e neutrófilos foram identificados por sua morfologia celular característica, utilizando microscopia óptica após coloração diferencial. Basófilos e neutrófilos foram detectado em maiores concentrações após o tratamento com M8. Não foram detectados mastócitos nas lâminas de esfregaço sanguíneo. Os linfócitos foram identificados por citometria de fluxo após imunomarcagem com anticorpos específicos, descritos na tabela 1. Não houve diferenças significativas em subtipos de linfócitos (B, NK, NKT, Tc e Th) no modelo de metástase pulmonar com tratamento com M8 por via inalante. Os eixos y representam a média após distribuição normal. V. = veículo. *P < 0,05.

6.1.5. Estudo histopatológico

Os cortes histológicos dos pulmões, dos animais inoculados ou não com células de melanoma e tratados ou não por inalação com veículo ou com M8, foram então avaliados com relação ao perfil histopatológico, após coloração com HE. Os resultados estão representados na Figura 22, onde se observa que no panorama estrutural foram verificadas células de melanoma de morfologia poliédrica (epitelióide) com grandes quantidades de melanina citoplasmática em grânulos ou perinuclear. Foram observadas também padrões de proliferação aberrantes e nodulares nas regiões broncoalveolares característicos do melanoma de padrão epitelióide (Fig. 22B). O tratamento com M8 promoveu representativa diminuição do volume das massas tumorais dos nódulos metastáticos (Fig. 22D).

Com base nestas evidências, o estudo de mediadores de angiogênese e invasividade tornou-se importante. Assim, cortes histológicos do pulmão dos animais tratados ou não, foram submetidos ao ensaio de marcação imunohistoquímica do perlecan, um proteoglicano de heparan sulfato, característico da matriz extracelular e importante para a formação de novos vasos sanguíneos. Surpreendentemente, a expressão do perlecan foi encontrada significativamente diminuída após o tratamento com M8 (Fig. 23A-D). A análise estatística confirmou este resultado e está expressa na Figura 23E.

Não foram verificadas lesões macroscópicas em outros órgãos que justificassem a execução do estudo histopatológico e posterior imunohistoquímica.

COLORAÇÃO HISTOLÓGICA HE

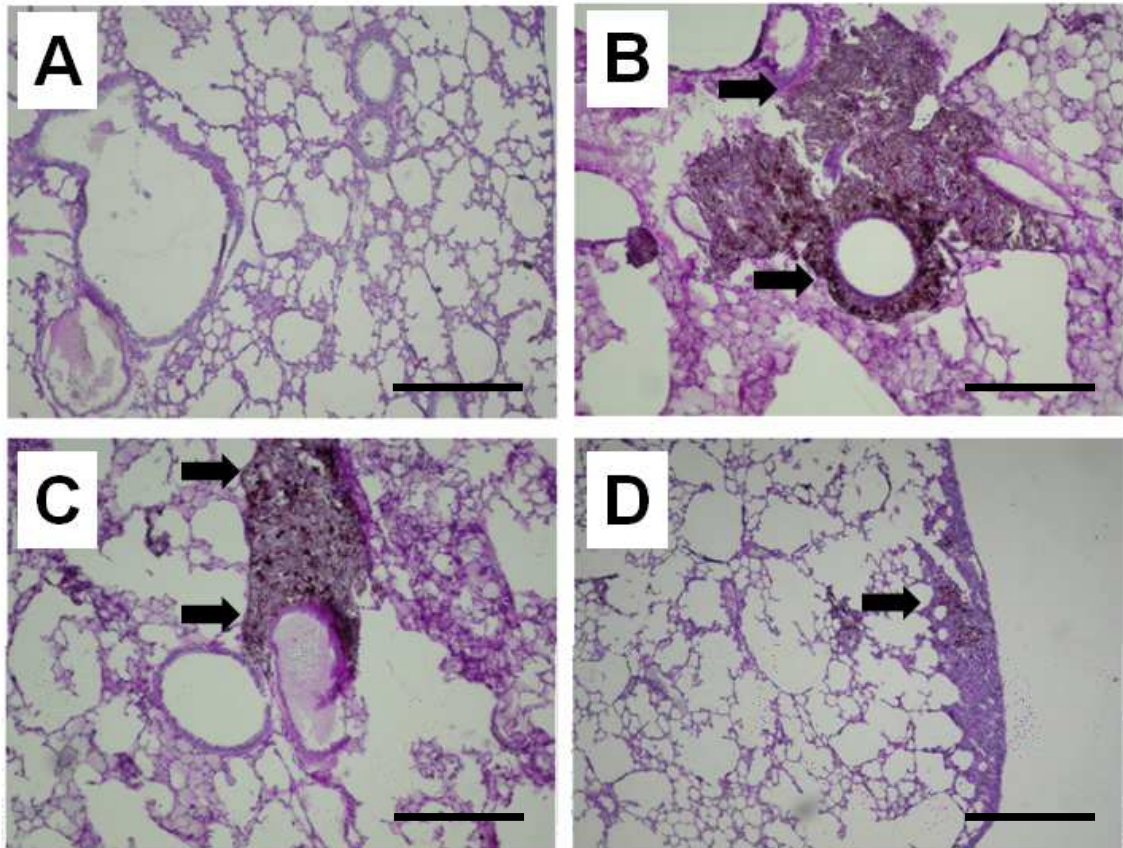


Figura 22: Fig. A: Pulmão normal, isento de células tumorais e de tratamento. Fig. B a D: Pulmões de camundongos com de metástase pulmonar. Fig. B: Controle positivo, isenção de tratamento; Fig. C: Tratamento com o veículo; Fig. D: Tratamento com o M8. O tratamento com M8 promoveu a diminuição do volume e a quantidade dos nódulos tumorais. Barra = 50 μ m.

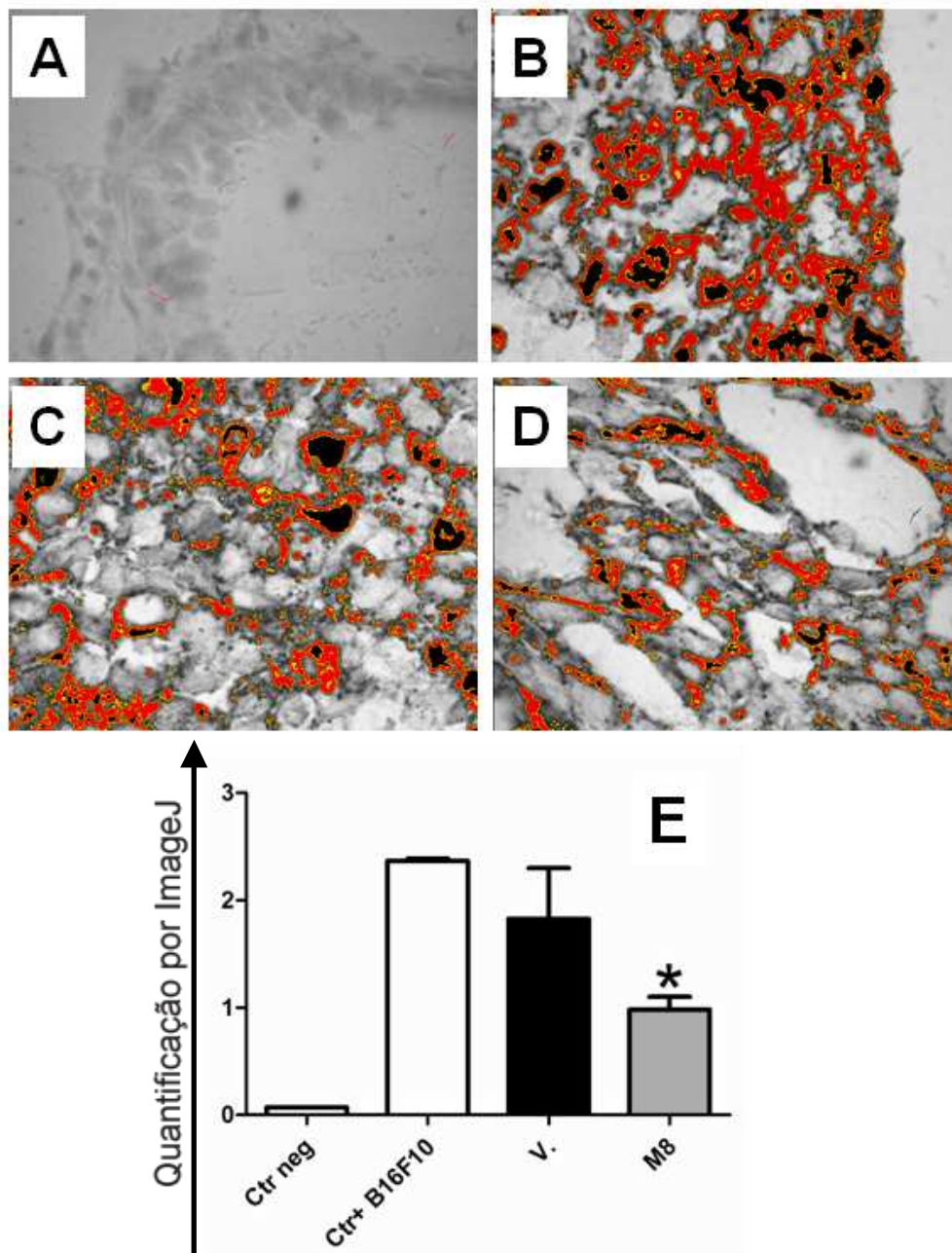


Figura 23: Ensaio de imunohistoquímica para a detecção do perlecan. **A:** Pulmão normal, mostrando praticamente a ausência de marcação para este proteoglicano (Ctr. neg). **B-D:** Pulmões de camundongos com metástase pulmonar, de animais tratados ou não (**B:** controle + B16F10) com veículo (V.) (**C**) ou M8 (**D**). Após o ensaio de imunohistoquímica os tecidos foram contra-colorados com Giemsa, para “mascarar” por metacronias a melanina das células B16F10, gerando um produto final verde escuro, o qual diferencia-se da marcação para o DAB. Utilizando a ferramenta “threshold” do software ImageJ foi selecionada para cada Figura apenas a marcação do DAB, a qual foi mensurada e dividida pela média dos valores obtidos para o mesmo “threshold” dos grupos corados apenas com Giemsa. Os valores finais foram submetidos à ANOVA unifatorial com pós-teste de Tuckey. O grupo M8 demonstrou significativa diminuição na expressão do perlecan (**E**). O eixo y representa a média após distribuição normal. * $P < 0,05$.

6.2. DISCUSSÃO

Células tumorais usam múltiplos mecanismos para escapar da vigilância imunológica. Pouco é conhecido a respeito da efetividade de terapias alternativas e complementares no câncer e os poucos estudos disponíveis na literatura foram realizados em escopo limitado. Apesar disto, a imunoestimulação por produtos naturais vem sendo pesquisada em modelos animais e em pacientes com câncer como uma possibilidade complementar aos procedimentos quimioterápicos convencionais (BELLAVITE *et al.*, 2006; MILAZZO *et al.*, 2006).

Resultados prévios mostraram que CHIs podem ser importantes imunoestimuladores. Pode citar alguns exemplos, como o tratamento de macrófagos murino com um específico CHI, que resultou na diminuição da expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (PIEMONTE; BUCHI, 2002), no aumento da atividade da NADPH oxidase, levou à expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (OLIVEIRA *et al.*, 2006) e promoveu uma expressão gênica diferencial (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Vários estudos já demonstraram resultados promissores do uso de CHIs como terapia complementar para imunomodulação em modelos de câncer (SATO *et al.*, 2005; PASCUAL *et al.*, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2009). Referente a complexos provenientes do extrato de *Calcarea carbonica*, estudos prévios demonstraram efeitos antitumorais promissores em melanoma por estimulação linfocitária por macrófagos ativados *in vitro* (GUIMARÃES *et al.*, 2009).

A progressão do melanoma assim como outros cânceres malignos envolve fatores como a diminuição da expressão da E-caderina e aumento da expressão do CD74 intra e extracelular que confere mobilidade celular e escape da vigilância imunológica, respectivamente (BURTON *et al.*, 2004, TUCCI *et al.*, 2007). Apesar disto a expressão destes marcadores tumorais não demonstrou diferenças significativas após o tratamento com M8 (Fig. 17). Em um estudo com modelo de tratamento com CHIs em camundongos albinos suíços, após inoculação de sarcoma-180, Sato *et al.*, 2005 demonstraram uma grande capacidade desta

categoria deste tratamento em promover aumento dos níveis dos linfócitos TCD4, TCD8 e NK no sangue periférico dos animais. Diferentemente dos camundongos suíços albinos, a linhagem C57BL/6 não demonstrou grandes alterações sobre os linfócitos circulantes da corrente sanguínea, assim como a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais após o tratamento, conforme observado nos resultados apresentados no Capítulo 1. Isto pode ser resultante das características imunológicas (“background”) desta linhagem, a qual possui uma resposta primária mais estabelecida, exibindo uma resposta inata e de Th1 potencializadas (RIVERA; TESSAROLLO, 2008). Assim, o uso dessa cepa de camundongo é limitado para correlações imunológicas, como já comentadas no capítulo 1. No entanto, a cepa C57BL/6 é a mais utilizada para como modelo murino para simular melanoma metastático, tendo em vista que reflete várias características do melanoma metastático humano, além disto, é a única cepa compatível com o modelo de inoculação de células de melanoma B16F10 (OVERWIJK; RESTIFO, 2001).

Em termos de ação do tratamento com M8 neste modelo de metástase de melanoma, podemos concluir que este composto possui ao menos duas funções relevantes: antagonista da expressão do perlecan e inibidor direto de adesão e da capacidade de invasão celular. Perlecan é um importante componente da matriz extracelular e possui forte correlação com vários fatores envolvidos com metástase, angiogênese e capacidade invasiva de células tumorais, em especial de melanoma. O perlecan proveniente de tumor é distribuído em sua matriz extracelular e cria um micro-ambiente apto para iniciar os eventos de neovascularização, crescimento tumoral e invasão (JIANG; COUCHMAN, 2003, JIANG *et al.*, 2004). Este proteoglicano tem sido apontado como potencial alvo em cânceres metastáticos porque representa uma molécula central na integridade e na estruturação da vasculatura tumoral e é o maior depósito do fator de neovascularização FGF-2 (FJELDSTAD; KOLSET, 2005). O impedimento da adesão de células de melanoma nas moléculas de matriz extracelular induz perda de sobrevivência e apoptose, este mecanismo tem sido investigado como uma via terapêutica promissora contra cânceres metastáticos (SMITH *et al.*, 2005,

HEHLGANS; HAASE; CORDES, 2007). O ensaio de invasão de células B16F10 em membranas de sistema “Transwell”, recobertas com matrigel como substrato, mostrou que após o tratamento com M8, as células diminuíram a capacidade de adesão celular, bem como a habilidade proteolítica sobre o substrato. Além disto, basófilos e neutrófilos aumentaram significativamente na corrente sanguínea dos animais com melanoma. Estas células têm sido apontadas como promissoras células da imunidade inata que podem ser estimuladas contra o câncer porque são as primeiras células aptas para detectar anormalidades teciduais como necrose tumoral ou dano tecidual resultante do crescimento tumoral (LOFTI; SCHREZENMEIER; LOTZE, 2009). Estes resultados juntos mostram uma possível “dormência” tumoral associada a diminuição dos nódulos tumorais em quantidade e massa, assim como a reação imunológica excessiva e ineficiente do organismo. Finalmente estes resultados mostram que M8 é um candidato promissor para terapia complementar, de modo a favorecer a eficácia dos tratamentos convencionais por melhorar a resposta imune contra células tumorais ou por afetar diretamente estas células, diminuindo a agressividade tumoral.

7. CONCLUSÃO

Os resultados mostram que diferentes CHIs são promissores como terapia em neoplasias por estimular células do sistema imunitário ou por inibir diretamente funções de células tumorais, assim as conclusões do presente trabalho foram:

- Diferentes composições de CHIs são capazes de influenciar diferentemente respostas imunológicas de camundongos suíços.
- O tratamento com M1 é capaz de inibir *in vitro* a atividade de pNF- κ B de células de adenocarcinoma coloretal humanas, quando tratadas em associação com TNF- α .
- O tratamento *in vitro* com M1 ou com M8 não afetou a atividade de fagocitária de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6, assim como a estimulação ou inibição de expressão de IFN em células MxRage.
- Parâmetros característicos de células tumorais, como a expressão de CD74 e E-caderina, assim como o ciclo celular não foram afetados após o tratamento *in vitro* com M1 ou com M8 em células de melanoma murino B16F10.
- Fatores como adesão, invasão celular foram diminuídos após o tratamento com M1 ou com o M8, em ensaios *in vitro* sobre as células B16F10.
- Em ensaios *in vivo*, M1 ou M8 foram capazes de minimizar a quantidade, bem como o tamanho dos nódulos pulmonares, bem como alteraram a expressão de um fator angiogênico, o perlecam.

Assim, é importante continuar as pesquisas com esse medicamento, pois os resultados sugerem que M1 e M8 sejam moduladores poderosos, coadjuvantes imunoterápicos para melhorar a resposta imunitária contra células tumorais, assim como promissores indutores de “dormência” tumoral.

REFERÊNCIAS

ABUD, A.P.R.; CÉSAR, B.; CAVAZZANI, L.F.M.; DE OLIVEIRA, C.C.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Activation of bone marrow cells treated with Canova *in vitro*. **Cell Biology International**, v. 30(10), p. 808-816, 2006.

ABULAFI, M.; WILLIAMS, N.S. Local recurrence of colorectal cancer: The problem, mechanisms, management and adjuvant therapy. **British Journal of Surgery**, v. 81, p. 7-19, 1994.

ALBERTSSON, P.A.; BASSE, P. H.; HOKLAND, M.; GOLDFARB, R.H.; NAGELKERKE, J.F.; NANNMARK, U.; KUPPEN, P.J.K. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. **Trends in Immunology**, v. 24(11), p. 603-609, 2003.

ANDREOLA, G.; RIVOLTINI, L.; CASTELLI, C.; HUBER, V. *et al.* Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. **Journal of Experimental Medicine**, v. 19, p. 1303-1316, 2007.

ASCIERTO, P.A.; KIRKWOOD, J.M. Adjuvant therapy of melanoma with interferon: lessons of the past decade. **Journal of Translational Medicine**, v. 3(62), p. 1-11, 2008.

ATALLAH, E.; FLAHERTY, L. Treatment of metastatic malignant melanoma. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 6, p. 185-193, 2005.

BELLAVITE, P.; ORTOLANI, R.; PONTAROLLO, F.; PIASERE, V.; BENATO, G.; CONFORTI, A. Immunology and homeopathy. 4. Clinical studies-part 1. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3(3), p. 293-301, 2006.

BENDELAC, A.; SAVAGE, P.B.; TEYTON, L. The biology of NKT cells. **Annual Review in Immunology**, v. 25, p. 297-336, 2007.

BOLLATI-FOGOLÍN, M.; MULLER, W. Virus free, cell-based assay for the quantification of murine type I interferons. **Journal of Immunological Methods**, v. 306, p. 169– 175, 2005.

BOON, T.; COULIE, P.G.; EYNDE, B.J.; BRUGGEN, P. Human T cell responses against melanoma. **Annual Review of Immunology**, v. 24, p. 175-208, 2006.

BUCHI DF, SOUZA W. Internalization of surface components during Fc-receptor mediated phagocytosis by macrophages. **Cell Structure and Function**. v. 18, p. 399–407, 1993.

BURG, M. A.; GRAKO, K. A.; STALLCUP, W. B. Expression of the NG2 proteoglycan enhances the growth and metastatic properties of melanoma cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 177, p. 299–312, 1998.

BURTON, J.D.; ELY, S.; REDDY, P.K.; STEIN, R.; GOLD, D.V.; CARDILLO, T.M.; GOLDENBERG, D.M. CD74 Is Expressed by multiple myeloma and is a promising target for therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 6606–6611, 2004.

CESAR, B.; ABUD, A.P.R.; DE OLIVEIRA, C.C.; CARDOSO, F.; GREMSKI, W.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Activation of mononuclear bone marrow cells treated *in vitro* with a complex homeopathic medication. **Micron**, v. 39, n. 4, p. 461-470, 2007.

CURRAN, S.; MURRAY, G.I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Journal of Pathology**, v. 189, p. 300–308, 1999.

DIETRICH, C.P. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 17, p. 5-15, 1984.

DUDLEY, E.M., WUNDERLICH, J.R., ROBBINS, P.F., YANG, J.C., *et al.* Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. **Science**, v. 298, p. 850-854, 2002.

EDWARD, M.; GILLAN, C.; MICHA, D.; TAMMI, R.H. Tumour regulation of fibroblast hyaluronan expression: a mechanism to facilitate tumour growth and invasion. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 7, p.1215-1223, 2005.

ENGBRING, J.A.; HOFFMAN, M.P.; KARMAND, A.J.; KLEINMAN, K. The B16F10 cell receptor for a metastasis-promoting site on laminin-1 is a heparan sulfate / chondroitin sulfate-containing proteoglycan. **Cancer Research**, v. 62, p. 3549–3554, 2002.

ERNST, E.; SCHMIDT, K. Ukrain – a new cancer cure? A systematic review of randomised clinical trials. **BMC Cancer**, v. 1, p. 5:69, 2005.

FJELDSTAD, K.; KOLSET, S.O. Decreasing the metastatic potential in cancers – Targeting the heparan sulfate proteoglycans. **Current Drug Targets**, v. 6, p. 665-682, 2005.

FRESNO, C.; OTERO, K.; GARCÍA, L.G.; LEÓN, M.C.G.; RANGER, L.S. *et al.* Tumor cells deactivate human monocytes by up-regulating IL-1 receptor associated kinase-M expression via CD44 and TLR4. **Journal of Immunology**, v. 174, n.5, p. 3032-40, 2005.

GANDHI, N.S.; MANCERA, R.L. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. **Chem Biol Drug Des**, v. 72(6): p. 455-482.

GOSH, S; MAITY, P. Augmented antitumor effects of combination therapy with VEGF antibody and cisplatin on murine B16F10 melanoma cells. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 1598-1608, 2007.

GÖTTE M; YIP GW. Heparanase, hyaluronan, and CD44 in cancers: A breast carcinoma perspective. **Cancer Research**, v. 66(21), p. 10233-10237, 2006.

GRINEVICH, Y.; SHALIMOV, S.; BENDYUH, G.; ZAHRIYCHUK, O.; HODYSH, Y. Effect of Ukrain on the growth and metastasizing of Lewis carcinoma in C57BL/6 mice. **Drugs under Experimental and Clinical Research**, v. 31(2), p. 59-70, 2005.

GRUNG, M.A.; ZHANG, T.; SENTMAN, C.L. NK cells rapidly remove B16F10 tumor cells in a perforin and interferon-gamma independent manner in vivo. **Cancer Immunol. Immunother**, v. 56, p. 1153–1161, 2007.

GUIMARÃES, F.S.F.; OLIVEIRA, S.M.; OLIVEIRA, C.C.; DONATTI, L.; BUCHI, D.F. A shorter fixation protocol for transmission electron microscopy: An alternative to spend less time. **Ultrastructural Pathology**, *in press*, 2009.

GUIMARÃES, F.S.F.; ABUD, A.P.R.; OLIVEIRA, S.M.; OLIVEIRA, C.C.; CESAR, B.; DONATTI, L.; GABARDO, J.; TRINDADE, E.S.; BUCHI, D.F. Stimulation of lymphocyte anti-melanoma activity by co-cultured macrophages activated by complex homeopathic medication. **BMC Cancer**, sob revisão, 2009.

HABERMEHL, D.; KAMMERER, B.; HANDRICK, R.; ELDH, T.; GRUBER, C.; CORDES, N.; DANIEL, P.T.; PLASSWILM, L.; BAMBERG, M.; BELKA, C.; JENDROSSEK, V. Proapoptotic activity of Ukrain is based on *Chelidonium majus* L. alkaloids and mediated via a mitochondrial death pathway. **BMC Cancer**, v. 17, p. 6:14, 2006.

HEHLGANS, S.; HAASE, M.; CORDES, N. Signalling via integrins: Implications for cell survival and anticancer strategies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1775, p. 163-180, 2007.

HIND, D.; TAPPENDEN, P.; TUMUR, I.; EGGINGTON, S.; SUTCLIFFE, P.; RYAN, A. **The use of irinotecan, oxaliplatin and raltitrexed for the treatment of advanced colorectal cancer: systematic review and economic evaluation**. Health Technology Assessment, v. 12, 2008.

IVANOV, V.N.; BHOUMIK, A.; RONAI, Z. Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. **Oncogene**, v. 22, p. 3152–3161, 2003.

JANEWAY, C.; TRASVERS, P.; WALPORT, M.; SHOMCHIK, M.J. **Imunobiologia**. Sexta edição, editora Artmed, 2007.

JANDUS, C.; BIOLEY, G.; SPEISER, D. E.; ROMERO, P. Selective accumulation of differentiated FOXP3+ CD4+ T cells in metastatic tumor lesions from melanoma patients compared to peripheral blood. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, v. 57(12), p. 1795-1985, 2008.

JIANG, X.; COUCHMAN, J.R. Perlecan and tumor angiogenesis. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 51(11), p. 1393–1410, 2003.

JIANG, X.; MULTHAUPT, H.; CHAN, E.; SCHAEFER, L.; SCHAEFER, R.M.; COUCHMAN, J.R. Essential contribution of tumor-derived perlecan to epidermal tumor growth and angiogenesis. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 52(12), p. 1575–1590, 2004.

JONAS, W.B.; JACOBS, J. **A cura através da homeopatia**, Rio de Janeiro, editora Campus, 1996.

JONAS, W.; KAPTCHUK, T.J.; LINDE, K. A critical overview of homeopathy. **Annals of Internal Medicine**, v. 138, p. 393-399, 2003.

IIDA, J.; PEI, D.; KANGI, T.; SIMPSON, A.M.; HERLYN, M.; FURCHT, L.T.; MCCARTHY, J.B. Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan regulates matrix metalloproteinase-dependent human melanoma invasion into type I collagen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n.22, p. 18786–18794, 2001.

KASAOKA, T.; NISSHIYAMA, H.; OKADA, M.; NAKAJIMA, M. Matrix metalloproteinase inhibitor, MMI270 (CGS27023A) inhibited hematogenic metastasis of B16 melanoma cells in both experimental and spontaneous metastasis models. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 25(7), p.827-834, 2008.

LAENGLER, A; SPIX, C; SEIFERT, G; GOTTSCHLING, S.; GRAF, N; KAATSCH, P. Complementary and alternative treatment methods in children with cancer: A population-based retrospective survey on the prevalence of use in Germany. **European Journal of Cancer**, v. 44, p. 2233-2240, 2008.

LINDAHL, U. Heparan sulfate-protein interactions - A concept for drug design? **Thrombosis and Haemostasis**, v. 98, n. 1, p. 109-115, 2007.

LOPES, C.C.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, p.157–167, 2006.

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

LOTFI, R.; SCHREZENMEIER, H.; LOTZE, M.T. Immunotherapy for cancer: promoting innate immunity. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, p. 818-832, 2009.

MARTINS, J; FURLANETO, R.P.; OLIVEIRA, L.M.; MENDES, A. *et al.* Comparison of practical methods for urinary glycosaminoglycans and serum hyaluronan with clinical activity scores in patients with Graves' ophthalmopathy. **Clinical Endocrinology**, v. 60, p. 726–733, 2004.

MCCONVILLE, J.T.; WILLIAMS, R.O.; CARVALHO, T.C.; IBERG, A.N.; JOHNSTON, K.P.; TALBERT, R.L.; BURGESS, D.; PETERS, J.I. Design and evaluation of a restraint-free small animal inhalation dosing chamber. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 1, p. 35-42, 2005.

MILLAZO, S.; RUSSELL, N.; ERNST, E. Efficacy of homeopathic therapy in cancer treatment. **European Journal of Cancer**, v. 42, p. 282-289, 2006.

MOLIFE, R.; HANCOCK, B.W. Adjuvant therapy of malignant melanoma. **Current Reviews in Oncology/Hematology**, v. 44, p. 81-102, 2002.

NAKINISHI, C.; TOI, M. Nuclear factor- κ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 297-309, 2005.

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.

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

OVERWIJK, W.W.; RESTIFO, N.P. B16 as a mouse model for human melanoma. **Current Protocols in Immunology**. Hoboken, NJ, John Wiley & Sons, Inc. Cap. 20.21–20.29, p. 3794-3800.

OLIVEIRA, C.C.; OLIVEIRA, S.M.; GOES, V.M.; PROBST, C.M.; KRIEGER, M.A.; BUCHI, D.F. Gene expression profiling of macrophages following mice treatment with an immunomodulator medication. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 104(4), p. 1364-1377, 2008.

PEREIRA, W.K.V.; LONARDONI, M.V.C.; GRESPAN, R.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; CUMAN, R.K.N.; BERSANI-AMADO, C.A. Immunomodulatory effect of Canova medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. **Journal of Infection**, v. 51, n. 2, p. 157-164, 2005.

PIEMONTE, M.R.; BUCHI, D.F. Analysis of IL-12, IFN- γ and TNF- α 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, n. 4, p. 255-263, 2002.

PIKARSKY, E.; BEN-NERIAH, Y. NF- κ B inhibition: A double-edged sword in cancer? **European Journal of Cancer**, v. 42, p. 779–784, 2006.

QIAN, F.; ZHANG, Z.; WU, X.; LI, Y.; XU, Q. Interaction between integrin $\alpha 5$ and fibronectin is required for metastasis of B16F10 melanoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 333, p. 1269–1275, 2005.

RIGEL, D.S.; CARUCCI, J.A. Malignant melanoma: Prevention, early detection, and treatment in the 21st century. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 50, p. 215-236, 2000.

RIVERA, J.; TESSAROLLO, L. Genetic background and the dilemma of translating mouse studies to humans. **Immunity**, v. 28, p. 1-4, 2008.

RUDRABHATLA, S.R.; MAHAFFEY, C.L.; MUMMERT, M.E. Tumor microenvironment modulates hyaluronan expression: The lactate effect. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, p. 1378–1387, 2006.

RUIZ, R. **A montagem da teoria da dinamização dos medicamentos homeopáticos de Samuel Hanemann**, São Paulo, 1999. Tese de doutorado – Pontifícia Universidade Católica de São Paulo.

SARRABAYROUSE, G.; SYNAEVE, C.; LEVEQUE, K.; FABRE, G.; TILKIN-MARIAME, A. Statins Stimulate *in vitro* membrane FasL expression and lymphocyte apoptosis through RhoA/ROCK pathway in murine melanoma cells. **Neoplasia**, v. 9, n. 12, p. 1078 – 1090, 2007.

SATO, D.Y.O.; WAL, R.; DE 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 Brazilian homeopathic medication. **Homeopathy**, v. 94, n. 1, p. 26-32, 2005.

SMITH, C.H.; GULOBOVSKAYA, V.M.; PECK, E.; XU, L.; MONIA, B.P.; YANG, X.; CANCE, W.G. Effect of focal adhesion kinase (FAK) downregulation with FAK antisense oligonucleotides and 5-fluorouracil on the viability of melanoma cell lines. **Melanoma Research**, v. 15, p. 357-362, 2005.

SELIGMANN, I.C.; LIMA, P.D.; CARDOSO, P.C.; KHAYAT, A.S.; BAHIA, M.O.; BUCHI, D.F.; CABRAL, I.R.; BURBANO, R.R. The anticancer homeopathic composite “Canova Method” is not genotoxic for human lymphocytes *in vitro*. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 2, p. 223-228, 2003.

SMYTH, M.J.; HAYAKAWA, Y.; TAKEDA, K.; YAGITA, H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 850-861, 2002.

STOITZNER, P.; GREEN, L.K.; JUNG, J.Y.; PRICE, K.M.; ATAREA, H.; KIVELL, B.; RONCHESE, F. Inefficient presentation of tumor-derived antigen by tumor-infiltrating dendritic cells. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, v. 57(11), p. 1665-1673, 2008.

TAKAHACHI, G.; MALUF, M.L.F.; DALALIO, M.M.O.; BERSANI-AMADO, C.A. CUMAN RKN. *In vivo* and *in vitro* effects of the Canova medicine on experimental infection with *Paracoccidioides brasiliensis* in mice. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 38, n.5, p. 350-354, 2007.

THOMPSON, J.F.; SCOLYER, R.A.; KEFFORD, R.F. Cutaneous melanoma. **Lancet**, v. 365, p. 687–701, 2005.

TUCCI, M.G.; LUCARINI, G.; BRANCORSINI, D.; ZIZZI, A.; PUGNALONI, A.; GIACCHETTI, A.; RICOTTI, G.; BIAGINI, G. Involvement of E-cadherin, b-catenin, Cdc42 and CXCR4 in the progression and prognosis of cutaneous melanoma. **Dermatopathology**, v. 157, p. 1212–1216, 2007.

VOJDANI, A.; ERDE, J. Regulatory T cells, a potent immunoregulatory target for CAM researchers: Modulating tumor immunity, autoimmunity and alloreactive immunity (III). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, p. 309-316, 2006.

WANG, C.; CUSACK, J.C.; LIU, J.R.; BALDWIN, A.S. Control of inducible chemoresistance: Enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF- κ B. **Nature Medicine**, v. 5, p. 412-417, 1999.

ZHANG, A.; WU, Y.; LAI, H.W.L.; YEW, D. Apoptosis – A brief review. **Neuroembryology**, v. 5, n.3, p. 47-59, 2004.

ZHAO, W.; LIU, H.; XU, S.; ENTSCHLADEN, F. *et al.* Migration and metalloproteinases determine the invasive potential of mouse melanoma cells, but not melanin and telomerase. **Cancer Letters**, v. 162, p. 49-55, 2001.

ANEXO: CERTIFICADO CEEA / UFPR



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 302

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regimint, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.009225/2008-19

APROVADO:

25/03/2008 – R.E. 01/2008

TÍTULO: Pesquisa em células inflamatórias utilizando o medicamento homeopático
Canova: um estudo da interação entre macrófagos e linfócitos em co-cultura

AUTORES: Dorly de Freitas Buchi, Edvaldo da Silva Trindade, Fernando de Souza
Fonseca Guimarães, Eric Felipe Yugi Maruyama, Lucas Ferrari de Andrade,
Ediely de Oliveira Coletto

DEPARTAMENTO: Biologia Celular

Prof.ª Dr.ª Ana Maria C. Filadelfi
Coordenadora do CEEA

