

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCAS FERRARI DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO MEDICAMENTO M1 SOBRE O MELANOMA MURINO
“*IN VIVO*”**

CURITIBA

2011

LUCAS FERRARI DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO MEDICAMENTO M1 SOBRE O MELANOMA MURINO
“*IN VIVO*”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof Dr. Edvaldo da Silva Trindade

Co-orientadora: Profa Dra. Dorly de Freitas Buchi

CURITIBA

2011

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Andrade, Lucas Ferrari de

Avaliação da ação do medicamento M1 sobre o melanoma murino "in vivo" / Lucas Ferrari de Andrade. – Curitiba, 2011.

64.f.: il. color.; 30cm.

Orientador: Edvaldo da Silva Trindade

Co-orientadora: Dorly de Freitas Buchi

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

1. Melanoma 2. Câncer de pele I. Título II. Trindade, Edvaldo da Silva III. Buchi, Dorly de Freitas IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

CDD (20. ed.) 616.994

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 Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

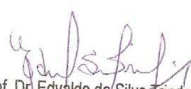
DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Lucas Ferrari de Andrade** no dia 11 de novembro de 2011, no Setor de Ciências Biológicas (UFPR) defendeu sua Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular, intitulada: **Avaliação da ação do medicamento M1 sobre o melanoma murino "in vivo"**, com a banca examinadora constituída, pelos professores: Dr. Michel Fleith Otuki (UEPG), Dr. Marco Antonio Ferreira Randi (UFPR), e Dr. Edvaldo da Silva Trindade (da UFPR, como orientador e presidente da Banca Examinadora), e tendo sido Aprovado.

A solicitação de emissão do Diploma de Mestre em Biologia Celular e Molecular ficará condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Esta Declaração tem validade por 60(sessenta) dias, a partir da data da mesma.

Curitiba, 11 de novembro de 2011.


Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

AGRADECIMENTOS:

À Deus pela vida, benevolência, compaixão e amor para comigo.

À minha esposa Stephany, que por amor me ajudou com essa tarefa.

À minha família, pelo amparo infalível e incondicional em todos os momentos.

Aos meus amigos, pelos momentos de esparecimentos.

Ao Edvaldo, pela assistência intelectual para o ingresso na pós-graduação, pela orientação durante o mestrado, pelo apoio para o pedido da progressão para o doutorado, por ser padrinho do meu casamento, e muito mais pela sua forte amizade.

À Dorly, pela orientação desde a iniciação científica e até os dias atuais, pela assistência durante o mestrado, pela inesquecível viagem para Foz do Iguaçu “dos quatis”, Rosário e Montevideo, e também pela sua sincera amizade.

À Carolina, pelas discussões de protocolo e experimentos, pela ajuda com a língua inglesa, pela organização do laboratório, e pela sua amizade.

À Célia Regina, pelo apoio às atividades que foram aqui desenvolvidas, pela ajuda com os protocolos, e pela sua valorosa amizade.

Ao Gustavo, Aline e Cléber, pela constante e inesquecível ajuda, em especial com os tratamentos nos finais de semana, pela confiança, por serem três amigos e profissionais sem os quais esse trabalho não se realizaria, e pelas suas inestimáveis amizades.

Ao Fernando, que, mesmo estando em Paris, pude contar com o auxílio científico e com sua amizade.

Ao demais, mas não menos importantes, integrantes da equipe dos laboratórios de 'Pesquisa em Células Inflamatórias e Neoplásicas' e 'Investigação de Polissacarídeos Sulfatados', para os quais os meus sinceros agradecimentos: André, Beatriz, Daniel, Diego, Diogo, Elisa, Eneida, Fernando, Francine, Jenifer, Kátia, Márcio, Pablo, Simone, Stelée, Rafael, Raffaello.

Ao Rafael e ao Cândido, pelo fornecimento dos camundongos, pelos esclarecimentos sobre a experimentação com animais, pelas boas conversas, e pela boa amizade.

Ao biotério central da UFPR, pela ajuda com a manutenção dos animais e pelo agradável convívio.

Aos professores, técnicos - administrativos e demais pós-graduandos do Departamento de Biologia Celular e Farmacologia.

À CAPES, CNPQ, SETI e Fundação Araucária pelo auxílio financeiro.

À Universidade Federal do Paraná, e ao programa de pós-graduação.

***Os que semeiam em lágrimas segarão
com alegria.***

(Salmos 126 : 5)

RESUMO

O melanoma metastático é o câncer de pele com maior agressividade, sendo responsável por milhões de mortes a cada ano. Muitos pacientes com câncer buscam terapias complementares para serem utilizadas em conjunto com as terapias convencionais. A homeopatia está entre as terapias complementares mais utilizadas para o tratamento do câncer. O complexo altamente-diluído codificado como 'M1' é um produto manipulado de acordo com a técnica homeopática padrão. Estudos anteriores constataram que esse produto possui atividade anti-metastática contra o melanoma de camundongo em modelo de colonização pulmonar. No presente estudo, utilizando um modelo de melanoma subcutâneo em camundongos, foi avaliado se ele possui também atividade contra a formação de um tumor sólido. Para isso, camundongos foram inoculados subcutaneamente com células de melanoma murino (linhagem B16-F10), e após 24 horas da inoculação foram tratados por inalação durante 14 dias. Após esse período, os tumores foram removidos e analisados. Cortes histológicos dos tumores foram processados para histologia convencional e imunohistoquímica para PCNA, ácido hialurônico (AH), CD44 e AT1R. O tratamento com M1 foi capaz de reduzir o crescimento tumoral do melanoma ($p < 0,05$). Este efeito pode ser decorrente da regulação negativa da angiogênese tumoral, avaliada pela imunohistoquímica para AH, uma vez que os tumores oriundos de animais que foram tratados apresentaram uma significativa redução no número de novos vasos sanguíneos ($p < 0,05$). A angiotensina II por si só já é um fator angiogênico e a cascata de sinalização intracelular iniciada pela sua ligação com o receptor celular AT1R desencadeia a formação de novos vasos. Talvez essa redução na neoangiogênese dos tumores do grupo M1 seja decorrente do menor número de células positivas para o AT1R na periferia tumoral ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças com o uso dos demais marcadores. É fundamental a continuidade de estudos envolvendo esse produto, pois além de não apresentarem efeitos colaterais, até agora mostraram efeitos rápidos e impactantes na redução da evolução tumoral.

Palavras-chave: melanoma; produtos altamente-diluídos; angiogênese tumoral; receptor tipo 1 da angiotensina II (AT1R)

ABSTRACT

Metastatic melanoma is the most aggressive skin cancer and it is responsible for millions of deaths every year. Many patients with cancer look for some kind of complementary therapy in order to use it together with the conventional ones. Homeopathy is among the most used complementary therapies against cancer. The highly diluted complex called 'M1' is prepared according to standard homeopathy technique. Previous studies showed that this complex has anti-metastatic activity against mouse melanoma, when analyzed using experimental metastasis model. Here, using a model for mouse melanoma growth, it was verified M1 has activity on the development of a solid tumor. For this purpose, mice were subcutaneously injected with B16-F10 mouse melanoma cells. The treatment with M1 was started 24 hours after the injection by inhalation for 14 days. Subsequently, tumors were removed and analyzed. Sections from tumors were processed for conventional histology and immunohistochemistry techniques for PCNA, hyaluronic acid, CD44 and AT1R. M1 treatment was effective in reducing melanoma tumor growth ($p < 0.05$). This can be a consequence of the modulation of tumor angiogenesis, analyzed by hyaluronic acid immunohistochemistry, since M1 tumors have fewer vessels ($p < 0.05$). Angiotensin II receptor 1 (AT1R) plays a role in angiogenesis and its interaction with angiotensin II molecule initializes intracellular signaling that leads to new vessels formation. The angiogenesis reduction by M1 would be related with fewer cells AT1R+ on tumor peripheries ($p < 0.05$). There were not found differences between M1 and no treated tumors related to the others immunohistochemistries. It is fundamental to continue the study of this product, since it does not have side effects, and has been showed its activity against tumor development.

Key-words: melanoma; highly diluted products; tumor angiogenesis; AT1R.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - O Melanoma Maligno.....	12
FIGURA 2 - Os seis níveis de Clark.....	14
FIGURA 3 - Efeito do tratamento dos CADs na formação de nódulos tumoriais de colonização pulmonar.....	25
FIGURA 4 - <i>Tratamento com M1 através de nebulização.....</i>	29
FIGURA 5 - <i>Análise histológica com ImageJ (NIH).....</i>	32
FIGURA 6 - <i>O tratamento com M1 reduz o crescimento tumoral subcutâneo.....</i>	35
FIGURA 7 - <i>Maior área de necrose pelo tratamento com M1.....</i>	37
FIGURA 8 - <i>Ausência de células em divisão nas áreas de necrose.....</i>	37
FIGURA 9 - <i>Avaliação da área do corte histológico.....</i>	39
FIGURA 10 - <i>Aumento da necrose tumoral pelo tratamento com M1.....</i>	40
FIGURA 11 - <i>Imunohistoquímica para identificação de vasos sanguíneos.....</i>	42
FIGURA 12 - <i>Menor quantidade de pequenos vasos pelo tratamento com M1.....</i>	43
FIGURA 13 - <i>Tratamento com M1 não altera a quantidade de CD44.....</i>	44
FIGURA 14 - <i>Não alteração da quantidade de AT1R intratumoral pelo tratamento com M1.....</i>	45
FIGURA 15 - <i>Tratamento com M1 reduziu a quantidade de células AT1R+ na periferia tumoral.....</i>	46
FIGURA 16 - <i>Diminuição da colonização pulmonar após tratamento com M1.....</i>	48
FIGURA 17 - <i>Redução na marcação para ácido hialurônico e seu receptor.....</i>	49

SUMÁRIO

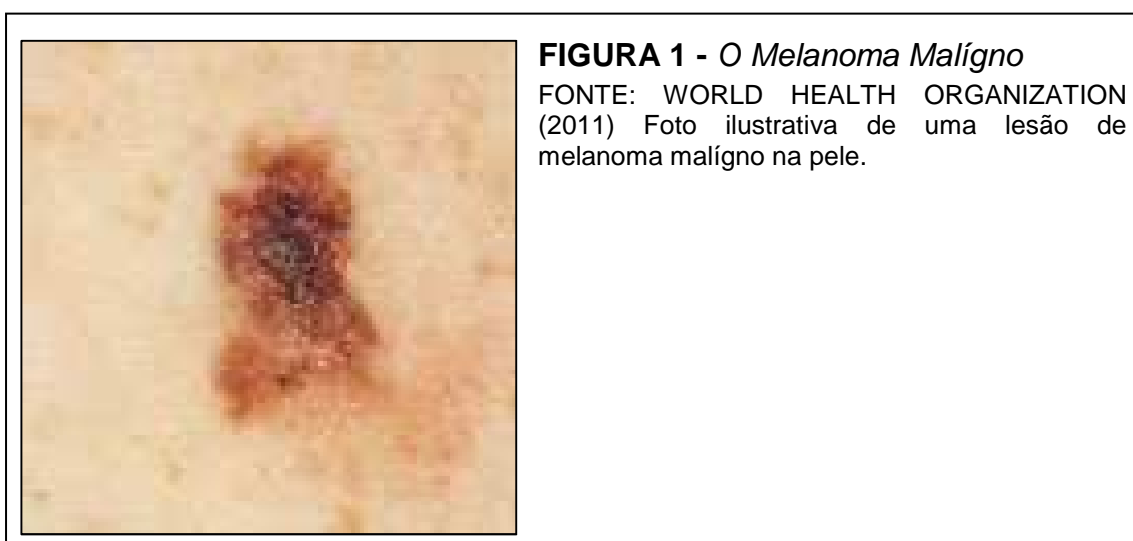
1. INTRODUÇÃO.....	12
A. MELANOMA.....	12
<i>I. Transformação Maligna dos Melanócitos.....</i>	<i>14</i>
<i>II. Crescimento Tumoral e Angiogênese.....</i>	<i>17</i>
<i>III. Metástase.....</i>	<i>19</i>
<i>IV. Modelos Biológicos de Crescimento Tumoral e Metástase Experimental.....</i>	<i>20</i>
B. PRODUTOS COMPLEXOS ALTAMENTE-DILUÍDOS.....	21
<i>I. Complexo M1.....</i>	<i>24</i>
2. OBJETIVOS.....	26
A. Geral.....	26
B. Específicos.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
A. Medicamento Complexo Altamente-Diluído (M1).....	27
B. Cultivo Celular e Animais.....	28
C. Modelo de Crescimento Tumoral.....	28
D. Processamento Histológico.....	29
E. Análises Histopatológicas dos Tumores Sólidos.....	30
F. Modelo de Metástase Experimental.....	32
G. Análises Estatísticas.....	33
4. RESULTADOS.....	34
A. O tratamento com M1 reduziu o crescimento tumoral.....	34
B. Aumento da porcentagem de áreas de morte celular nos tumores de animais tratados com M1.....	35
C. O tratamento com M1 reduziu a quantidade de novos vasos.....	40

D. O tratamento com M1 não altera a expressão do Receptor para o Ácido Hialurônico (CD44).....	43
E. O tratamento com M1 não altera a expressão de AT1R intratumoral, mas reduz a presença de células AT1R+ na periferia do tumor.....	44
F. O tratamento com M1 reduz a colonização pulmonar pelo melanoma.....	47
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXO.....	64
<i>Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....</i>	64

1. INTRODUÇÃO

A. *Melanoma:*

O câncer é a principal causa de morte de seres humanos no mundo inteiro. Em 2008 foram relatados mais de 7,6 milhões de óbitos em decorrência de câncer, e é projetado que este número continue a aumentar, podendo atingir mais de 11 milhões de mortes em 2030. Entre os tipos de neoplasias, o melanoma metastático (FIGURA 1) é o câncer de pele com maior letalidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). O melanoma surge da transformação maligna das células produtoras de pigmento, chamadas de melanócitos. Esse processo é dependente de uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais.



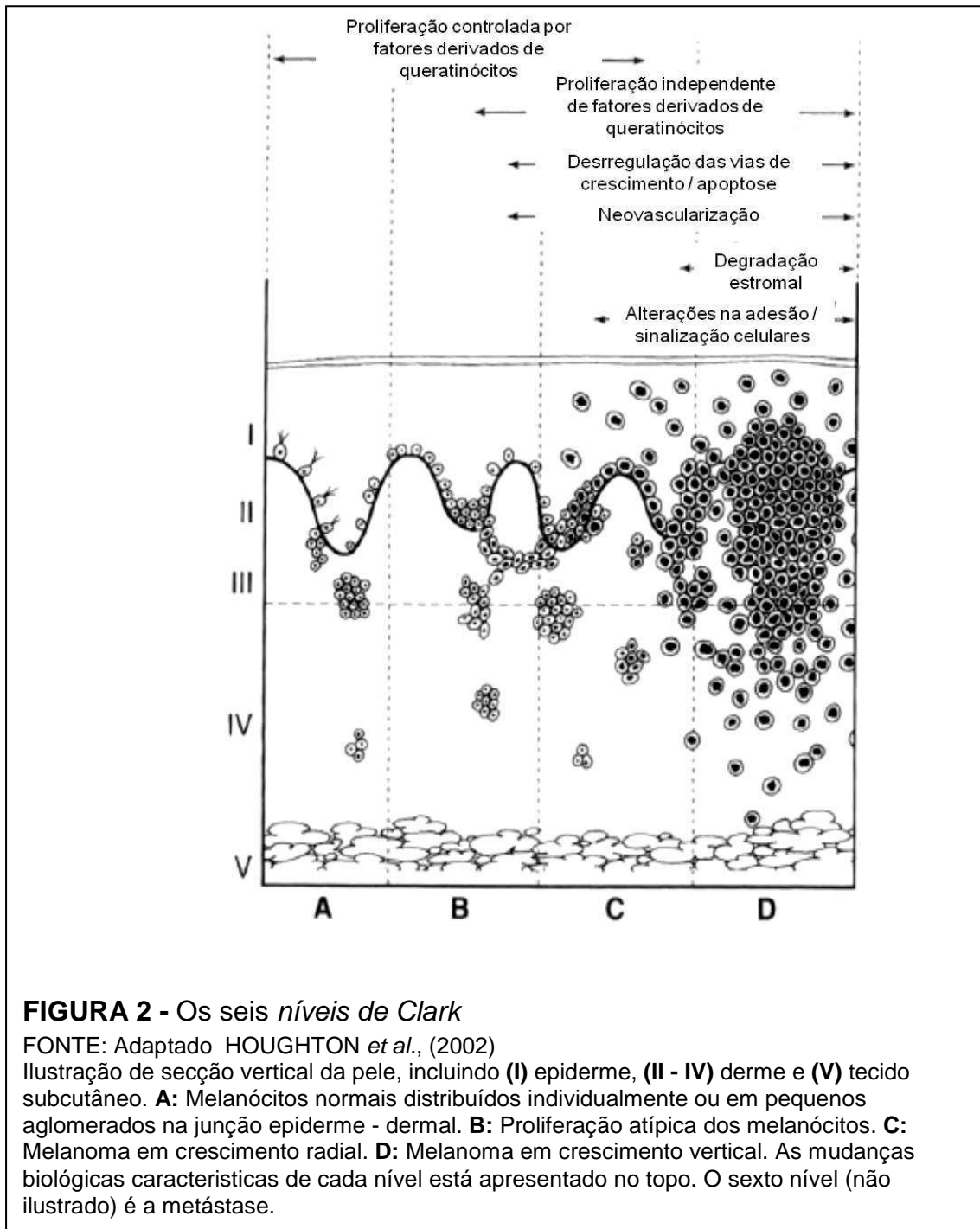
O principal fator ambiental que contribui para o surgimento de melanoma é a exposição solar, principalmente em áreas da pele não protegidas, como as mãos e rosto. Entretanto, muito embora os fatores ambientais sejam importantes para o desenvolvimento do melanoma, os fatores genéticos continuam sendo o principal risco para o desenvolvimento da doença, uma vez que o surgimento do melanoma é predominante em indivíduos de pele pouco pigmentada (caucasianos) (HOUGHTON *et al.*, 2002).

O melanoma é um tumor maligno com capacidade de metástase a partir de pequenas massas tumorais (LEITER *et al.*, 2004). O seu desenvolvimento pode ser

dividido em seis etapas: 1) Surgimento de manchas melanocíticas (comumente chamadas de “pintas”); 2) Hiperplasia melanocítica com diferenciação “aberrante”; 3) Displasia das manchas melanocíticas, com núcleo atípico; 4) Crescimento radial do melanoma primário; 5) Crescimento vertical do melanoma primário; 6) Melanoma metastático (CLARK *et al.*, 1984) (FIGURA 2).

A “diferenciação aberrante”, citada na segunda etapa do desenvolvimento do melanoma, é caracterizada apenas pelo não desaparecimento das células melanocíticas alteradas. Essas manchas são constituídas de melanócitos com proliferação celular descontrolada e focada em uma região (CLARK *et al.*, 1984). Uma vez que o organismo possui mecanismos imunológicos de defesa contra a formação de tumores (BOON *et al.*, 2006), as manchas melanocíticas na maioria das vezes não se desenvolvem para tumores primários, tornando-se lesões terminais, que não evoluem para melanoma (HOUGHTON *et al.*, 2002). Mas, se o melanoma se desenvolver a partir de um precursor, a displasia melanocítica serve como “ponto de partida”.

O melanoma primário não segue de uma vez o caminho de expansão, mas sim de forma gradual. Inicialmente, ele passa pela fase de crescimento radial, que é caracterizado pelo alargamento do melanoma em sua periferia, aumentando o diâmetro de sua forma de circunferência imperfeita. Nesta etapa, ainda não ocorre o fenótipo de metástase. Para o melanoma adquirir a competência de metastizar, ele precisa avançar para o próximo estágio de desenvolvimento: o crescimento vertical. Este é perpendicular ao crescimento radial. E, como regra, essas células de crescimento vertical crescem de forma expansiva, com degradação do tecido adjacente, o que é uma característica da metástase (CLARK *et al.*, 1984) (FIGURA 2).



I. *Transformação Maligna dos Melanócitos:*

O processo de transformação de células normais em neoplásicas está associado à moléculas / proteínas que desempenham importantes papéis no controle da proliferação celular. Modificações pós-traducionais, ocasionadas por mutações em genes que codificam para a produção de algumas proteínas

envolvidas na ativação ou desativação em processos críticos de sinalização celular, estão envolvidas na transformação e progressão maligna.

O fator de transcrição p53, por exemplo, regula a expressão de genes envolvidos na interrupção da progressão do ciclo celular e posterior apoptose. Sua inibição é crucial para o desenvolvimento de muitos tumores, pois ele bloqueia o ciclo celular em caso de dano ao DNA, durante a fase de replicação do material genético (Fase S da Intérfase). Sendo assim p53 também é chamado de proteína de inibição de tumor (ALBERTS *et al.*, 2008). Em condições normais, o nível de p53 é mantido muito baixo através do efeito de ubiquitinação e degradação por proteossomo pela atividade de uma ubiquitinoligase (HDM2 em humanos, e MDM2 em camundongos). Em condições de estresse, como dano ao DNA, a proteína p53 sofre várias modificações, como fosforilação e acetilação, que a estabiliza e a ativa para a regulação da expressão gênica (SHEN *et al.*, 2011). Mutações em p53, que a tornem inoperante, são extremamente raras em melanomas. Entretanto, o aumento da expressão do inibidor de p53, o HDM2, é comumente encontrado em células de melanoma, o que sugere uma desregulação da capacidade inibitória da proliferação celular por dano ao DNA. A constatação de que o HDM2 é superexpresso em melanoma invasivo sugere que essa proteína constitui um elemento essencial para a transformação maligna dos melanócitos (POLSKY *et al.*, 2001). Também, a proteína Apaf-1, que é uma molécula supressora tumoral e também um co-fator da Caspase-9, é considerada como chave para a apoptose dependente da p53, e em melanomas metastáticos encontra-se inativada. (SOENGAS *et al.*, 2001).

Também, foi constatado que alterações em uma proteína que atua conjuntamente com a DNA polimerase para a replicação do DNA, chamada Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), estão presentes em muitos tipos de cânceres. Normalmente, a PCNA encontra-se ligada à DNA polimerase durante a replicação, o que estabiliza a ligação da enzima ao DNA. Essa característica também aumenta a atividade das polimerases (MOLDOVAN *et al.*, 2007). Sendo assim, a PCNA é comumente utilizada para identificar células em divisão através de técnicas de imunohistoquímica ou imunocitoquímica (LEONARDI *et al.*, 1992). Conjuntamente com a atividade da replicação do DNA, a PCNA também atua como

ativador dos mecanismos de reparo do DNA. Quando o complexo de replicação, constituído pela DNA polimerase, PCNA e os demais componentes, chegam à uma região danificada do DNA, ocorre um bloqueio da replicação. Esse bloqueio pode resultar em uma interrupção da replicação e posterior apoptose. Para evitar isto, na células tumorais existem mecanismos para ignorar as regiões danificadas e continuar a replicação. Um desses mecanismos está no fato de que a própria polimerase incorpora nucleotídeos com baixa especificidade na região da fita danificada que em duplicação. Isso dá continuidade ao processo de replicação, embora perpetue o erro. Entretanto, existe um sistema para correção das regiões danificadas, chamado de TLS, que é livre de erros. Mas, sabe-se apenas que ele compartilha algumas características com a recombinação homóloga, utilizando a informação não danificada da fita dupla irmã como um modelo (MOLDOVAN *et al.*, 2007).

Sabe-se que a PCNA é crucial para ativar o mecanismo que ignora o dano ao DNA e perpetua o erro. Estudos recentes demonstraram que uma versão mutada mono-ubiquitinizada da PCNA tem maior afinidade à DNA polimerase do que a PCNA não mutada. Isso contribui para a retomada da replicação após um ponto de dano (SHEN *et al.*, 2011). Também, essa mono-ubiquitinização leva à ativação do mecanismo que adiciona nucleotídeos com baixa especificidade (MOLDOVAN *et al.*, 2007).

Por outro lado, o gene para a produção da proteína p21 (uma inibidora de quinases dependentes de ciclinas que é mediadora chave para a interrupção do ciclo celular dependente da p53) também tem sido considerado como um novo oncogene (GARTEL, 2006). Uma vez que a atividade da p53 encontra-se alterada em vários tipos de cânceres, isso pode se refletir na atuação da p21. Além disso, ela também regula a atividade da PCNA, pois a ligação dela com a DNA polimerase é mediada pela p21 (MOLDOVAN *et al.*, 2007).

Surpreendentemente, a transformação maligna dos melanócitos também está associada com a adesão celular ao substrato. Oba-Shinjo e colegas demonstraram alterações fenotípicas nas células de uma linhagem não tumoral de melanócitos (melan-A), que foram submetidas ao impedimento de ancoragem pela manutenção em suspensão, após seqüências de ciclos celulares. Essas células

modificadas multiplicaram-se mais rapidamente do que a melan-A e possuíam maiores quantidades de moléculas diretamente relacionadas com a malignidade de células de melanoma, como o Perlecan (OBA-SHINJO *et al.*, 2006), um proteoglicano característico da matriz extracelular.

II. Crescimento Tumoral e Angiogênese:

A formação de um tumor sólido é dependente do fornecimento de nutrientes às células tumorais através dos vasos sanguíneos. Os tumores sólidos são constituídos de células neoplásicas e não-neoplásicas inseridas na matriz extracelular (MEC). Dentre as células não-neoplásicas que constituem um tumor, as endoteliais vasculares, organizadas em tubos capilares, são as responsáveis pelo fornecimento de nutrientes presentes no sangue. Essas células são atraídas para o tumor através de diversos fatores de crescimento, como por exemplo, o Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) e então formam uma rede de distribuição de sangue intratumoral constituído de capilares, ligados à vasos extratumorais pré-existentes ou não (FUKUMURA *et al.*, 2007).

O VEGF regula a formação de novos vasos sanguíneos e linfáticos. Essa família de fatores de crescimento de células do endotélio vascular é produzida pelas próprias células endoteliais, mas também por células estromais e hematopoiéticas. Em mamíferos, existem quatro tipos diferentes de VEGF, nomeados de A - D (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, e VEGF-D). Estes compostos são glicoproteínas diméricas, de 40 kDa ligadas por pontes dissulfetos entre resíduos de cisteínas (CÉBE-SUAREZ *et al.*, 2006). Os receptores para os VEGFs, chamados de VEGFRs, são receptores tirosinoquinases. Três deles foram identificados: VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3. A ligação do VEGFR1 com o VEGF-A ou VEGF-B é a principal via pela qual ocorre a angiogênese. Após a interação do receptor com o ligante, a atividade tirosinoquinase do receptor é ativada e desencadeia uma cascata de sinalização intracelular, das quais uma delas é a da MAPKinase, que resulta em um estímulo para a proliferação e migração celular. A sensibilização das células endoteliais e organização em tubos vasculares é dependente da ativação da PI3K/Akt pela cascata de sinalização iniciada com a ativação do VEGFR1 (KOCH *et al.*, 2011).

A angiogênese tumoral é predominantemente dependente da sinalização celular desencadeada pelos VEGFs, sendo que os dois receptores mais importantes são o VEGFR1 e VEGFR2 (HIRATSUKA *et al.*, 2001). No caso do melanoma, existem evidências de que o VEGF pode ser produzido por células hematopoiéticas intratumorais, atuando então como um quimioatractante para progenitores de células endoteliais vasculares (MARNEROS *et al.*, 2009). No caso de neutrófilos infiltrados no tumor, estes secretam metaloproteases (MMP) (com p.ex. MMP-9), que por sua vez degradam a MEC, liberando fatores de crescimento que se encontravam retidos (dentre eles o VEGF), o que contribui com a angiogênese (NOZAWA *et al.*, 2006). De modo semelhante, progenitores de células dendríticas infiltrantes foram também identificados como promotores da angiogênese tumoral através da produção de VEGF (CONEJO-GARCIA *et al.*, 2004).

Sabe-se que as células tumorais possuem a capacidade de alterar o comportamento dos componentes celulares do sistema imunológico, suprimindo as suas funções básicas de defesa contra organismos invasores e até mesmo contra neoplasias, e se beneficiando de fatores produzidos por essas células (LEE *et al.*, 2006; INOUE *et al.*, 2002). Fragmentos solúveis de ácido hialurônico são exemplo dos fatores que as células tumorais secretam para alterar a atividade de macrófagos associados a tumor (TAMs). Após exposição a esses fatores, os macrófagos começam a secretar citocinas imunossupressoras, como a interleucina-10 (IL-10), que inibem a resposta antitumoral (KUANG *et al.*, 2008).

Utilizando o modelo de crescimento tumoral subcutâneo de melanoma murino, constatou-se que camundongos deficientes para o receptor tipo 1 da angiotensina II (AT1R) possuem menor crescimento tumoral, devido à menor quantidade de vasos intratumorais, e portanto, angiogênese tumoral reduzida. Também foi verificado que o tecido da periferia tumoral é rico em células positivas para um marcador de macrófagos, o F4/80, e que essa marcação é mais evidente em camundongos do tipo selvagem, que possuíam a expressão do AT1R em suas células, quando comparado com o deficiente para AT1R (AT1R^{-/-}). E por fim, foi verificado que estes macrófagos produziam VEGF (EGAMI *et al.*, 2003).

A droga farmacológica anti-hipertensiva chamada Losartana, que bloqueia o receptor AT1R, mostrou-se eficaz na redução do crescimento tumoral de melanoma,

no modelo subcutâneo em camundongos. Os animais tratados com o Losartana possuíam tumores menores e com menos vasos sanguíneos tumorais. Também, a expressão de VEGF intratumoral foi significativamente reduzida. Além do mais, tumores oriundos de pacientes humanos mostraram positividade na imunohistoquímica, para a angiotensina II (OTAKE *et al.*, 2009).

Sendo assim, uma vez que a inibição da angiogênese tumoral através de bloqueadores do sistema angiotensina para a produção de novos vasos é baseada na redução da expressão de VEGF intratumoral, ou por redução da quantidade de células VEGF positivas na periferia tumoral, novas drogas podem emergir como agentes terapêuticos para avaliações experimentais em animais e em pacientes com câncer (GARDLIK *et al.*, 2011). Afinal, além do fato de que a angiotensina II por si só já é um fator angiogênico, a cascata de sinalização intracelular iniciada pela ligação dessa proteína com o seu receptor leva à expressão de VEGF pelas células endoteliais (DESHAYES *et al.*, 2005).

III. Metástase:

A metástase é um processo complexo que ocorre através de uma série sequencial de passos, que inclui a invasão de tecidos adjacentes, o intravasamento e transporte no sistema circulatório e o extravasamento e crescimento em um órgão secundário (MEHLEN *et al.*, 2006).

O intravasamento e transporte pelo sistema circulatório pode acontecer através dos próprios vasos oriundos da angiogênese tumoral. Ao entrar na corrente sanguínea as células tumorais precisam sobreviver nesse ambiente considerado hostil para elas, uma vez que o organismo conta com um sistema de defesa contra células tumorais, protagonizados pelas células Natural Killers (NK). Essas células da imunidade inata possuem a capacidade de reconhecer células tumorais que não expressam o complexo de histocompatibilidade e de estimular a via extrínseca da apoptose através de seus receptores da família dos fatores de necrose tumorais (TNFs), dentre eles o Fas ligante, que leva à ativação de caspases e posterior apoptose da célula tumoral (LOOSE *et al.*, 2009). Apesar disso, as células tumorais possuem mecanismos para escapar da imunidade antitumoral. Dentre eles está a agregação de plaquetas nas células tumorais. Essa agregação plaquetária protege

as células tumorais, das células NK. Esta proteção consiste na formação de uma camada ao redor das células tumorais, impedindo o contato desta com as NK. Também, essa agregação constitui uma proteção contra forças mecânicas geradas pelo atrito com a parede dos vasos. E, uma vez que a estrutura formada é de grande diâmetro, ela contribui para a formação de êmbolos, o que favorece a metástase para órgãos que possuem vasos de pequenos diâmetros como, por exemplo, os pulmões (GUPTA *et al.*, 2004). Embora a formação de êmbolos contribua com a metástase, sabe-se que este processo ocorre em órgãos específicos, e não aleatoriamente.

Para extravasar da circulação sanguínea, a célula tumoral precisa reconhecer receptores específicos ligados ao endotélio vascular, aumentar a permeabilidade dos vasos, extravasar à partir destes e, finalmente, alcançar o tecido a ser colonizado. Então, ocorre proliferação celular e angiogênese tumoral (FIDLER, 2002).

Inicialmente, para o estabelecimento da célula tumoral nesse novo ambiente, ela precisa interagir com os seus componentes. Sabe-se que a ligação do receptor para o ácido hialurônico, o CD44, contribui com a invasão tecidual e estabelecimento das células metastáticas (MEHLEN *et al.*, 2006). A ligação do CD44 da célula tumoral com o ácido hialurônico da matriz extracelular do tecido desencadeia uma cascata de sinalização intracelular, que resulta na síntese de fatores de crescimento, como o Fribroblast Growth Factor - 2 (FGF-2) e Transforming Growth Factor β (TGF β), promovendo assim a proliferação celular. No caso do TGF β , promove também a imunossupressão e proteção contra apoptose. Também, essa ligação ocasiona a ativação do fator de transcrição NF κ -B, que ativa genes para a produção de metaloproteases (MMP-2, MMP-7 e MMP-9). Estas remodelam a matriz extracelular contribuindo com a invasão tecidual (SIRONEN *et al.*, 2011).

IV. Modelos Biológicos de Crescimento Tumoral e Metástase Experimental:

A biologia tumoral pode ser estudada através de modelos biológicos animais, chamados de modelos *in vivo*. Esses modelos animais provêm uma alternativa para caracterização e estudo de tratamentos para tumores malignos

(CHAPMAN *et al.*, 2011; PAWELETZ *et al.*, 2001). Dentre os modelos comumente utilizados na pesquisa encontram-se o de crescimento tumoral e o de metástase experimental. Estes modelos podem ser obtidos utilizando linhagem celular B16-F10 de melanoma murino, inoculada em camundongos da espécie *Mus musculus*, linhagem C57BL/6 (FIDLER, 1973).

O modelo de crescimento tumoral da B16-F10 é baseado na injeção subcutânea das células no flanco dorsal ou abdominal dos animais. Após aproximadamente 10 dias, é visível e palpável um tumor sólido subcutâneo (GIAVAZZI *et al.*, 2001). O tamanho e a massa desse tumor sólido, bem como o número de vasos intratumorais e áreas de morte celular, são parâmetros comumente utilizados para avaliar a possível eficácia de agentes terapêuticos contra o câncer (OTAKE *et al.*, 2009; YOSHIURA *et al.*, 2009) bem como estudar a biologia de tumores (IMAI *et al.*, 2007; EGAMI *et al.*, 2003).

O modelo de metástase experimental baseia-se na injeção de células tumorais B16-F10 direto na circulação sanguínea, para posterior invasão e colonização pulmonar (GIAVAZZI *et al.*, 2001). A via de entrada para a circulação é a veia caudal (FIDLER, 1973; WELCH, 1997). Após 15 dias da injeção, os pulmões dos animais inoculados ficam repletos de nódulos melanocíticos distribuídos de maneira homogênea em todo o pulmão (ELKIN *et al.*, 2001). Esses nódulos podem ser contados, e existe uma correlação entre o número de nódulos formados com a malignidade das linhagens de melanoma, quando diferentes linhagens são comparadas entre si (NAKAMURA *et al.*, 2002). Também, esse parâmetro é comumente utilizado para se avaliar a eficácia de agentes antineoplásicos em reduzir a colonização pulmonar (OTAKE *et al.*, 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2010; CONESA *et al.*, 2009).

B. Produtos Complexos Altamente-Diluídos:

Produtos Altamente-Diluídos são soluções manipuladas de acordo com a técnica homeopática padrão para diluição de Hahnemann (dH), onde cada dH corresponde a uma diluição de 10 vezes. Por exemplo: um medicamento homeopático "X" na diluição 10dH corresponde à solução inicial diluída por 10^{10} vezes. Para a manipulação de um medicamento homeopático, a partir de um extrato

etanólico de uma matriz específica, que pode ser um extrato de uma planta ou algum mineral em solução, são realizadas diversas diluições seriadas em água destilada seguidas de agitação vigorosa (chamada de succussão entre os homeopatas) até a fórmula final do medicamento. O medicamento pode ser simples, ou seja, a fórmula final contém apenas um extrato diluído, ou pode ser complexo, com mais de um extrato. Pelo fato da concentração final do composto ser extremamente diluída, os medicamentos homeopáticos são comumente chamados de Produtos Altamente-Diluídos (GROUPE INTERNATIONAL DE RECHERCHE SUR L'INFINITÉSIMAL - GIRI).

Uma vez que nos medicamentos homeopáticos não se pode identificar um princípio ativo, já que são altamente diluídos, a eficiência da homeopatia encontra-se constantemente em debate entre alguns grupos de pesquisadores (MISHRA *et al.*, 2011; BELLAVITE *et al.*, 2005; CHATFIELD 2011). Entretanto, muitos pacientes com câncer utilizam a prática homeopática para aumentar a resposta antitumoral, melhorar o seu bem-estar físico e emocional e também para aliviar as dores resultantes da doença e dos tratamentos convencionais (MILAZZO *et al.*, 2006).

No Brasil a homeopatia deixou de ser considerada como uma terapia alternativa quando foi reconhecida como especialidade médica pela portaria nº 1000 de 1980 pelo Conselho Federal de Medicina (NOGUEIRA *et al.*, 1986).

A homeopatia muitas vezes foi considerada como controversia pelo fato de que os medicamentos homeopáticos são extremamente diluídos, e, portanto, os resultados observados em estudos clínicos de pacientes seriam oriundos de efeitos placebos (CHATFIELD 2011). Entretanto, avaliações de medicamentos homeopáticos em modelos vegetais (BRIZZI *et al.*, 2011; BETTI *et al.*, 2003) e animais (GUIMARÃES *et al.*, 2010; BELLAVITE *et al.*, 2009) controlados com placebo vêm comprovando ao longo dos anos as suas atividades biológicas. Também, efeitos biológicos dos medicamentos homeopáticos foram relatados em modelos celulares *in vitro* (CESAR *et al.*, 2011; GUIMARÃES *et al.*, 2009; BURBANO *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Em estudos anteriores realizados no Laboratório de Pesquisa em Células Inflamatórias e Neoplásicas, da Universidade Federal do Paraná, foi relatado que um

medicamento homeopático complexo ativa o metabolismo de macrófagos de camundongos tanto em modelos *in vivo* quanto *in vitro*. Dentre esses estudos, destacam-se os seguintes achados: a) a produção do fator de necrose tumoral (TNF- α) por macrófagos *in vitro* foi significativamente diminuída (PIEMONTE *et al.*, 2002); b) a atividade enzimática da NADPH oxidase foi aumentada assim como a da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (OLIVEIRA *et al.*, 2006); c) a atividade do sistema 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 braziliensis*, controlando a progressão e disseminação da infecção (PEREIRA *et al.*, 2005; TAKAHACADS *et al.*, 2007). Além dessas propriedades, o medicamento testado não demonstrou toxicidade e nem efeitos mutagênicos (SELIGMANN *et al.*, 2003).

A análise da expressão gênica de macrófagos tratados demonstrou alterações na expressão de diversos genes relacionados à imunidade, dentre eles 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.

A resposta imunitária proveniente do tratamento também foi demonstrada em estudos com Sarcoma 180, que mostrou uma remissão tumoral total em 30% dos animais do grupo tratado. Nos animais em que as massas tumorais permaneceram, houve significativa redução do volume tumoral, assim como significativa 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 de células T auxiliares, 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; CESAR *et al.*, 2011). Recentes estudos realizados demonstraram efeitos anti-neoplásicos do medicamento altamente diluído em células de melanoma. Essas células foram reconhecidas por macrófagos, cultivados na presença de linfócitos, os quais foram pré-tratados com as soluções (GUIMARÃES *et al.*, 2009).

I. Complexo M1:

Atualmente, o Laboratório de Pesquisa em Células Inflamatórias e Neoplásicas da UFPR avalia a atividade biológica de novos complexos homeopáticos, entre eles o codificado de M1. A atividade antitumoral desse composto foi constatada contra o melanoma de camundongo (GUIMARÃES, 2009). Utilizando um modelo de invasão *in vitro*, observou-se que no tratamento com M1 houve redução da invasão das células de melanoma B16-F10. Também, ao se utilizar esse tratamento em camundongos, submetidos ao modelo de metástase experimental, e também o tratamento com outro complexo, chamado M8, verificou-se que eles reduziram a colonização pulmonar (FIGURA 3), uma vez que os pulmões dos animais tratados mostraram menor número de nódulos de melanoma, bem como com tamanhos reduzidos. Também, a expressão de uma molécula da matriz extracelular, o Perlecan, diretamente relacionada com a malignidade do melanoma, encontrou-se reduzida nos animais tratados (GUIMARÃES, 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Tais resultados sugerem que os Complexos Altamente Diluídos estudados podem ser promissores como tratamento contra o câncer. Baseado nessa possibilidade, o presente trabalho visou avaliar os efeitos do tratamento com M1 em dois modelos para o melanoma de camundongo: metástase experimental e crescimento tumoral.

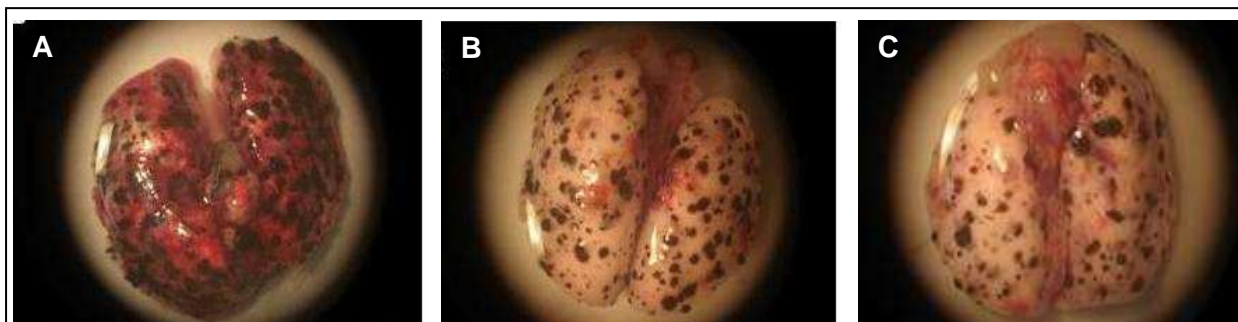


FIGURA 3 - Efeito do tratamento com os complexos altamente diluídos na formação de nódulos tumorais de colonização pulmonar

FONTE: GUIMARÃES, (2009)

(A) Grupo Controle (sem tratamento); **(B)** Tratado com M1; **(C)** Tratado com M8 ($p < 0.001$).

2. OBJETIVOS

A. Geral:

Avaliar o potencial antitumoral do medicamento M1 tanto no modelo de crescimento tumoral do melanoma murino, quanto no modelo de metástase experimental.

B. Específicos:

Para alcançar o objetivo geral, os animais inoculados com células tumorais na região subcutânea (modelo de crescimento do melanoma) foram estudados com os seguintes objetivos específicos:

- I. Avaliar macroscopicamente se houve diferença no desenvolvimento dos tumores subcutâneos; Comparar a quantidade de áreas de morte celular (necrose e apoptose) tumoral.
- II. Quantificar os novos vasos sanguíneos intratumorais (neoangiogênese).
- III. Detectar e quantificar a expressão de moléculas diretamente correlacionadas com a malignidade tumoral.
- IV. Detectar e quantificar células não neoplásicas presentes na periferia tumoral, que são importantes para o desenvolvimento tumoral.

Já para os animais inoculados com células tumorais na veia caudal (modelo de metástase experimental) tiveram os seguintes objetivos específicos:

- I. Quantificar os nódulos de melanoma na superfície pulmonar.
- II. Avaliar a quantidade de nódulos de melanoma periféricos e interiores nos cortes histológicos dos pulmões.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A. Medicamento Complexo Altamente –Diluído (M1):

As tinturas foram obtidas do Laboratório Schraibmann Ltda (Carapicuíba - Brazil), o qual é autorizado pelo Ministério da Saúde. Esta empresa certifica a alta qualidade e as condições da composição físico-química e “endotoxina-free” de seus produtos. Essas tinturas são manipuladas conforme farmacotécnica homeopática criada por Hahnemann, isto é, a partir de um extrato etanólico de cada matriz específica são realizadas diversas dinamizações/sucussões (diluições seriadas) em água destilada. A solução final é um líquido incolor e inodoro que contém menos de 0,01% de álcool. No presente estudo, utilizou-se uma formulação (QUADRO 1) a partir de *Chelidonium* e associações, codificada M1. Todos os frascos utilizados nesse estudo foram armazenados à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por até três meses após a data de fabricação. Eles também foram vigorosamente agitados por 30 vezes imediatamente antes do uso.

Chelidonium e associações – M1		
Componentes		Potencia
1	Aconitum napellus	dH20
2	Arsenicum album	dH18
3	Asa foetida	dH20
4	Calcarea carbonica	dH16
5	Chelidonium majus	dH20
6	Cinnamon	dH20
7	Conium maculatum	dH17
8	Echinacea purpurea	dH20
9	Gelsemium sempervirens	dH20
10	Ipecacuanha	dH13
11	Phosphorus	dH20
12	Rhus toxicodendron	dH17
13	Silicea	dH20
14	Sulphur	dH24
15	Thuja occidentalis	dH19

QUADRO 1 - Composição do M1

B. Cultivo Celular e Animais:

Células de melanoma murino B16-F10 (ATCC: CRL-6475) foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, e com 1 U/mL de penicilina, 1 µg/mL de estreptomicina, e 2,5 µg/mL de anfotericina. Camundongos C57BL/6, de 8-11 semanas de idade, foram obtidos do Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná. Foram cumpridos todas as exigências legal, em especial da Lei Federal Nº 6.638, de 5 de Novembro de 1979, a qual trata do manejo científico de animais. Também, todos os procedimentos com animais foram aprovados no Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR (CEEA-UFPR), através do certificado nº 492 (Anexo A).

C. Modelo de Crescimento Tumoral:

Culturas de B16-F10, com 70 - 80% de confluência foram desaderidas pela de incubação por 5 minutos com solução de tripsina / EDTA, e ressuspendidas em DMEM com 10% de Soro Fetal Bovino. Posteriormente, as células foram lavadas por 2 vezes com solução salina tamponada com fosfato, pH 7,4 (PBS). A viabilidade celular (> 90%) foi avaliada com azul de tripan 0,4% em um hemocitômetro, e as células foram ressuspendidas em uma concentração de 5×10^6 células por ml e mantidas no gelo. 50µl dessa solução foi injetada subcutaneamente no flanco dorsal de 10 camundongos. Este procedimento foi realizado antes de 45 minutos após as células terem sido desaderidas. O tratamento com M1 foi iniciado 24 horas após a injeção em 5 camundongos e em uma câmara de inalação adaptada para pequenos roedores, conforme descrito por GUIMARÃES *et al*, 2010 (FIGURA 4). Resumidamente, 24 horas após a injeção de células tumorais, os camundongos receberam, por inalação, 5ml de M1 por 10 minutos, a cada 12 horas, durante 14 dias. Como grupo controle utilizou-se camundongos que não receberam o tratamento. Após esse período, os camundongos de ambos os grupos, controle e tratados com M1, foram eutanasiados por deslocamento cervical e pesados em uma balança analítica. Os tumores subcutâneos foram cirurgicamente removidos, fotografados em estereomicroscópio e pesados em balança analítica.

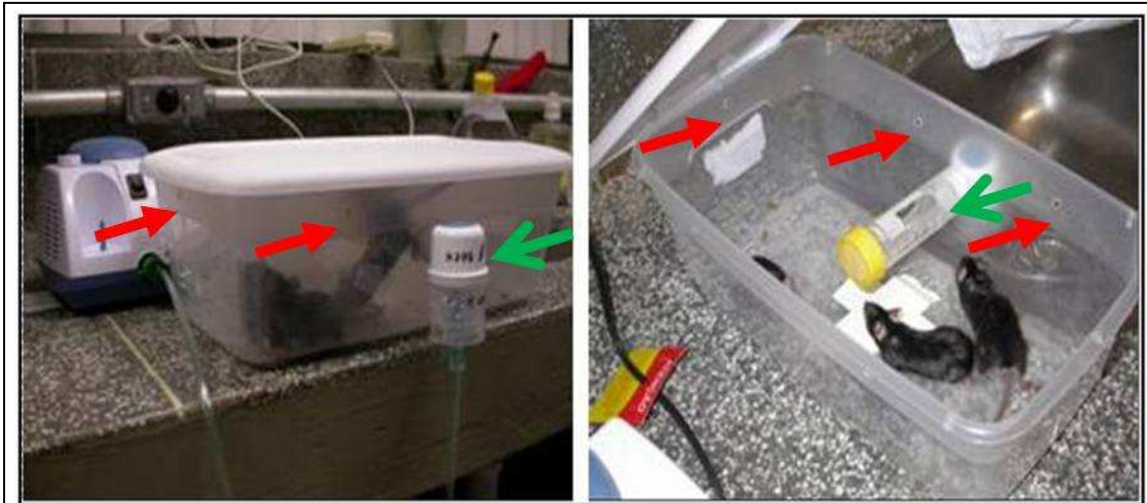


FIGURA 4 - Tratamento com M1 através de nebulização

Fonte: GUIMARÃES *et al.*, (2010)

A câmara de nebulização é um recipiente com suporte para a entrada do medicamento nebulizado (seta verde) e orifícios circulares para a saída do ar de dentro da câmara (seta vermelha). Dessa maneira, o interior da câmara fica com atmosfera saturada com o medicamento nebulizado.

D. Processamento Histológico:

Os tumores do modelo subcutâneo foram fixados com Paraformaldeído 4% em PBS por 2 horas. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, diafanizadas em Xilol e incluídas em parafina. Cortes de 3 μm dos tumores subcutâneos foram aderidos em lâminas pré-cobertas com poli-L-Lisina. Após a secagem das lâminas, os cortes foram desparafinizados em xilol, reidratados em concentrações decrescentes de etanol, e processados para Hematoxilina-Eosina (HE) ou para Fontana-Masson.

Para as reações de Imunohistoquímica, cortes reidratados foram incubados por 10 minutos com 3% H_2O_2 em PBS, para o bloqueio da peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi realizada em solução tampão de citrato de sódio 10mM, pH 6.0, à 100°C, por 20 minutos. Possíveis ligações não específicas e grupos aldeídicos livres foram bloqueados pela incubação de PBS contendo 1% de BSA e com PBS contendo 0,1M de Glicina, respectivamente. Posteriormente, os cortes foram incubados por 12 horas à 4°C com os seguintes anticorpos primários: IgG anti-PCNA, produzido em coelho (Santa Cruz BiotechnologyTM), IgG anti-CD44, produzido em rato (BD PharmingenTM), IgG anti-AT1R, produzido em cabra (Santa Cruz BiotechnologyTM), IgG anti-Condroitim Sulfato, produzido em rato (BD

Pharmingen™) e uma proteína biotilada de ligação ao ácido hialurônico (MARTINS *et al.*, 2003). Após o término do período de incubação, as lâminas foram incubadas com anticorpos secundários específicos para cada anticorpo primário utilizado, conjugados com biotina (anti-IgG de coelho, de camundongo, de rato e anti-IgG de cabra, todos produzidos em cavalo e da Vector™), por 1 hora. Posteriormente, os cortes foram incubados com estreptavidina conjugada com peroxidase (Horseradish peroxidase – HRP) por 30 minutos. As reações para o ácido hialurônico foram reveladas com *3,3'-diaminobenzidinetetrahydrochloride (DAB) substrate Kit* (BD Pharmigen), com posterior contra-coloração com o corante Giemsa. Já as reações para PCNA, CD44 e AT1R foram reveladas com *Vector™ VIP Substrate Kit for Peroxidase*, e com posterior contra-coloração de Fast Green. A seguir, os cortes foram desidratados em bateria crescente de etanol. Após incubação em xilol, as lâminas permanentes foram montadas com Permount™ (FisherChemicals).

E. Análises Histopatológicas dos Tumores Sólidos:

Lâminas histológicas proveniente de cada tumor sólido, submetidas às colorações de HE e Fontana - Masson, foram fotografadas em um scanner de lâminas MIRAX Scan (Carl Zeiss™) e em um microscópio Olympus™ BX61. As áreas de necrose e apoptose foram identificadas através de ambas as colorações. Nas micrografias da coloração de Fontana-Masson, a área tumoral e as áreas de morte celular foram mensuradas em escala de μm , utilizando o software Carl Zeiss AxioVision, e o percentual no corte total foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de morte celular} = \frac{\text{área de morte celular } (\mu\text{m}^2)}{\text{área do corte } (\mu\text{m}^2)} \times 100 \quad (1)$$

Também a quantidade de áreas de morte celular foi contada, e as médias relativas do tamanho das áreas em escala micrométrica foram calculadas utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{tamanho da área de morte celular} = \frac{\text{área de morte celular } (\mu\text{m}^2)}{\text{número de áreas}} \quad (2)$$

Para as análises de detecção histoquímica para o ácido hialurônico, com posterior contra-coloração de Giemsa, após a aquisição das imagens das lâminas

histológicas pelo scanner de lâminas, 15 regiões de cada corte foram aleatoriamente selecionadas. O número de vasos foi contado e seus respectivos diâmetros foram mensurados através do software ImageJ (NIH), após calibração da escala do software com a barra de aumento da micrografia. Vasos de 15 µm de diâmetro ou menos foram separados dos vasos com diâmetros maiores, com o propósito de diferenciar os capilares oriundos da neoangiogênese tumoral, de vasos possivelmente pré-existentes do tecido subcutâneo (OTAKE *et al.*, 2009). A marcação para o ácido hialurônico foi também quantificada através da coloração marrom do DAB, conforme descrito abaixo para o Vector[®] VIP. A marcação do ácido hialurônico por vaso sanguíneo foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\frac{\% \text{ área de marcação}}{\text{número de vasos totais}} \quad (3)$$

As análises das reações de imunohistoquímicas para, PCNA, CD44 e AT1R foram realizadas através do plugin Colour Deconvolution (FIGURA 5B e C) do software ImageJ (NIH), com posterior threshold (FIGURA 5D) para seleção das áreas marcadas e quantificação (FIGURA 5E), utilizando o seguinte MACRO para automatização das análises:

```
run("Colour Deconvolution", "vectors=[Feulgen Light Green]");
selectImage("1.1.tif-(Colour_1)");
// set threshold
setAutoThreshold();
getThreshold(min, max)
setThreshold(20, 150);
// measure area and area fraction and Integrated Density
run("Set Measurements...", "area area_fraction integrated
density limit display redirect=None decimal=3");
run("Measure");
selectImage("1.1.tif-(Colour_1)");
run("Close");
selectImage("1.1.tif-(Colour_2)");
run("Close");
selectImage("1.1.tif-(Colour_3)");
run("Close");
selectImage("Colour Deconvolution");
run("Close");
selectImage("1.1.tif");
run("Open Next");
```

Essa análise gera um dado numérico em pixels, transformado para porcentagem relativa da cor selecionada que corresponde à revelação da imunohistoquímica por VectorTM VIP Substrate Kit for Peroxidase no total da micrografia, que é 100% (= 320,436 pixels) (FIGURA 5D).

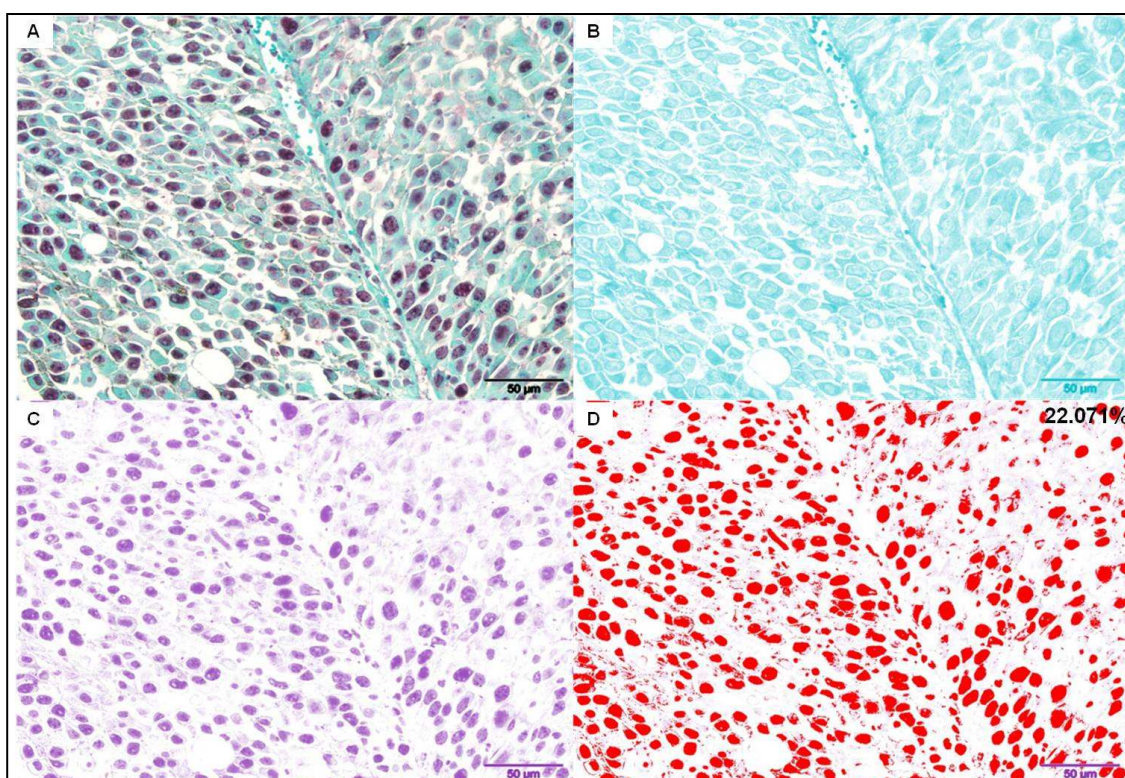


FIGURA 5 - Análise histológica com ImageJ (NIH)

Análise das micrografias de imunohistoquímicas, nesse caso para PCNA, revelada com Vector® VIP, gerando a coloração rosa nos núcleos celulares das células em divisão, e contra-coloração de Fast Green, que cora toda a célula em verde. **(A)** Micrografia da lâmina histológica. **(B - C)** Colour Deconvolution: **B** = verde (Fast Green); **C** = rosa (VIP). **(D)** Threshold de 'C', caracterizado pela cor vermelha, para seleção somente da cor rosa correspondente à reação de imunohistoquímica para PCNA. A quantificação da porcentagem da micrografia ocupada pela área selecionada, que corresponde à marcação para PCNA em 'A' é igual à 22,071%.

A marcação para o AT1R no tecido periférico tumoral foi analisada através do software ImageJ (NIH), como descrito acima, e também pela contagem das células positivamente marcadas para esse receptor celular.

F. Modelo de Metástase Experimental:

Células B16-F10 foram cultivadas como descrito acima. Culturas 70-80% confluentes foram desadheridas com tripsina e ressuspensas em meio de cultura com 10% de SFB. Posteriormente, a suspensão de células foi lavada por 3 vezes consecutivas com meio de cultura sem SFB, e ressuspensas para uma concentração de 5×10^6 células/ml. 100µl dessa solução foi injetada na veia caudal

de 17 camundongos C57BL/6, divididos em 9 para o grupo controle e 8 para o tratamento com M1. Após 24 horas da injeção, iniciou-se o tratamento com M1 via inalatória. Após 14 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados e os pulmões removidos. Posteriormente, os pulmões foram lavados com PBS e fotografados como descrito acima para os tumores subcutâneos. Após a fotografia, os pulmões foram fixados com paraformaldeído 2% por 3 horas e armazenados em etanol 70% até a contagem do número de nódulos em um microscópio estereoscópio. Após a contagem, os pulmões foram processados para histologia como descrito acima. A coloração de Fontana - Masson foi utilizada para identificar e quantificar os nódulos tumorais dos cortes histológicos de todos os lobos pulmonares. Todos os lobos foram contados, e o número de nódulos encontrado foi dividido pelo número de lobos de cada camundongo, para se obter a média da quantidade de nódulos por lobo.

G. Análises estatísticas:

Dados numéricos foram analisados estatisticamente por teste t não pareado, com significância estatística quando $p < 0,05$, utilizando o software GraphPad Prism 5. Gráficos foram construídos com a média \pm erro padrão de cada grupo.

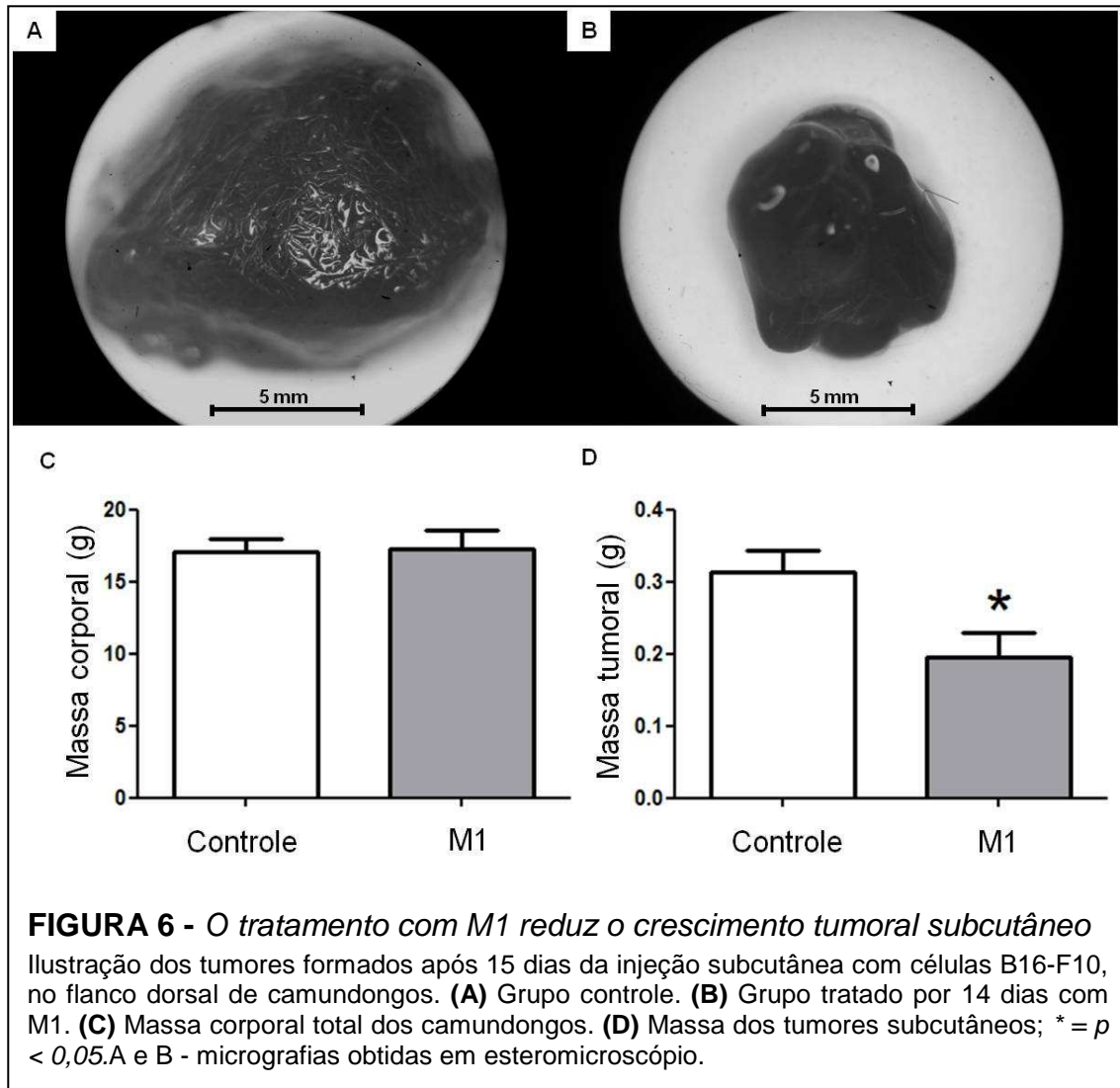
4. RESULTADOS

A. O tratamento com M1 reduziu o crescimento tumoral:

Após 24 horas da inoculação com as células tumorais, o tratamento com M1 teve início, e prosseguiu por mais 14 dias. Após o período de tratamento, os animais foram eutanasiados e os tumores subcutâneos foram removidos.

O primeiro passo foi avaliar a influência do tratamento com M1 sobre o crescimento tumoral. A micrografia obtida em microscópio estereoscópio mostra que os tumores dos animais tratados com o M1 eram evidentemente menores do que aqueles não tratados (Controle) (FIGURA 6A - B). Pelo fato dos tumores serem formados de células de melanoma, que é caracterizada pela produção de melanina, estes possuíam uma coloração preta, devido à alta densidade desse pigmento.

Posteriormente, as massas dos tumores foram quantificadas. observou-se que os tumores oriundos de animais tratados tiveram massas significativamente menores ($p < 0,05$), quando comparados com aqueles dos animais do grupo controle (FIGURA 6D). Não foram encontradas diferenças no peso corporal dos animais antes da retirada dos tumores (FIGURA 6C).



B. Aumento da porcentagem de áreas de morte celular nos tumores de animais tratados com M1:

Após a quantificação da massa tumoral, os tumores subcutâneos foram processados para histologia convencional. Cortes de 3 μ m foram obtidos para ter menor densidade do material, que é rico em melanina e, conseqüentemente, obter melhor resolução das estruturas celulares. A primeira análise envolveu a coloração dos cortes histológicos com a coloração panocítica de Hematoxilina-Eosina (HE). Essa coloração evidencia os núcleos celulares pela cor azul, enquanto que o citoplasma cora em rosa (FIGURA 7). Assim, foi possível diferenciar algumas

estruturas presentes nos cortes dos tumores. Os vasos sanguíneos foram identificados através da presença de células endoteliais vasculares, distribuídas de maneira organizada, formando o lúmen do vaso, geralmente preenchido com sangue. Ao redor dos vasos sanguíneos foram identificadas áreas de crescimento celular, com células aparentemente ativas metabolicamente, com núcleos evidentes. E mais afastados dos vasos sanguíneos haviam “fantasmas celulares”, que são apenas vestígios da presença de células, como resíduos de conteúdos citoplasmáticos. Estas últimas regiões foram caracterizadas como áreas de morte celular. Através da coloração com HE foi possível verificar que os tumores de animais que foram tratados com M1 tiveram áreas maiores de necrose e apoptose (FIGURA 7). Foi possível identificar essas regiões, pelo fato de que elas apresentavam áreas em que não se distingue o núcleo do citoplasma, ficando evidente somente restos celulares formados por conteúdos citoplasmáticos e nucleares (FIGURA 7). Entretanto, para confirmar que essas regiões são, de fato, áreas em que não se tem células vivas foi realizada imunomarcagem para PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), utilizando contracoloração com Fast Green (FIGURA 8). A PCNA é uma proteína nuclear que participa da replicação do DNA durante a fase S do ciclo celular, sendo, portanto, essencial para a progressão do ciclo celular (SHEN *et al.*, 2011). Uma vez que o tumor subcutâneo é constituído por células em constante atividade proliferativa, esse marcador foi utilizado para confirmar que as áreas de morte celular identificadas pela coloração com HE eram, de fato, formadas somente de resíduos celulares. Com a coloração de Fast Green isoladamente, na ausência de reação para imunohistoquímica, as células ficam totalmente coradas em verde, enquanto que com revelação da imunohistoquímica com Vector[®] VIP o citoplasma corado em verde ficou contrastado com a coloração rosa no núcleo, gerada pela reação com o substrato da peroxidase em células com atividade proliferativa. Como esperado, não houve positividade para a marcação da PCNA nos cortes histológicos dos animais tratados com M1, mas sim marcações evidentes em células tumorais ao redor de vasos sanguíneos (FIGURA 8).

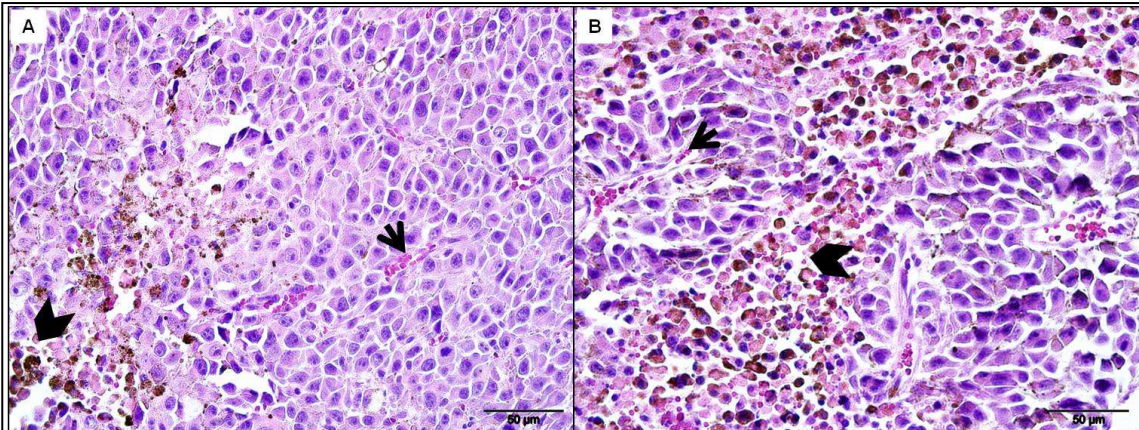


FIGURA 7 - O tratamento com M1 ocasiona maior área de morte celular nos tumores

A figura acima ilustra micrografias obtidas de cortes histológicos de tumores subcutâneos corados com HE. **(A)** Animais com 15 dias após inóculo das células tumorais. **(B)** Animais tratados por 14 dias com M1, tendo início após 24 horas da inoculação. Pôde-se verificar que os tumores dos animais tratados com M1 possuem maiores regiões de *morte celular*. Setas: vasos sanguíneos. Apontadores: regiões de morte celular

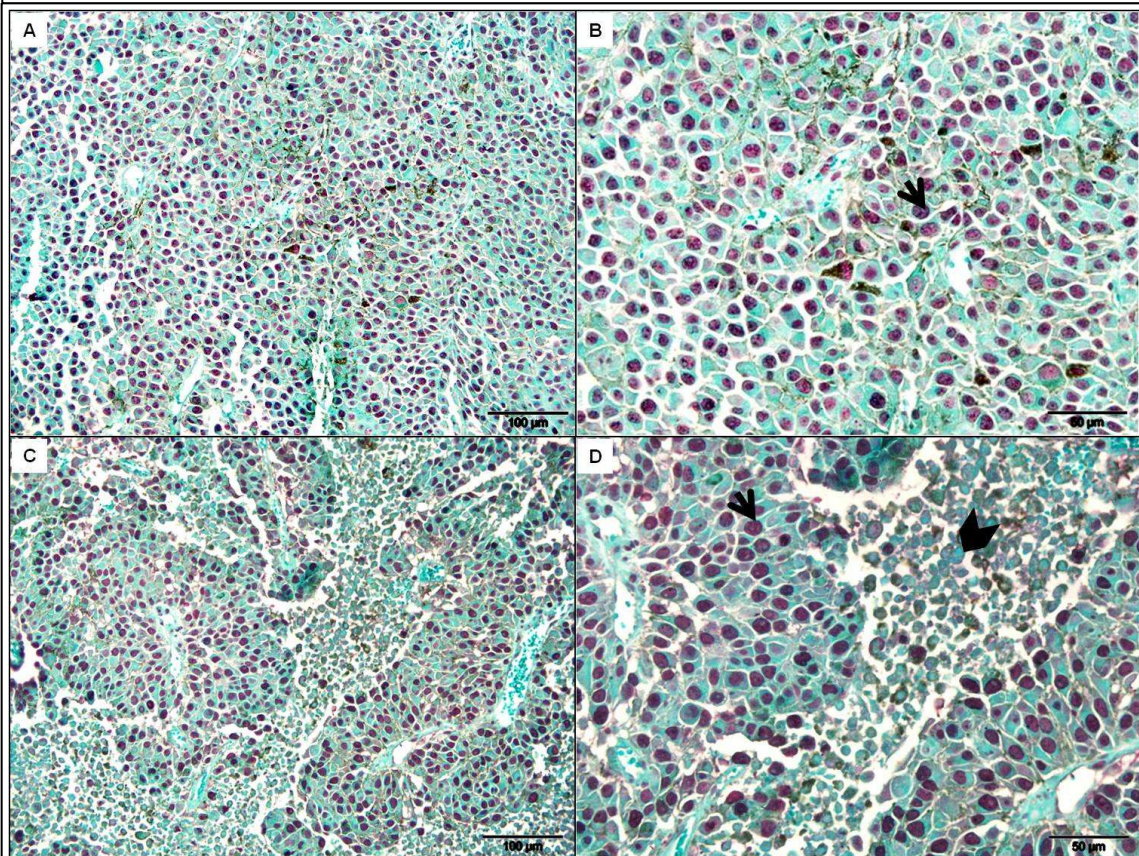
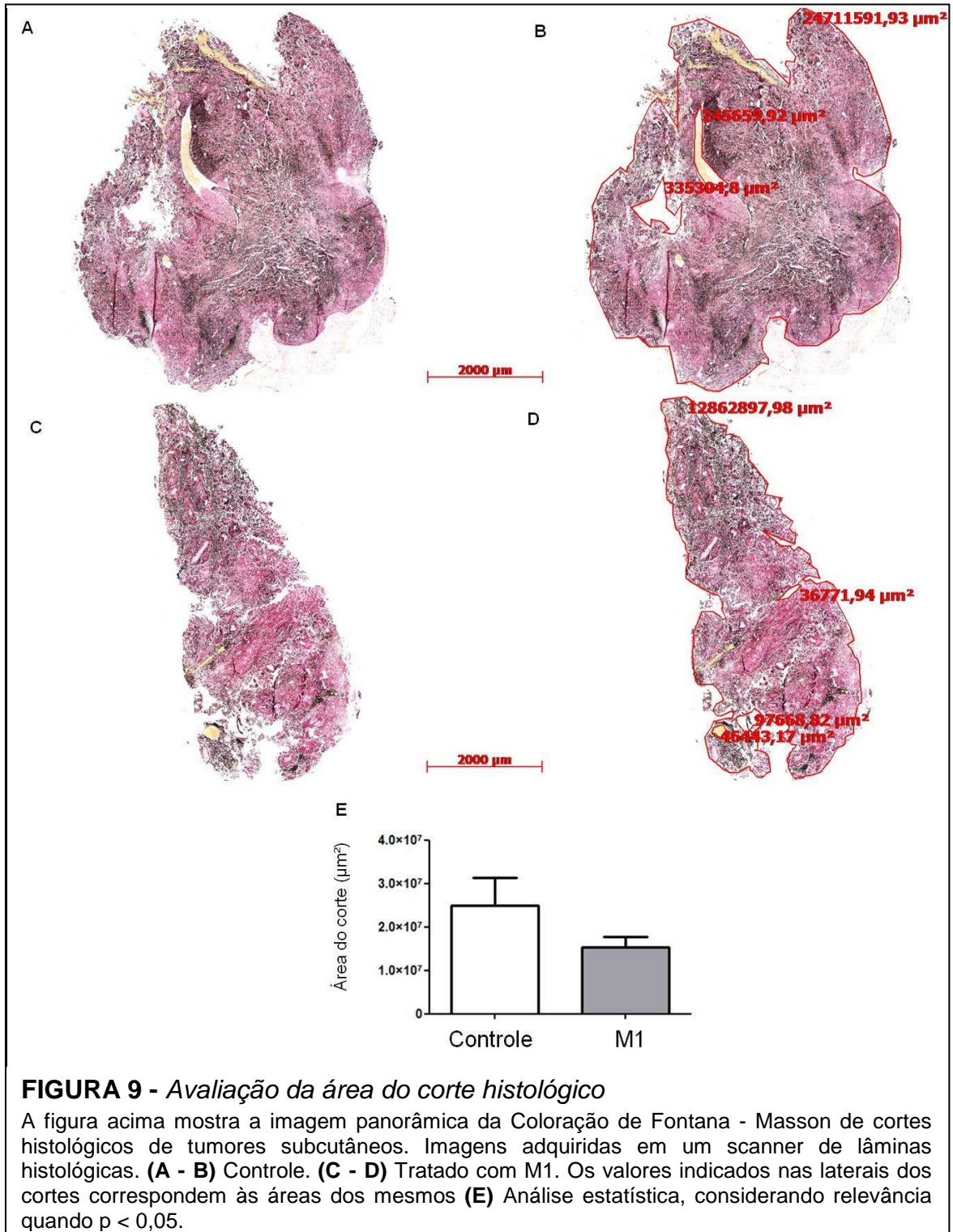
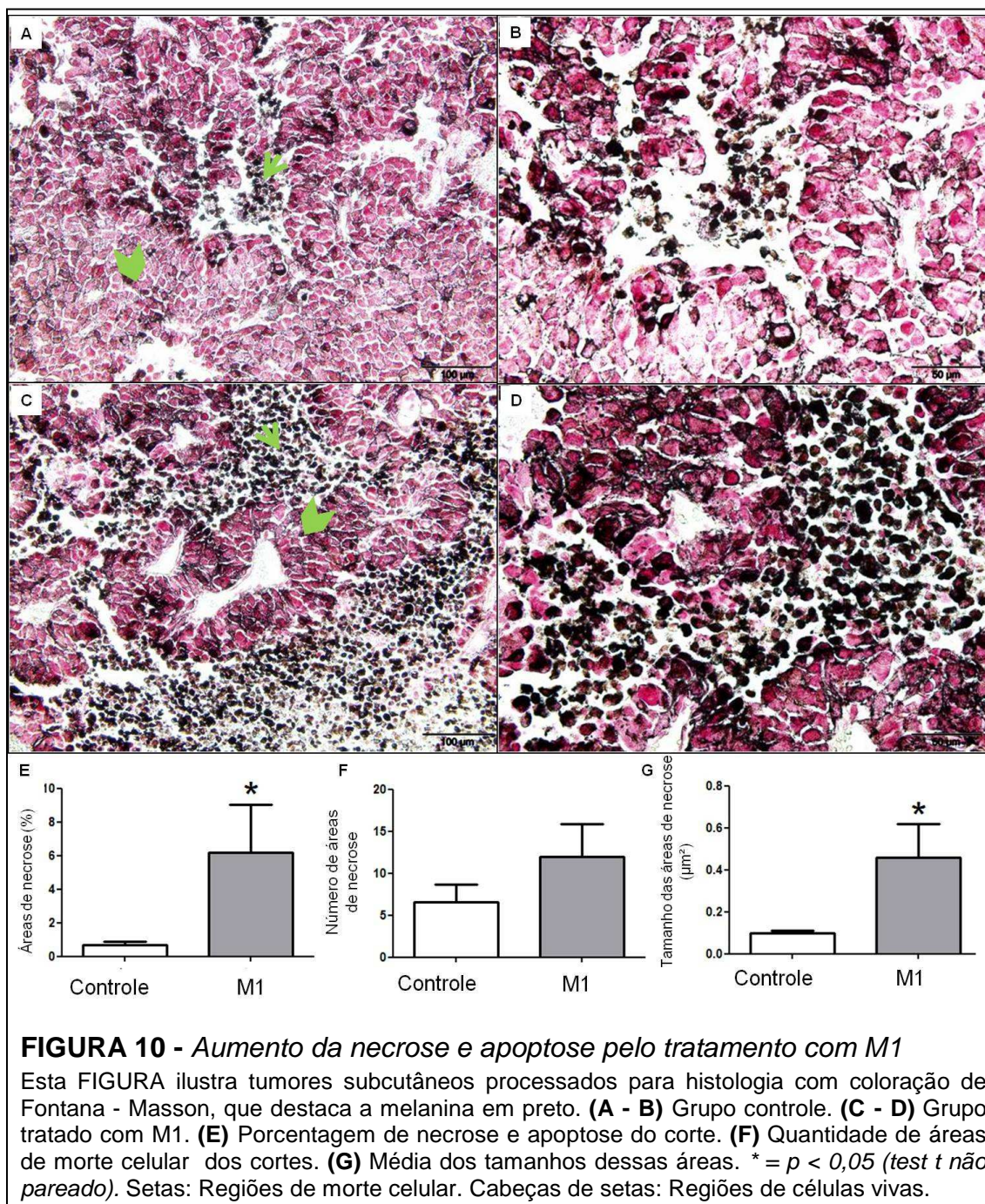


FIGURA 8 - Ausência de células em divisão nas áreas de necrose e apoptose

Esta FIGURA mostra imunohistoquímica para PCNA (rosa) com contra-coloração de Fast Green (verde) de cortes histológicos de tumores subcutâneos. Os núcleos celulares das células em divisão aparecem rosas, enquanto que em células em não divisão, ou mortas, não se evidencia a coloração. **(A - B)** não tratado. **(C - D)** tratado com M1. Setas: núcleos de células em divisão. Apontador: Célula que não está em divisão, na região de morte celular.

Para avaliar a quantidade de áreas de morte celular, foi realizada a coloração diferencial para melanina, denominada de Fontana - Masson. Essa coloração é baseada na atividade da melanina em reduzir o nitrato de prata para prata metálica, sendo esta então depositada nos locais de reação. Assim, a melanina fica evidenciada, corada em preto, e em contraste com o corante Vermelho Neutro, que cora o núcleo celular em vermelho. Como as áreas de necrose e apoptose possuem resíduos citoplasmáticos e nucleares, essas áreas foram facilmente distinguidas das demais, pela intensidade da cor preta (FIGURA 10). Para tanto, inicialmente, utilizando um Scanner automático de lâminas histológicas, foi mensurada a área total dos cortes histológicos (FIGURA 9). Houve uma tendência não significativa para a redução da área total dos cortes dos animais tratados com M1 (FIGURA 9E). Então, posteriormente, foi avaliada a porcentagem de áreas de necrose e apoptose, tendo em vista que são regiões de grande quantidade de marcação para melanina (FIGURA 10A - D). A soma de todas as áreas de áreas de necrose e apoptose para cada corte foram divididas pela área total do corte e multiplicada por 100. Após análise estatística com teste t não pareado foi possível constatar que os cortes de tumores de animais tratados com M1 possuíam maiores porcentagens de áreas de necrose e apoptose ($p < 0,05$), quando comparados com os de animais que não foram tratados (FIGURA 10E). Entretanto, a média da quantidade dessas áreas não foi maior nos animais tratados. Pela divisão das áreas de necrose e apoptose pelo número de áreas, tem-se a média do tamanho das áreas por corte (FIGURA 10F). Sendo assim, foi possível confirmar que as áreas de morte celular nos tumores dos animais tratados são maiores ($p < 0,05$), que as dos animais controle (FIGURA 10G).





C. O tratamento com M1 reduziu a quantidade de novos vasos:

Pela coloração com HE foi possível visualizar os vasos sanguíneos intratumorais (FIGURA 7). Para quantificar o número de vasos, e classificá-los em capilares ($\leq 15 \mu\text{m}$) ou vasos de diâmetro maior, foi utilizada a técnica de detecção histoquímica para o ácido hialurônico, glicosaminoglicano presente na lâmina basal do endotélio vascular (FIGURA 11C). A contracoloração foi realizada com Giemsa, pois esse corante diferencia as hemácias das demais células, corando-as em

vermelho, enquanto que as outras células são coradas em azul (FIGURA 11A). Além disto, esse corante possui a propriedade de corar a melanina (presente nas células de melanoma) em azul escuro / preto. Dessa maneira, é possível realizar uma marcação para alguma molécula de interesse, revelando a reação com “3,3'-diaminobenzidinetetrahydrochloride” (DAB) o qual possui a coloração marrom. Sem a utilização do corante Giemsa, a cor marrom do DAB não seria diferenciada da cor da melanina presente nas células de melanoma. Cabe destacar que a marcação para Condroitim Sulfato também poderia ter sido utilizada para o mesmo fim (FIGURA 11B), No entanto, somente a reação para detecção do ácido hialurônico foi utilizada.

Assim, utilizando a marcação para detecção de ácido hialurônico foi possível observar que os tumores dos animais tratados com M1 possuem menor quantidade de capilares ($p < 0,05$), quando comparados com o grupo controle (FIGURA 12). Já para os vasos com diâmetro maior (acima de $15 \mu\text{m}$) (FIGURA 12C). Já para os vasos com diâmetro maior (acima de $15 \mu\text{m}$) hialurônico foi possível observar que os tumores possuem menor quantidade de vasos com diâmetro maior (FIGURA 12C). Entretanto, este dado não foi confirmado ao analisar a quantidade de cor marrom através do software ImageJ (NIH) (FIGURA 12D). Ao se dividir o valor da quantificação da cor marrom, que corresponde á quantidade de ácido hialurônico na lâmina basal das células endoteliais vaculares, pela quantidade total de vasos, obteve-se a quantidade de marcação por vaso sanguíneo, o que está representado na FIGURA 12E. No entanto, nessa quantificação também não houve diferenças em o grupo controle e M1.

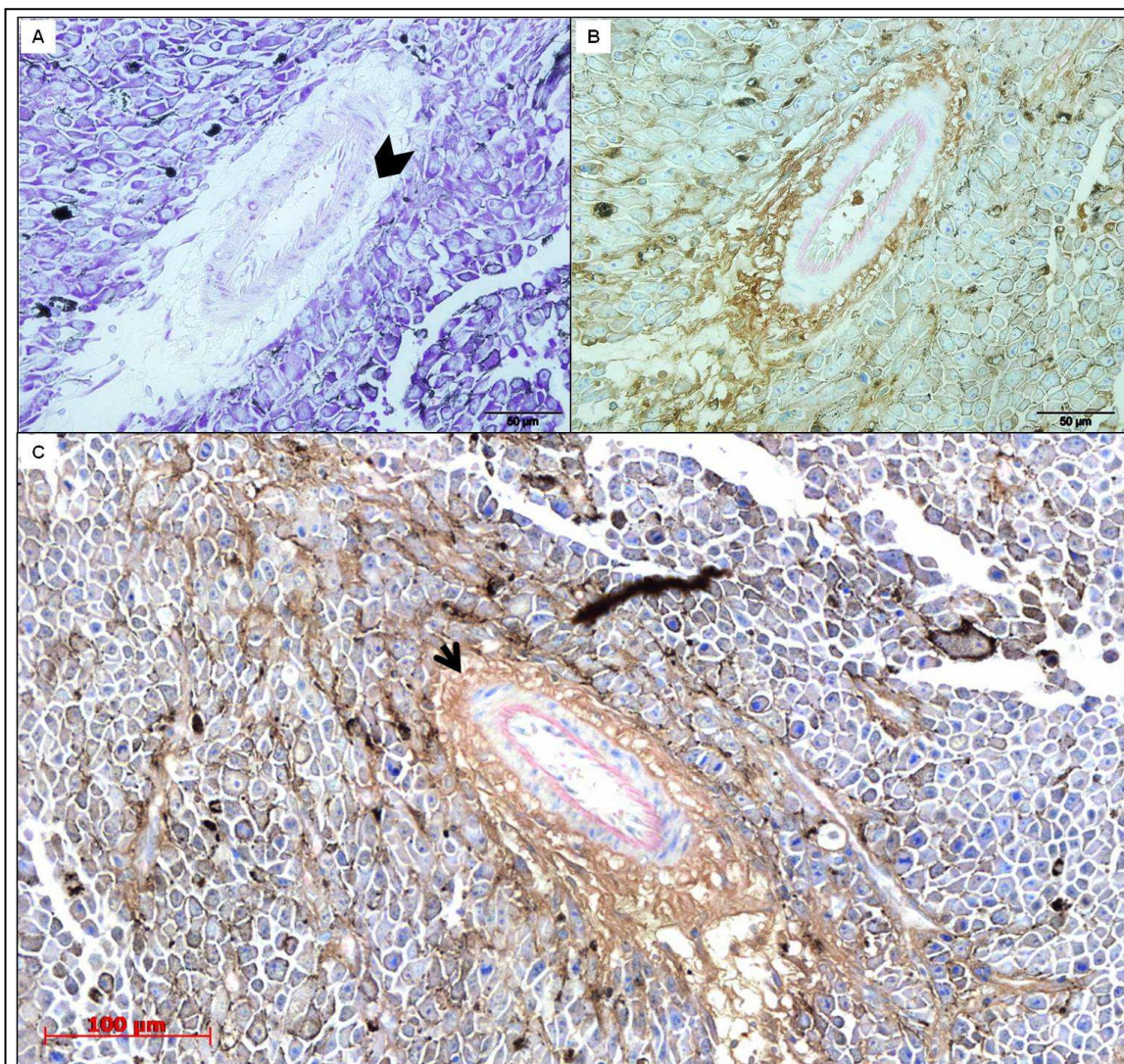
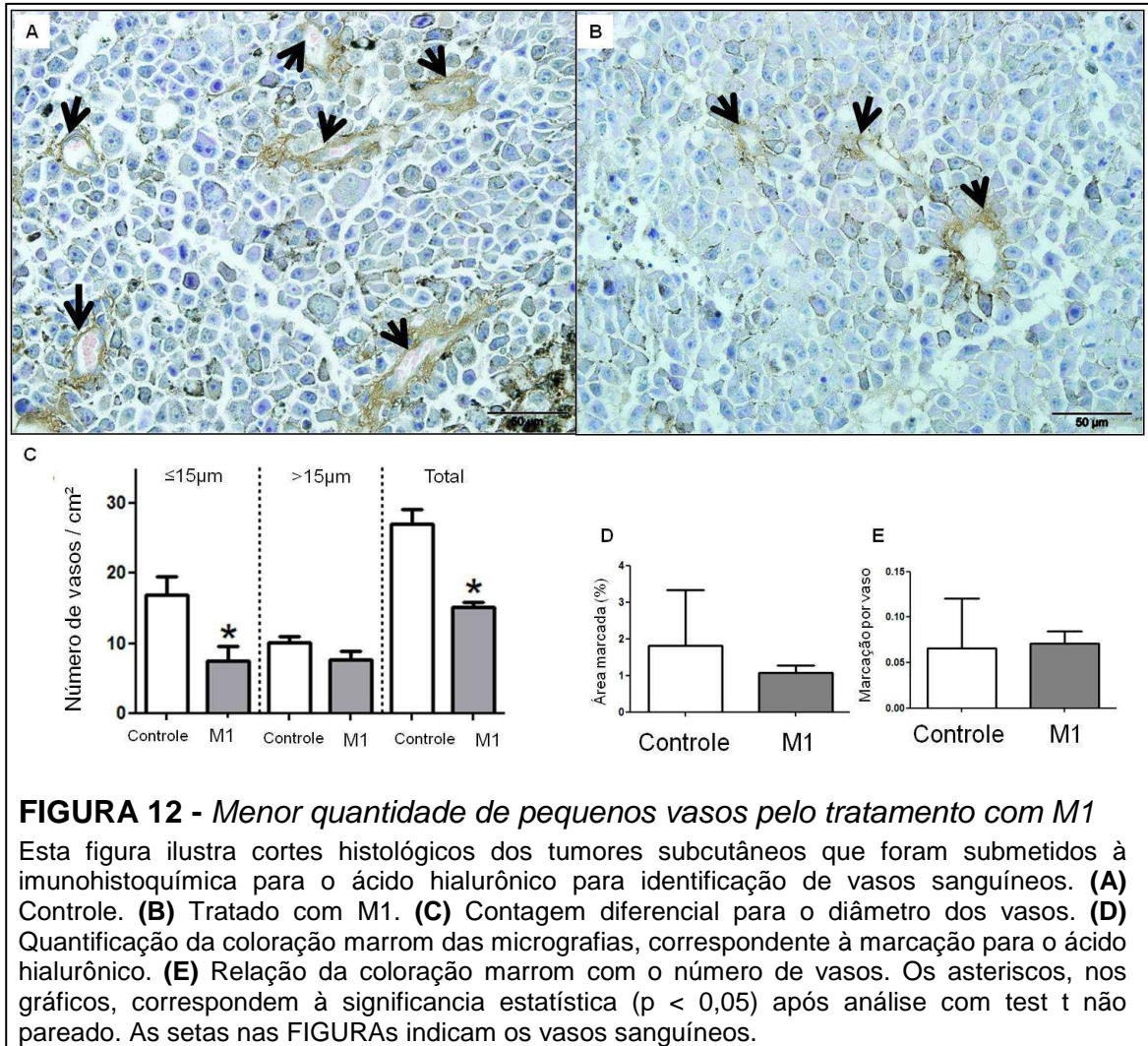


FIGURA 11 - Imunohistoquímica para identificação de vasos sanguíneos

Ilustração de imunohistoquímicas do grupo controle em um vaso sanguíneo contracoradas com Giemsa. **(A)** Coloração de Giemsa. **(B)** Imunohistoquímica para Condroitím Sulfato. **(C)** Imunohistoquímica para Ácido Hialurônico. Ambas as reações mostram evidente marcação (em marrom) na lâmina basal do endotélio vascular com distribuição também entre algumas células tumorais próximas ao vaso. Apontador: Lâmina basal sem marcação. Seta: Lâmina basal marcada para Ácido Hialurônico.



D. O tratamento com M1 não altera a expressão do Receptor para o Ácido Hialurônico (CD44):

O Receptor para o Ácido Hialurônico, chamado de CD44, é constitutivamente, mas não exclusivamente, expresso na membrana celular das células de melanoma B16-F10. Sua expressão é fortemente correlacionada com a malignidade das células tumorais (TOOLE, 2002). Após reação de imunohistoquímica utilizando anticorpo específico para CD44 e revelação com Vector[®] VIP, foi realizada uma contracoloração de Fast Green. Assim, foi possível visualizar e quantificar por ImageJ (NIH) a presença desse receptor celular. Para tanto, foram selecionadas somente regiões livres de áreas de necrose e apoptose para evitar distorção dos resultados pela ausência de células vivas expressando o CD44. Não houve diferenças na expressão desse receptor quando comparando os grupos sem tratamento e tratado com M1 (FIGURA 13A - C).

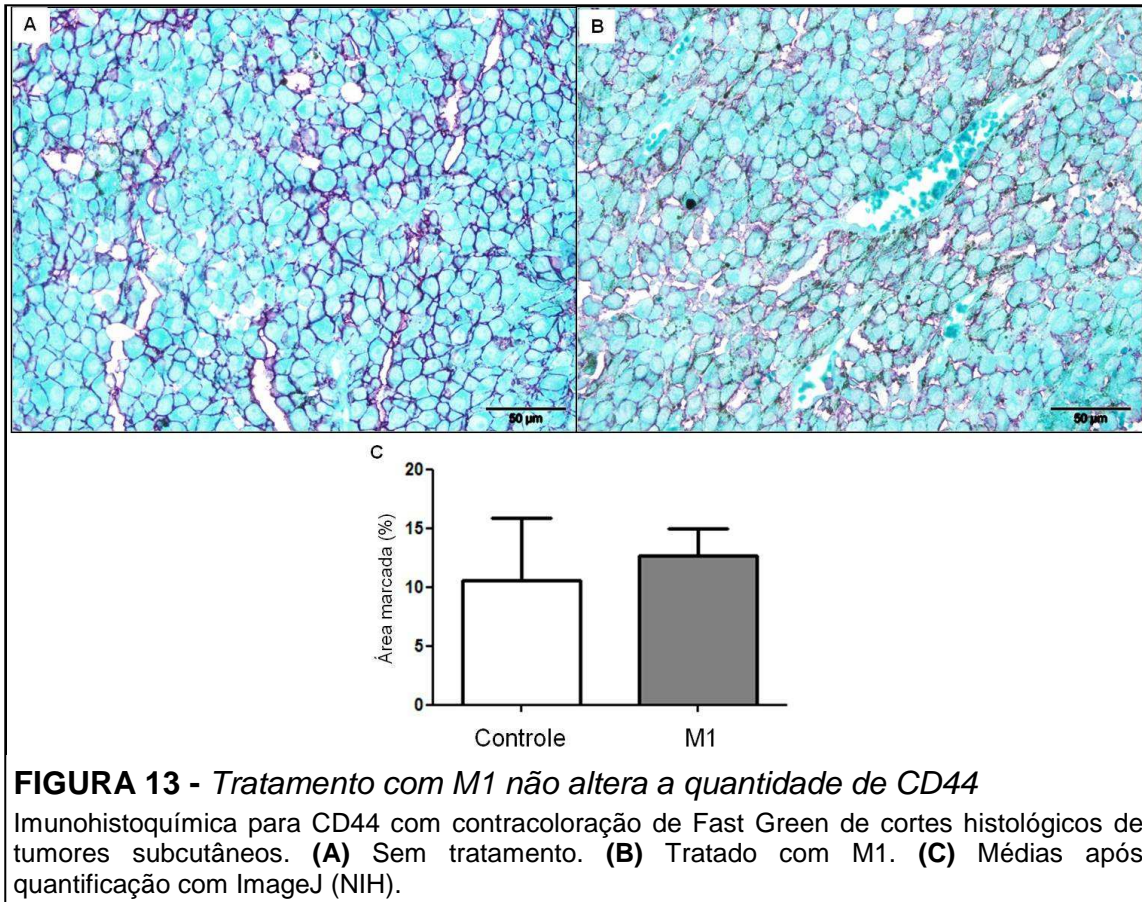


FIGURA 13 - Tratamento com M1 não altera a quantidade de CD44

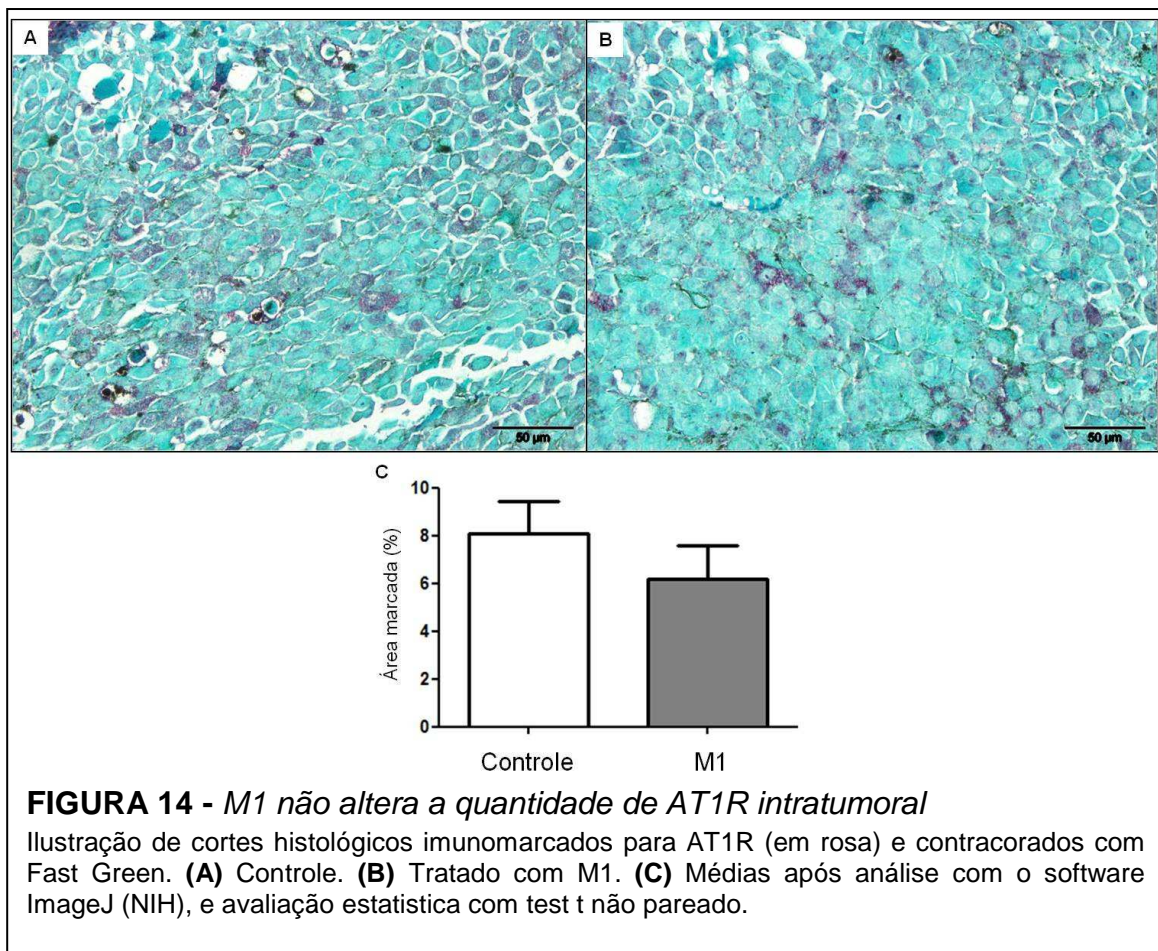
Imunohistoquímica para CD44 com contracoloração de Fast Green de cortes histológicos de tumores subcutâneos. **(A)** Sem tratamento. **(B)** Tratado com M1. **(C)** Médias após quantificação com ImageJ (NIH).

E. O tratamento com M1 não altera a expressão de AT1R intratumoral, mas reduz a presença de células AT1R+ na periferia do tumor:

Para avaliar se a menor quantidade de vasos de pequeno diâmetro está correlacionada com o sistema Renina - Angiotensina, que é importante para a angiogênese tumoral, foi utilizada a técnica de imunohistoquímica para o Receptor 1 da Angiotensina II (AT1R), utilizando como revelação a reação com Vector[®] VIP e contracoloração com Fast Green. Inicialmente, verificou-se a presença dessa prda ferramenta “plugin colour deconvolution” do software ImageJ (NIH) foi comparada a intensidade da marcação entre os grupos Controle e Tratado com M1, no entanto, não foram encontradas diferenças (FIGURA 14A - C).

Paralelamente, muitas células que compõem o tecido conjuntivo, localizado na periferia tumoral, apresentaram-se marcadas para esse receptor celular (FIGURA 15A - B). Sendo assim, em um primeiro momento, foi utilizada a quantificação com o software ImageJ (NIH) para comparar a quantidade de células marcadas. Para esse

tipo de análise não foram encontradas diferenças, muito embora a média nos cortes do grupo tratado com M1 seja menor do que a do controle (FIGURA 15C). Surpreendentemente, ao se contar as células positivamente marcadas na periferia tumoral (independente da intensidade de marcação), nos tecidos periféricos de tumores de animais tratados apresentaram menor número de células positivas ($p < 0,05$), quando comparados com os do grupo controle (FIGURA 15D). Uma vez que a própria célula de melanoma muitas vezes expressa esse receptor, para verificar se essas células da periferia não são células tumorais em um processo de invasão, e possível metástase, foi utilizada a coloração de Fontana - Masson, para verificar a positividade para melanina. Dessa maneira, embora seja possível encontrar algumas poucas células tumorais migrando pelo conjuntivo, constatou-se que majoritariamente essas células não são cancerosas, mas sim oriundas do próprio animal (FIGURA 15E - F).



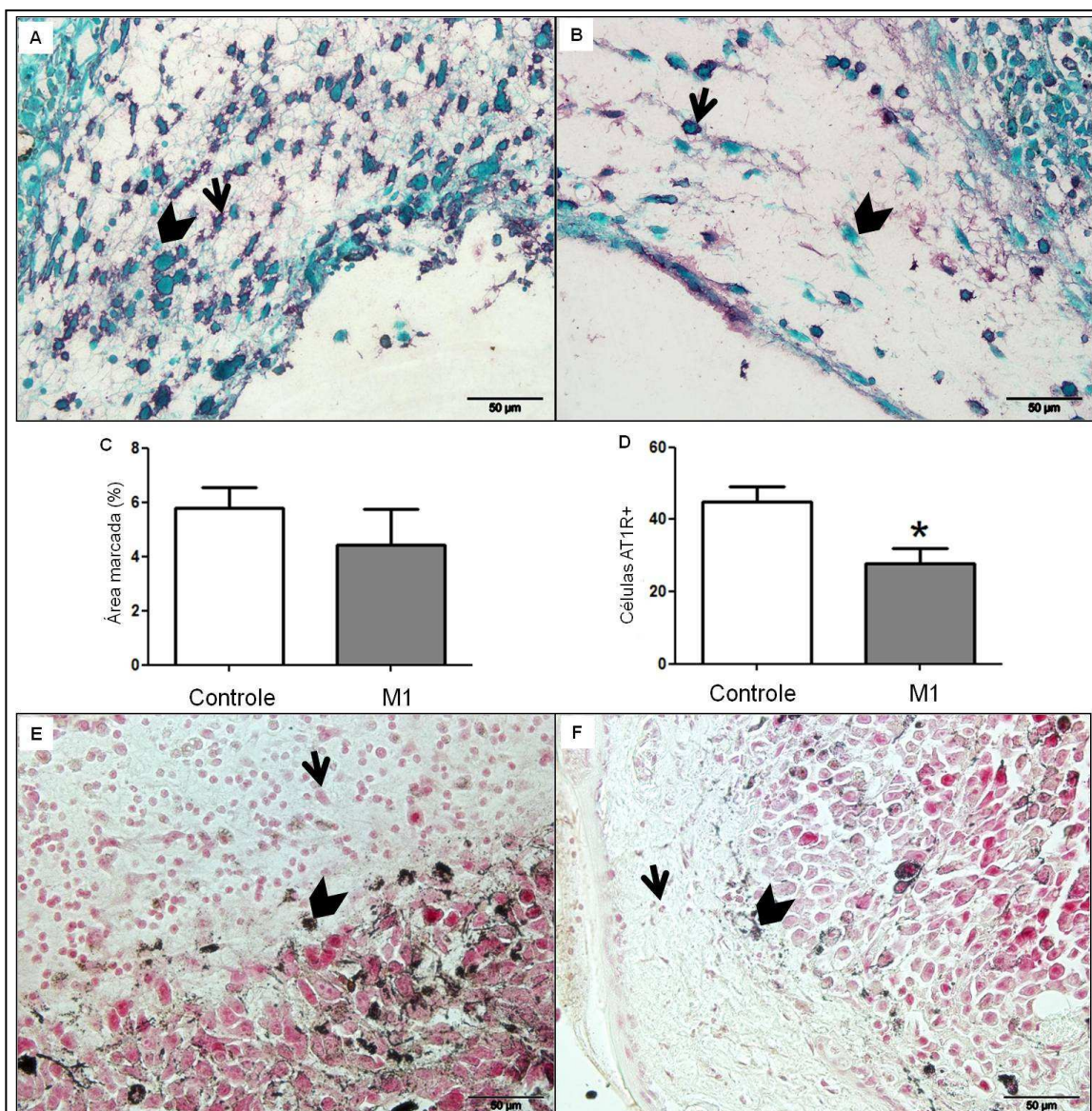


FIGURA 15 - Tratamento com M1 reduziu a quantidade de células AT1R+ na periferia tumoral

(A - B) Imunohistoquímicas para AT1R e contracoloração de Fast Green em cortes histológicos de tumores subcutâneos. (A) Periferia tumoral do grupo sem tratamento. (B) Periferia tumoral de grupo tratado com M1. (C) Análise com o software ImageJ (NIH) e posterior análise estatística ($p = 0,2050$). (D) Contagem das células AT1R+ na periferia tumoral. * = $p < 0,05$ (teste *t* não pareado). (E - F) Colorações de Fontana - Masson. (E) Sem tratamento. (F) Tratado com M1. Setas em A - B: Células AT1R positivas. Apontadores em A - B: Células não marcadas para AT1R. Setas em E - F: Células não tumorais. Apontadores em E - F: Células tumorais.

F. O tratamento com M1 reduz a colonização pulmonar pelo melanoma:

Foi relatado anteriormente que o complexo M1 atua na redução da invasibilidade do melanoma murino tanto em modelo *in vitro* quanto *in vivo* (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Considerando que utilizamos uma nova partida de B16F10, distante daquela utilizada anteriormente (GUIMARÃES *et al.*, 2010), agora proveniente do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), surgiu a necessidade de verificar se esta linhagem era também capaz de desenvolver metástases. Para tanto, utilizamos o mesmo modelo descrito anteriormente (injeção não veia caudal), com posterior tratamento (ou não – controle) à partir de 24 horas da inoculação, até o 15º dia. Como pode ser observado na FIGURA 16, as células possuem a capacidade de desenvolver nódulos pulmonares (FIGURA 16A e B), sendo que o tratamento com M1 manteve-se efetivo para minimizar a quantidade destes nódulos (FIGURA B e C).

Posteriormente, através da coloração de Fontana - Masson para histologia, o número de nódulos metastáticos nos cortes histológicos, tanto na periferia dos cortes, quanto no interior, foi avaliado. Foi possível verificar que essa análise confirma o resultado obtido com a contagem apenas da superfície pulmonar, onde constatou-se uma redução na quantidade de nódulos nos animais do grupo tratado com M1 ($p < 0,05$) (FIGURA 17A - C).

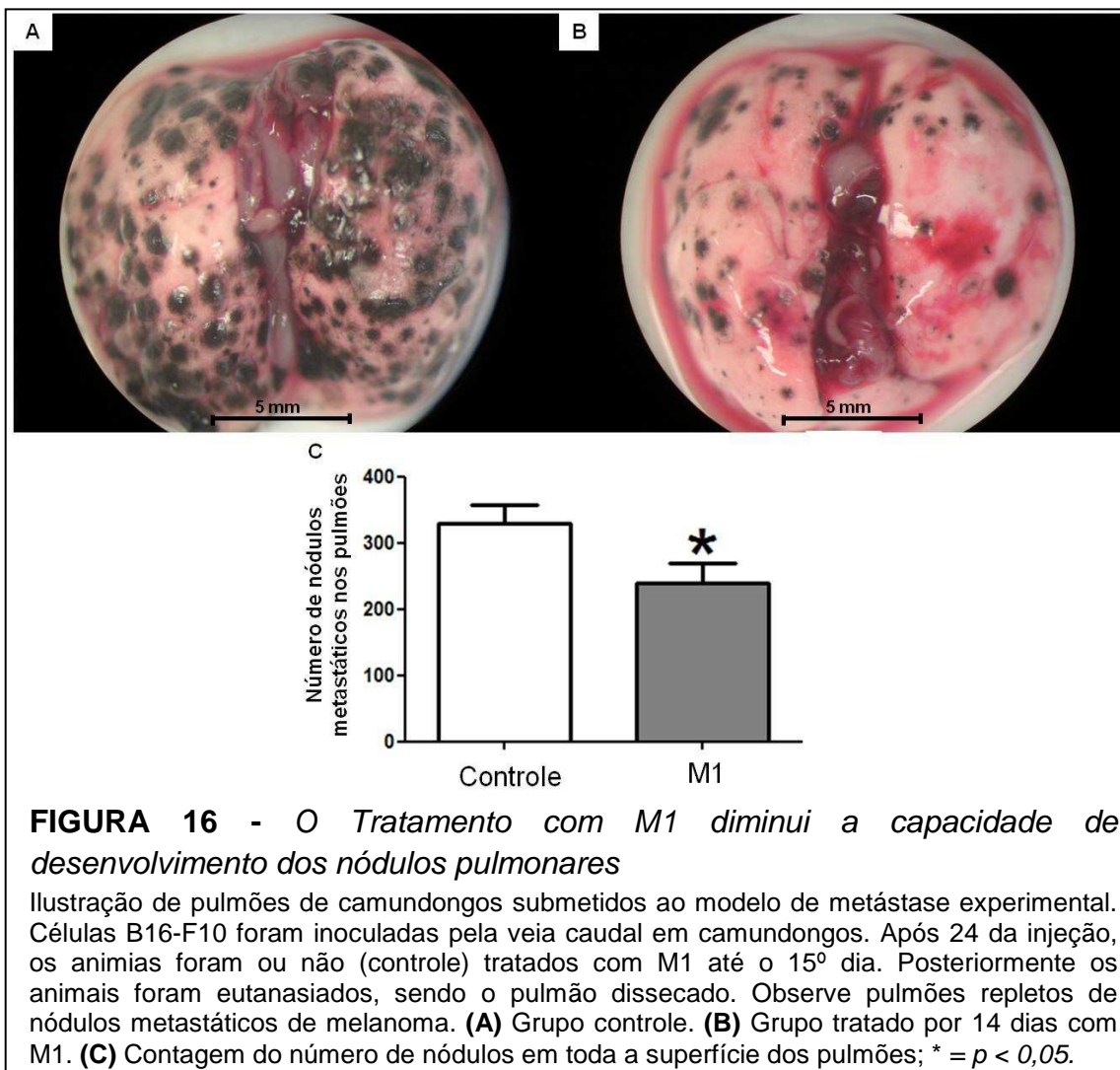
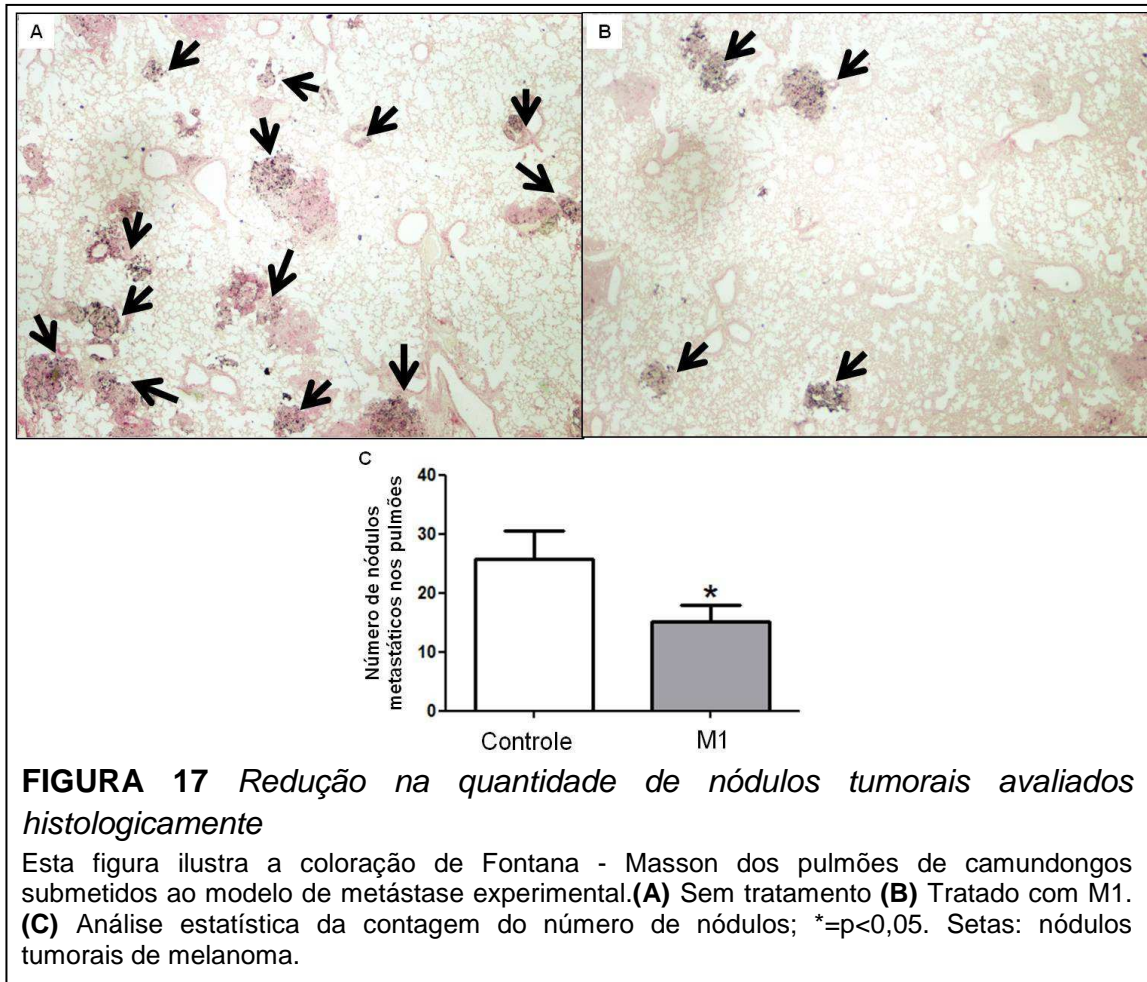


FIGURA 16 - O Tratamento com M1 diminui a capacidade de desenvolvimento dos nódulos pulmonares

Ilustração de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de metástase experimental. Células B16-F10 foram inoculadas pela veia caudal em camundongos. Após 24 da injeção, os animais foram ou não (controle) tratados com M1 até o 15^o dia. Posteriormente os animais foram eutanasiados, sendo o pulmão dissecado. Observe pulmões repletos de nódulos metastáticos de melanoma. **(A)** Grupo controle. **(B)** Grupo tratado por 14 dias com M1. **(C)** Contagem do número de nódulos em toda a superfície dos pulmões; * = $p < 0,05$.



5. DISCUSSÃO

Ao longo de cinco décadas, a incidência de melanoma nos países desenvolvidos tem aumentado em paralelo com a taxa de mortalidade, embora com proporções menores (HOUGHTON *et al.*, 2002). Apesar da remoção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia serem utilizadas para o tratamento da doença, essas práticas são dependentes do estágio do câncer, que deve ser diagnosticado na fase inicial. Entretanto, na ocorrência de metástase, o melanoma é quase sempre incurável. Neste caso, as estratégias de tratamento atuais têm por objetivo apenas aumentar a sobrevida e melhorar a qualidade de vida dos pacientes através da diminuição dos sintomas (INSTITUTO NACIONAL DO CANCER, 2011).

Muitos pacientes com câncer buscam terapias complementares para o tratamento da doença. Dentre elas, a homeopatia constitui a mais praticada em muitos países do continente europeu (MOLASSIOTI *et al.*, 2005). Apesar disso, a maioria dos relatos é baseada em pesquisas clínicas com pacientes com câncer, sem resultados preliminares utilizando modelos animais, o que impossibilita o controle do “efeito placebo”. Também, nesses estudos, não se visa identificar os mecanismos de ações dos medicamentos testados. O laboratório de Pesquisa em Células Inflamatórias e Neoplásicas da UFPR foi um dos pioneiros no Brasil na pesquisa básica com medicamentos homeopáticos. Em estudos anteriores utilizando um complexo homeopático brasileiro foi constatado a redução da massa tumoral do sarcoma 180 em camundongos (SATO *et al.*, 2005). Utilizando dois outros complexos homeopáticos, o M1 e o M8, foi relatado recentemente a atividade inibitória da invasão do melanoma metastático de camundongo, tanto em modelos *in vitro*, quanto *in vivo* (GUIMARÃES 2009). No presente trabalho, foi avaliada a atividade do complexo homeopático M1 em um modelo de crescimento tumoral subcutâneo, e também a atividade do complexo M8 na colonização pulmonar dos animais submetidos anteriormente ao modelo de metástase experimental (GUIMARÃES *et al.*, 2010), ambos após tratamento com o M1 por via inalatória (FIGURA 4).

No modelo de melanoma subcutâneo, os animais também receberam o tratamento por via inalatória após 24 horas da inoculação das células tumorais, durante 14 dias. No décimo quinto dia, os animais foram eutanasiados e os tumores removidos e pesados. Os tumores oriundos de animais tratados tiveram massas significativamente menores do que aqueles do grupo controle (FIGURA 6). Ao avaliar histologicamente áreas de necrose e apoptose, foi possível constatar também que os tumores do grupo M1 possuíam maiores áreas de morte celular (FIGURA 10). Também, quando avaliados pela microscopia estereoscópica, os tumores dos animais tratados foram menores, quando comparados com os desenvolvidos nos animais não tratados (FIGURA 6 e 10). Sendo assim, pode-se afirmar que o aumento das áreas de necrose e apoptose não é proveniente do crescimento tumoral, mas sim em decorrência da diminuição da angiogênese tumoral, ocasionada pelo tratamento, o que levou a redução do tamanho dos tumores tratados com M1.

Uma vez que o crescimento tumoral necessita dos nutrientes proveniente do suprimento sanguíneo (MARNEROS 2009), o próximo passo foi avaliar a angiogênese tumoral, utilizando um marcador da lâmina basal das células endoteliais vasculares intratumorais (FIGURA 12). Ao contar a quantidade de vasos totais, verificou-se que estavam em menores quantidades, nos tumores de animais tratados. Subsequentemente, foi adotado uma metodologia para distinguir vasos novos (angiogêneses) daqueles pré-existente, separando os vasos em dois grupos, menores de 15 micrômetros de diâmetro (novos vasos) e de iguais ou superiores a quinze micrômetros (vasos pré-existente). O dados mostraram que o tratamento com M1 reduziu a quantidade dos vasos de menor diâmetro (FIGURA 12). Essa separação dos vasos é importante porque a contagem dos vasos de maior diâmetro gera resultados distorcidos, pois ela sofre uma forte interferência de vasos pré-existentes antes da inoculação das células tumorais, ou seja, não provenientes da neoangiogênese tumoral (OTAKE *et al.*, 2009). Embora a angiogênese tumoral seja bastante significativa em termos de prolongamentos de vasos pré-existentes, ela não resulta em vasos de grande diâmetro, mas sim em pequenos diâmetros e capilares (MARNEROS 2009; FUKUMURA *et al.*, 2007). Dessa maneira, foi possível constatar que o tratamento com M1 prejudica o desenvolvimento dos tumores de melanoma no modelo subcutâneo, pela redução da densidade vascular. A

implicação deste fenômeno é o menor suprimento de nutrientes para o tumor, ocasionando estresse celular e aumento de áreas de morte celular (FIGURA 7). Isso prejudicou o crescimento tumoral, verificando-se que no final dos 15 dias os tumores dos animais tratados possuíam menores massas e tamanhos, quando comparados com o grupo controle (FIGURA 6).

Ao se comparar a quantidade de marcação do ácido hialurônico por vaso sanguíneo, e também a de seu receptor, conhecido como CD44, não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Dentre os fatores importantes para a angiogênese tumoral, a via da angiotensina II tem sido bastante estudada, especialmente a sinalização pelo receptor AT1R (EGAMI *et al.*, 2003; OTAKE *et al.*, 2009;). Há relatos na literatura que a inibição dessa via por uma droga antagonista prejudica o desenvolvimento de tumores subcutâneos de melanoma, através da inibição da angiogênese tumoral (OTAKE *et al.*, 2009). Outrossim, verificou-se que a periferia tumoral é rica em células positivas para a expressão de AT1R, e que essas células, identificadas como macrófagos, expressam VEGF, que é um dos principais fatores de crescimento para a angiogênese tumoral. A quantidade dessas células AT1R+ na periferia correlaciona-se diretamente com a densidade vascular intratumoral, sendo que quanto menos presentes, menor densidade vascular e, conseqüente, menores massas tumorais (EGAMI *et al.*, 2003). Dada a importância da angiogênese tumoral mediada pela via da angiotensina II, no presente trabalho foi avaliada a expressão do receptor para essa molécula, chamado de AT1R. Verificou-se que os seus níveis intratumorais não são alterados pelo tratamento com M1 (FIGURA 14). Entretanto, ao se avaliar a quantidade de células AT1R positivas na periferia tumoral, verificou-se que elas estavam em menores quantidades nos animais tratados com M1 (FIGURA 17). Uma vez que as células tumorais B16-F10 podem estar expressando o AT1R, através da análise pela coloração diferencial de Fontana - Masson, constatou-se que essas células AT1R+ da periferia tumoral não são neoplásicas, mas sim provenientes do próprio camundongo (FIGURA 15). Entretanto, no presente trabalho, elas ainda não foram identificadas como macrófagos, como realizado por EGAMI *et al.*, no ano de 2003.

A metástase experimental, outro modelo que foi utilizado neste trabalho, é comumente utilizada para investigar o comportamento de células cancerígenas e os efeitos de drogas antineoplásicas (GUIMARÃES *et al.*, 2010; LENTINI *et al.*, 2010; OTAKE *et al.*, 2009). Uma vez na circulação sanguínea, o desenvolvimento das células de melanoma dentro dos pulmões depende inicialmente de sua capacidade de estabelecimento nesse novo ambiente. Após atravessarem o endotélio vascular completamente e se implantarem nos pulmões, as células se desenvolvem em nódulos tumorais, e após quinze dias, esses nódulos podem ser visualizados como estruturas circulares na superfície do pulmão. A quantidade desses nódulos pode ser contada, e existe uma correlação entre o número de nódulos com o grau de malignidade das células de melanoma (NAKAMURA *et al.*, 2002). Em estudos anteriores, foi constatado que o tratamento tanto com o M1 quanto com o M8 reduz o número de nódulos tumorais de melanoma na superfície dos pulmões de camundongos, no modelo de metástase experimental pulmonar. No presente trabalho, nós confirmamos a redução na quantidade de nódulos tumorais nos pulmões tratados com M1 (FIGURA 16). Posteriormente, foi contado o número de nódulos através da histopatologia, constatando-se que foi visivelmente menor nos animais tratados com M1 (FIGURA 17). A contagem dos nódulos através da histologia é uma análise nova para avaliação do M1, e também importante, pois leva em consideração não somente os nódulos da superfície pulmonar, mas também os presentes nos interiores dos pulmões, o que leva à um dado com maior confiabilidade. O estudo com o modelo de metástase experimental ainda está em uma fase inicial e será prosseguido com as amostras obtidas. Dentre as possíveis análises a serem feitas, destaca-se a quantificação de células AT1R+s, dada a relevância dessa análise no modelo subcutâneo (FIGURA 15).

Os resultados do presente trabalho mostram que o tratamento com M1 é eficaz no combate ao melanoma de camundongo. Uma vez que o M1 é um medicamento homeopático, e que a homeopatia está entre as terapias complementares mais escolhidas entre pacientes com cancer, o próximo passo será avaliar em modelos animais os efeitos do tratamento com M1 em conjunto com agentes anti-neoplásicos já empregados em pesquisas clínicas para o tratamento do melanoma. Dessa maneira, será possível verificar a eficiência do M1 como um tratamento complementar contra o cancer. Também, com o uso de células

fluorescentes e um sistema de imagem *in vivo* (MS FX PRO Carestream), será possível acompanhar o desenvolvimento tumoral no interior dos animais em tempo real, seja no modelo subcutâneo ou de injeção na veia caudal. Dessa maneira, metástases distantes dos nódulos primários serão detectados através da emissão de luz pelas células fluorescentes captada pelo equipamento da Carestream.

6. CONCLUSÕES

No presente estudo, utilizou-se o Complexo Ultra-Diluído M1, que leva a uma menor invasão e desenvolvimento do melanoma de camundongos, segundo estudos anteriores (GUIMARÃES 2010). Os resultados presentes utilizando o modelo de metástase experimental pulmonar confirmaram os anteriores. Adicionalmente, os resultados do M1 para o modelo subcutâneo constatam que esse medicamento é capaz, além de reduzir a invasão do melanoma nos pulmões (GUIMARÃES 2010), de também prejudicar o desenvolvimento do melanoma subcutâneo. Isso ocorre pela redução do número de células não-neoplásicas produtoras de fatores angiogênicos na periferia tumoral, com consequente diminuição da angiogênese tumoral, correlacionada com o aumento de necrose e de apoptose intratumoral e menor massa dos tumores. Demais estudos são necessários para compreender melhor os efeitos do tratamento com M1. Entretanto, esses resultados já comprovam a eficácia do produto contra o melanoma murino. Também, com demais estudos, o M1 pode se tornar um importante medicamento a ser utilizado em tratamentos homeopáticos complementares para o melanoma metastático.

REFERÊNCIAS

ABUD, A. P. R.; CESAR, B.; CAVAZZANI, L. F. M.; OLIVEIRA, C. C.; GABARDO, J.; BUCHI, D. F. Activation of bone marrow cells treated with Canova® in vitro. **Cell Biology International**, v. 20, p.1-9, 2006.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*. Editora ARTMED, 5. ed. 2008.

BELLAVITE, P.; PITARI, G.; ITALIANO, M. Homeopathy and placebo. **Homeopathy**, v. 95, p. 51-64, 2005.

BELLAVITE, P.; PAOLO MAGNANI, P.; MARZOTTO, M.; CONFORTI, A. Assays of homeopathic remedies in rodent behavioural and psychopathological models. **Homeopathy**, v. 98, p. 208-227, 2009.

BETTI, L.; LAZZARATO, L.; TREBBI, G.; BRIZZI, M.; CALZONI, G. L.; BORGHINI, F.; NANI, D. Effects of homeopathic arsenic on tobacco plant resistance to tobacco mosaic virus: Theoretical suggestions about system variability, based on a large experimental data set. **Homeopathy**, v. 92, p. 195-202, 2003.

BOON, T., PIERRE G. C.; EYNDE, B. J. V. D.; BRUGGEN, P. V. D. Human T Cell Responses Against Melanoma. **Annu. Rev. Immunol.** V. 24, p. 175-208, 2006.

BRIZZI, M.; ELIA, V.; TREBBI, G.; NANI, D.; PERUZZI, M.; BETTI, L. The Efficacy of Ultramolecular Aqueous Dilutions on a Wheat Germination Model as a Function of Heat and Aging-Time. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-11.

BURBANO, R. R.; LEAL, M. F.; COSTA, J. B.; BAHIA, M. O.; LIMA, P. D. L.; KHAYAT, A. S.; SELIGMAN, I. C.; ASSUMPÇÃO, P. P.; BUCHI, D. F.; SMITH, M. A. C. Lymphocyte proliferation stimulated by activated human macrophages treated with Canova. **Homeopathy**, v. 98, p. 45-48, 2009.

CÉBE-SUAREZ, S.; ZEHNDER-FJÄLLMAN, A.; BALLMER-HOFER, K. The role of VEGF receptors in angiogenesis: complex partnerships. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 63, p. 601-615, 2006.

CESAR, B.; ABUD, A. P. R.; OLIVEIRA, C. C.; CARDOSO, F.; GREMSKI, W.; GABARDO, J.; BUCHIS, D. F. Activation of mononuclear bone marrow cells treated in vitro with a complex homeopathic medication. **Micron**, v. 39, p. 461-470, 2008.

CESAR, B.; ABUD, A. P. R.; OLIVEIRA, C. C.; CARDOSO, F. C.; BERNARDI, R. P. D.; GUIMARÃES, F. S. F.; GABARDO, J.; BUCHI, D. F. Treatment with at Homeopathic Complex Medication Modulates Mononuclear Bone Marrow Cell Differentiation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p.1-10, 2011.

CHAPMAN, P. B.; HAUSCHILD, A.; ROBERT, C.; HAANEN, J. B.; ASCIERTO, P.; LARKIN, J.; DUMMER, R.; GARBE, C.; TESTORI, A.; MAIO, M.; HOGG, D.; LORIGAN, P.; LEBBE, C.; JOUARY, T.; SCHADENDORF, D.; RIBAS, A.; O'DAY, S. J.; SOSMAN, J. A.; KIRKWOOD, J. M.; EGGERMONT, A. M. M.; DRENO, B.; NOLOP, K.; LI, J.; NELSON, B.; HOU, J.; LEE, R. J.; FLAHERTY, K. T.; MCARTHUR, G. A. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. **The New England Journal of Medicine**, v. 2011, p.1-10, 2011.

CHATFIELD, K. Progress in the Placebo Debate for Homeopathy? **The Journal Of Alternative And Complementary Medicine**, v. 17, p. 663-664, 2011.

CLARK, W. H. JR; ELDER, D. E.; GUERRY, D; EPSTEIN, M. N.; GREENE, M. H.; VAN HORN, M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Hum. Pathol.** v. 12, p.1147-1165, 1984.

CONEJO-GARCIA, J. R.; BENENCIA, F.; COURREGES, M. C.; KANG, E.; MOHAMED-HADLEY, A.; BUCKANOVICH, R. J.; HOLTZ, D. O.; JENKINS, A.; NA, H.; ZHANG, L.; WAGNER, D. S.; KATSAROS, D.; CAROLL, R.; COUKOS, G. Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a β -defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A. **Nature Medicine**, v. 10, p. 950-958, 2004.

CONESA, C. M.; SÁNCHEZ, N. A.; ORTEGA, V. V.; REVERTE, J. G.; CARPE, F. P.; ARANDA, M. C. In vitro and in vivo effect of IFN α on B16F10 melanoma in two models: Subcutaneous (C57BL6J mice) and lung metastasis (Swiss mice). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 63, p. 305-312, 2009.

DESHAYES, F.; NAHMIAS, C. Angiotensin receptors: a new role in cancer? **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 16, p. 293-299, 2005.

EGAMI, K.; MUROHARA, T.; SHIMADA, T.; SASAKI, K.; SHINTANI, S.; SUGAYA, T.; ISHII, M.; AKAGI, T.; IKEDA, H.; MATSUIISHI, T.; IMAIZUMI, T. Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, p. 67-75, 2003.

ELKIN, M.; VLODAVSKY, I. Tail Vein Assay of Cancer Metastasis. **Current Protocols in Cell Biology**, v. 12, p. 1-7, 2001.

FIDLER, I.J. Selection of successive tumor lines for metastasis. **Nature New Biology**, v. 242, p. 148-149, 1973.

FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p.453-458, 2002.

FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Tumor microvasculature and microenvironment: Targets for antiangiogenesis and normalization. **Microvasc Res.**, v. 74, p. 72-84, 2007.

GARDLIK, R.; CELEC, P.; BERNADIC, M. Targeting Angiogenesis for Cancer (Gene) Therapy. **Bratisl Lek Listy**, v. 112, p. 428-434, 2011.

GARTEL, A. L. Is p21 an oncogene? **Mol. Cancer. Ther.**, v. 5, p.1385-1386, 2006.

GIAVAZZI, R.; GAROFALO, A. Syngeneic Murine Metastasis Models. **Methods in Molecular Medicine**, v. 58, p. 223-229, 2001.

GRUPE INTERNACIONAL DE RECHERCHE SUR L'INFINITÉSIMAL. Disponível em: <<http://v2.giriweb.com/>> Acesso em: 23/11/2011.

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

GUIMARÃES, F. S. F.; ABUD, A. P. R.; OLIVEIRA, S. M.; OLIVEIRA, C. C.; CESAR, B.; ANDRADE, L. F.; DONATTI, L.; GABARDO, J.; TRINDADE, E. S.; BUCHIS, D. F. Stimulation of lymphocyte anti-melanoma activity by co-cultured macrophages activated by complex homeopathic medication. **BMC Cancer**, v. 9, p. 1-12, 2009.

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

GUPTA, G. P.; MASSAGUÉ, J. Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, p. 1691-1693, 2004.

HIRATSUKA, S.; MARU, Y.; OKADA, A.; SEIKI, M.; NODA, T.; SHIBUYA, M. Involvement of Flt-1 Tyrosine Kinase (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1) in Pathological Angiogenesis. **Cancer Research**, v. 61, p. 1207-1213, 2001.

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

IMAI, N.; HASHIMOTO, T.; KIHARA, M.; YOSHIDA, S.; KAWANA, I.; YAZAWA, T.; KITAMURA, H.; UMEMURA, S. Roles for host and tumor angiotensin II type 1 receptor in tumor growth and tumor-associated angiogenesis. **Laboratory Investigation**, v. 87, p. 189-198, 2007.

INOUE, M.; OHNO, T.; OGIHARA, Y. Suppression of Macrophage Function by Substances with a Molecular Weight Lower than 3000 Da in B16 Melanoma-Conditioned Medium. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 25, p. 907-912, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. Disponível em:
<http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335> Acesso em: 23/11/2011.

KOCH, S.; TUGUES, S.; LI, X.; GUALANDI, L.; CLAEISSON-WELSH, L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. **Biochem. J.**, v. 437, p. 20-24, 2011.

KUANG, D. M.; WU, Y.; CHEN, N.; CHENG, J.; ZHUANG, S. M.; ZHENG, L. Tumor-derived hyaluronan induces formation of immunosuppressive macrophages through transient early activation of monocytes. **Blood**, v. 110, p.587-595, 2007.

LEE, H.; BAEK, S.; JOE, S. J.; PYO, S. N. Modulation of IFN-g production by TNF- α in macrophages from the tumor environment: Significance as an angiogenic switch. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 71-78, 2006.

LEITER, U.; MEIER, F.; SCHITTEK, B.; CLAUS, GARBE, C. The Natural Course of Cutaneous Melanoma. **Journal of Surgical Oncology**, v. 86, p. 172-178, 2004.

LENTINI, A.; TABOLACCI, C.; MATTIOLI, P.; PROVENZANO, B.; BENINATI, S. Antitumor Activity of Theophylline in Combination with Paclitaxel: A Preclinical Study on Melanoma Experimental Lung Metastasis. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 25(4), p. 497-503, 2010.

LEONARDI, E.; GIRLANDO, S.; SERIO, G.; MAURI, F. A.; PERRONE, G.; SCAMPINI, S.; PALMA, P. D.; BARBARESCHI, M. PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: Correlations with clinical and biological variables. **J Clin Pathol**, v. 45, p. 416-419, 1992.

LOOSE, D.; VAN DE WIELE, C. The Immune System and Cancer. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceutical**, v. 24, p. 369-373, 2009.

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

MARNEROS, A. G. Tumor Angiogenesis in Melanoma. **Hematol Oncol Clin N Am**, v. 23, p. 431-446, 2009.

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

MEHLEN, P.; PUISIEUX, A. Metastasis: a question of life or death. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 449-58, 2006.

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

MISHRA, N.; MURALEEDHARAN, C.; PARANJPE, A. S.; MUNTA, D. K.; SINGH, H.; NAYAK, C. An Exploratory Study on Scientific Investigations in Homeopathy Using Medical Analyzer. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 17, p. 705-710, 2011.

MOLASSIOTIS, A.; FERNADEZ-ORTEGA, P.; PUD, D.; OZDEN, G.; SCOTT, J. A.; PANTELI, V.; MARGULIES, A.; BROWALL, M.; MAGRI, M.; SELVEKEROVA, S.; MADSEN, E.; MILOVICS, L.; BRUYNS, I.; GUDMUNDSOTTIR, G.; HUMMERSTON, S.; AHMAD, A. M. A.; PLATIN, N.; KEARNEY, N.; PATIRAKI, E. Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey. **Annals of Oncology**, v. 16, p. 655-663, 2005.

MOLDOVAN, G. L.; PFANDER, B.; JENTSCH, S. PCNA, the Maestro of the Replication Fork. **Cell**, v. 129, p. 665-79, 2007.

NAKAMURA, K.; YOSHIKAWA, N.; YAMAGUCHIS, Y.; KAGOTA, S.; SHINOZUKA, K.; KUNITOMO, M. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. **Life Sciences**, v. 70, p. 791-798, 2002.

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.

NOZAWA, H.; CHIU, C.; HANAHAN, D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. **PNAS**, v. 103, p. 12493-12498, 2006.

OBA-SHINJO, S. M.; CORREAY, M.; RICCAY, T. I.; MOLOGNONIY, F.; PINHAL, M. A.; NEVES, I. A.; MARIE, S. K.; SAMPAIOZ, L. O.; NADER, H. B.; CHAMMAS, R.; JASIULIONIS, M. G. Melanocyte Transformation Associated with Substrate Adhesion Impediment. **Neoplasia**, v. 8, p. 231-241, 2006.

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

OLIVEIRA, C. C.; OLIVEIRA, S. M.; GOES, V. M.; PROBST, C. M.; KRIEGER, M. A.; BUCHIS, D. F. Gene Expression Profiling of Macrophages Following Mice Treatment with an Immunomodulator Medication. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 104, p. 1364-1377, 2008.

OTAKE, A. H.; MATTAR, A. L.; FREITAS, H. C.; MACHADO, C. M. L.; NONOGAKI, S.; FUJIHARA, C. K.; ZATZ, R.; CHAMMAS, R. Inhibition of Angiotensin II Receptor 1 Limits Tumor-Associated Angiogenesis And Attenuates Growth Of Murine Melanoma. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 66, p. 79-87, 2009.

PAWELETZ, C. P.; CHARBONEAU, L.; LIOTTA, L. A. Overview of Metastasis Assays. **Current Protocols in Cell Biology**, v. 12, p. 1-9, 2001.

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, p. 157-164, 2005.

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

POLSKY, D.; BASTIAN, B. C.; HAZAN, C.; MELZER, K.; PACK, J.; HOUGHTON, A.; BUSAM, K.; CORDON-CARDO, C.; OSMAN, I. HDM2 Protein Overexpression, but not Gene Amplification, is Related to Tumorigenesis of Cutaneous Melanoma. **Cancer Research**, v. 61, p. 7642-7646, 2001.

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

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*. **Genet Mol Res**, v. 2, p. 223 - 228, 2003.

SHEN, F.; KIRMANI, K. Z.; XIAO, Z.; THIRLBY B. H.; HICKEY, R. J.; MALKAS, L. H. Nuclear Protein Isoforms: Implications for Cancer Diagnosis and Therapy. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, p. 756-760, 2011.

SIRONEN, R. K.; TAMMIB, M.; TAMMIB, R.; AUVINENC, P. K.; ANTTILA, M.; KOSMA, V. M. Hyaluronan in human malignancies. **Experimental Cell Research**, v. 317, p. 383-391, 2011.

SOENGAS, M. S.; CAPODIECI, P.; POLSKY, D.; MORA, J.; ESTELLER, M.; OPITZ-ARAYA, X.; MCCOMBIE, R.; HERMAN, J. G.; GERALD, W. L.; LAZEBNIK, Y. A.; CORDÓN-CARDÓ, C.; LOWE, S. W. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. **Nature**, v. 409, p. 207-211, 2001.

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

TOOLE, B. P. Hyaluronan promotes the malignant phenotype. **Glycobiology**, v. 12, p. 37-42, 2002.

YOSHIURA, K.; NISHISHITA, T.; NAKAOKA, T.; YAMASHITA, N.; YAMASHITA, N. Inhibition of B16 melanoma growth and metastasis in C57BL mice by vaccination with a syngeneic endothelial cell line. **BMC Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 28, p. 1-6, 2009.

WELCH, D. T. Technical considerations for studying cancer metastasis *in vivo*. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 15, p. 272-306, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>> Acesso em:
23/11/2011.

ANEXO

Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal:

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



Nº 492

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 regiment, 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)".

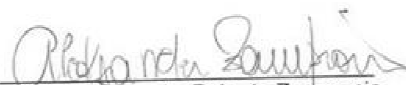
PROCESSO: 23075.042116/2010-28

APROVADO: 09/11/2010 – R.O. 10/2010

TÍTULO: Avaliação das atividades de invasão e colonização pulmonar de melanoma murino após tratamento com CHIs

AUTORES: Edvaldo da Silva Trindade, Dorly de Freitas Buchi, Lucas Ferrari de Andrade, Célia Regina Cavichiolo Franco, Carolina Camargo de Oliveira, Aline Raquell Leck

DEPARTAMENTO: Biologia Celular


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador do CEEA