

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCAS FERRARI DE ANDRADE

**PESQUISA DE TERAPIAS PARA O MELANOMA EM MODELOS DE
METÁSTASES PULMONARES EM CAMUNDONGOS**

CURITIBA

2014

LUCAS FERRARI DE ANDRADE

**PESQUISA DE TERAPIAS PARA O MELANOMA EM MODELOS DE
METÁSTASES PULMONARES EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo da Silva
Trindade

Co-orientadora: Profa. Dra. Dorly de
Freitas Buchi

CURITIBA

2014

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Andrade, Lucas Ferrari de

Pesquisa de terapias para o melanoma em modelos de metástases pulmonares em camundongos. / Lucas Ferrari de Andrade. – Curitiba, 2014.

95 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Edvaldo da Silva Trindade

Co-orientador: Dorly de Freitas Buchi

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

1. Melanoma 2. Metástase 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.) 616.99477

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 28 de Agosto de 2014, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (UFPR) defendeu sua Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular, intitulada: "Pesquisa de Terapias para o melanoma em modelos de Metástases Pulmonares em Camundongos", com a banca examinadora constituída pelos Profs: Drs. Carla Holandino Quaresma (UFRJ), Daniela Moraes Leme (USP), Marco Antonio Ferreira Randi (UFPR), Silvio Marques Zanata (UFPR), e Edvaldo da Silva Trindade (Orientador e presidente da banca examinadora da UFPR), e foi Aprovado.

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

Esta declaração tem validade de 60 (sessenta) dias.

Curitiba, 28 de Agosto de 2014



[Handwritten signature]
Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade

AGRADECIMENTOS

À Jesus Cristo e à Deus.

À família (Stephany, Raul, Vera, Odilon, Vinícius, Júlia, Manoela, Vinícius Júnior, Eliane, Kelly, Eduardo, Elvira e Wanderley).

Ao Laboratório de Pesquisa em Células Inflamatórias e Neoplásicas (Edvaldo, Dorly, Aline, Gustavo, Cleber, Carolina, Stelée, Célia).

Ao grupo “Immunology in Cancer and Infection” (Fernando, Mark, Ludovic, Shin Fong, Liam, Jing e Camille).

Ao grupo “Unité de Régulation Immunitaire et Vaccinologie” (Brian).

Ao Biotério Central, PUC-PR (Rafael e Cândido).

Ao grupo “Signal Transduction” (Murugan).

Ao grupo “Pathology & Immunology” (Marco).

Ao Departamento de Biologia Celular, UFPR (Marco, Silvio, “seu Nino” e Marlene).

Ao Biotério do Setor de Ciências Biológicas (Marcelo e Iselen).

Ao grupo “Farmacologia e Fisiologia da Pele” (Daniel.)

Aos patrocinadores (CAPES, CNPq, Fundação Araucária e NH&MRC).

Então desceu, e mergulhou no Jordão sete vezes,
conforme a palavra do homem de Deus: e a sua
carne tornou, como a carne dum menino, e ficou
purificado (II Reis 5:14).

RESUMO

Melanoma é um câncer de pele cujas metástases para órgãos distantes levam à óbito milhares de pessoas todos os anos. Até o presente momento, não existe uma forma de terapia que possua alta frequência de respostas duradouras. Sendo assim, muitos pacientes com câncer utilizam homeopatia como uma terapia integrativa e complementar, e relatam terem vivenciado os benefícios do tratamento. Entretanto, existem poucas evidências científicas que comprovem sua real eficácia. Sendo assim, no presente estudo foi investigado o potencial anti-melanoma de um medicamento homeopático chamado M1, com base em sua ação imunoestimulante relatada anteriormente. Para tanto camundongos C57BL/6 foram injetados intravenosamente com células de melanoma B16F10 ou LWT1 para formação de metástases pulmonares e tratados com M1 ou seu veículo (água). Após 14 dias de tratamento, os camundongos foram eutanasiados e os pulmões foram removidos para análises microscópicas e por citometria de fluxo. As análises histológicas revelaram que M1 reduziu a formação de metástases em ambos os modelos de melanoma. Adicionalmente, o tamanho dos nódulos, bem como a proliferação e angiogênese tumorais estavam todas reduzidas em metástases de melanoma B16F10 de camundongos tratados com M1. Interessantemente, a ação do M1 foi independente da imunidade inata e adaptativa mediada por linfócitos. Por outro lado, pulmões de camundongos com B16F10 e tratados com M1 posuíram menores frequências de células mielóides imunossupressoras caracterizadas pela marcação CD11b⁺ Gr-1^{baixo} AT1R⁺. A presença de AT1R nessas células sugere um papel na angiogênese tumoral, inibida pelo M1. Adicionalmente, as metástases de melanoma apresentaram um fenótipo de marcações para imunofluorescência associado à menor malignidade tumoral, como maior expressão de Beta-Catenina e menor expressão de Ácido Hialurônico. Esses dados revelaram que o tratamento com M1 resultou em menor carga tumoral de metástases de melanoma em camundongos e sugerem um possível mecanismo de ação celular: o controle da angiogênese pela inibição de células CD11b⁺ Gr-1^{baixo} AT1R⁺ com consequente menor desenvolvimento tumoral e aumento de apoptose. Esses dados comprovam a eficiência do tratamento com M1 para o câncer de pele tipo melanoma.

Palavras-chave: Melanoma. Homeopatia. M1. Angiogênese. Células CD11b⁺ Gr-1^{baixo} AT1R⁺.

ABSTRACT

Melanoma is a skin cancer with increasing incidence and incurable metastases, which annually kills thousands of people worldwide. Until now, there is not a therapy with high efficacy rate and durable response. Therefore many cancer patients use integrative therapies such as Homeopathy and claim the benefits from these treatments. However, there are not enough scientific evidences to support efficacy of these homeopathic medicines. Therefore, in this study was investigated the anti-melanoma potential of a homeopathic medicine termed M1, based on M1's immune-stimulatory action that has been previously reported. C57BL/6 mice were injected intravenously with B16F10 or LWT1 mouse melanoma cells and treated with M1 or vehicle (water). Following 14 days of treatment, mice were euthanized, lungs removed and analysed by microscopy or flow cytometry. Microscopic analysis revealed the quantity of metastases was reduced by treatment with M1 for both melanoma cell lines. Furthermore, metastases' size, proliferation and angiogenesis were all reduced by M1 treatment for the B16F10 model. Surprisingly, these effects by M1 treatment were not associated but independent of innate and adoptive immune responses for B16F10 and LWT1 melanoma metastases. On the other hand, mice's lungs with B16F10 and treated with M1 had fewer frequency of CD11b⁺ Gr-1^{low} AT1R⁺ myeloid-derived suppressor cells. The expression of AT1R on these cells suggests a possible role for tumour angiogenesis, inhibited by M1. Additionally, melanoma metastases had a phenotype determined by microscopy typical for decreased malignancy, such as increased Beta-Catenin and decreased Hyaluronic Acid expression. In summary, these data reveal M1 treatment reduces tumor burden of melanoma metastases in mice and suggest a possible mechanism of action: control of angiogenesis by inhibition of CD11b⁺ Gr-1^{low} AT1R⁺ cells with consequent reduction of tumor development and increased tumour apoptosis. These data show the efficacy of treatment with M1 and provide insights in the importance of treatment with homeopathic medicines.

Key words: Melanoma. Homeopathy. M1. Angiogenesis. CD11b⁺ Gr-1^{low} AT1R⁺ cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DE MELANOMA METASTÁTICO.....	16
FIGURA 2 - PRINCIPAIS MUTAÇÕES NA VIA MAPKINASE EM MELANOMA HUMANO.....	19
FIGURA 3 - ESTABELECIMENTO DOS MODELOS DE MELANOMA METÁSTATICO EM CAMUNDONGOS.....	47
FIGURA 4 - A FORMAÇÃO DE METÁSTASES DE MELANOMA É INIBIDA POR TRATAMENTO COM M1.....	49
FIGURA 5 - M1 REDUZ A METÁSTASE PULMONAR PELO MELANOMA.....	51
FIGURA 6 - M1 REDUZ O TAMANHO E PROLIFERAÇÃO DOS NÓDULOS TUMORAIS.....	52
FIGURA 7 - O SISTEMA IMUNOLÓGICO NÃO ESTÁ ALTERADO EM CAMUNDONGOS COM MELANOMA B16F10 E TRATADOS COM M1.....	54
FIGURA 8 - M1 NÃO PRECISA DE IMUNIDADE ADAPTATIVA E INATA MEDIADA POR LINFÓCITOS PARA TER EFEITOS CONTRA MELANOMA LWT1.....	55
FIGURA 9 - REDUÇÃO DE CÉLULAS CD11B ⁺ GR-1 ^{BAIXO} AT1R ⁺ ESTÁ ASSOCIADA AO M1 E MELANOMA.....	57
FIGURA 10 - AT1R NÃO É EXPRESSO PELAS DEMAIS POPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS PULMONARES.....	58

FIGURA 11 - M1 REDUZ A ANGIOGÊNESE TUMORAL E GERA APOPTOSE EM METÁSTASES DE MELANOMA.....	60
FIGURA 12 - TRATAMENTO COM M1 AUMENTA β-CATENINA NO MELANOMA PULMONAR.....	62
FIGURA 13 - ANÁLISE DE MARCADORES DE PROGNÓSTICO EM METÁSTASES DE MELANOMA.....	63
FIGURA 14 - METÁSTASES PULMONARES DE LWT1 NÃO SÃO CONTROLADAS POR LINFÓCITOS T CD8⁺, MAS SIM POR CÉLULAS NK.....	66
FIGURA 15 - PROPOSTA DO MECANISMO DE AÇÃO DO M1 CONTRA A FORMAÇÃO DE METÁSTASES DE MELANOMA.....	81

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ALGUMAS DAS OPÇÕES ATUAIS DE TERAPIAS PARA O MELANOMA MALIGNO.....	26
TABELA 2 - ALGUNS ESTUDOS CLÍNICOS ATUAIS QUE INVESTIGAM A AÇÃO DA HOMEOPATIA COMO UM TRATAMENTO COMPLEMENTAR PARA O CANCER.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

17-AAG – 17-N-Alilamino-17-Demethoxigeldanamicina

7-AAD – 7-Aminoactinomicina-D

Anti-asGM1 – anti-asialo(as)GM1

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AT1R – “Angiotensin II Type 1 Receptor”

ATP – Adenosina Trifosfato

CBA – “Cytometric Bead Array”

CD – “Cluster of Differentiation”

CE – Coeficiente de Eficiência

cH – “centesimal of Hanemann”

CTLA-4 – “Anti-Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4”

dH – “decimal of Hahnemann”

DAPI – 4’6-diamidino-2-fenilindole

DMEM – “Dulbecco’s Modified Eagle Medium”

DMSO – Dimetil Sulfóxido

DNA – “Deoxyribonucleic acid”

DNAM-1 – “DNAX Accessory Molecule-1”

iv – intravenoso

TCR – “T Cell Receptor”

Th – “Thelper”

TNF – Fator de Necrose Tumoral

FDA – Food and Drug Administration

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

Gr-1^(intermediário) – Gr-1^(int)

HDM2 – “Human Double Minute 2”

HEPES – “4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid”

HLA – “Human Leukocyte Antigen”

HMB45 – “Human Melanoma Black 45”

IFN- γ – Interferon- γ

Ig - Immunoglobulina

IL-2 – Interleucina-2

IL-6 – Interleucina-6

IL-10 – Interleucina-10

IL-12p70 – Interleucina-12 subunidade p70

VEGF – “Vascular Endothelial Growth Factor”

M – Molar

MAPKinase – “Mitogen-Activated Protein Kinase”

MART-1 – “Melanoma Antigen Recognized by T cells-1”

MCP-1 – “Monocyte Chemo attracting Protein-1”

MDM2 – “Mouse Double Minute 2”

MDSC – “Myeloid-derived Suppressor Cells”

MHC – “Major Histocompatibility Complex”

NK – “Natural Killer”

NKG2D – “Natural Killer Group 2, Member D”

PBS – “Phosphate Buffered Saline”

PD-1 – “Programed Death-1”

pERK – ERK fosforilada

PKC – “Protein Kinase C”

PLC γ 2 – “Phospholipase C γ 2”

PVR – “Poliovirus Receptor”

QIMR – QIMR Berghofer Medical Research Institute

RGB – “Red, Green and Blue”

RNA – “Ribonucleic acid”

RPMI 1640 – “Roswell Park Memorial Institute 1640”

SFB – Soro Fetal Bovino

SPL76 – “SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa”

TCF – “Transcription Factor”

TGF- β – “Transforming Growth Factor- β ”

VEGF – “Vascular Endothelial Growth Factor”

VEGFR - “Vascular Endothelial Growth Factor Receptor”

WT – “Wild Type”

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS E TUMORES DE MELANOMA.....	17
2.2 TRATAMENTOS ATUAIS PARA O MELANOMA.....	25
2.3 TERAPIAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES – HOMEOPATIA.....	29
3. JUSTIFICATIVA	34
4. OBJETIVOS	35
4.1 GERAL.....	35
4.2 ESPECÍFICOS.....	35
5. MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1 M1 E PLX4720.....	36
5.2 CÉLULAS E CAMUNDONGOS.....	36
5.3 ESTABELECIMENTO DE NOVO MODELO DE MELANOMA BRAF ^{V600E}	37
5.4 AVALIAÇÃO DE SUSCEPTIBILIDADE DA LWT1 AO TRATAMENTO COM PLX4720.....	38
5.5 WESTERN BLOTTING.....	38
5.6 MODELO DE METASTASE EXPERIMENTAL.....	39
5.7 TRATAMENTOS IN VIVO.....	40
5.8 HISTOLOGIA.....	40
5.9 ANÁLISE DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS.....	42
5.10 CITOMETRIA DE FLUXO.....	43
5.11 ESTATÍSTICAS.....	44
6. RESULTADOS	45
6.1 ESTABELECIMENTO DOS MODELOS DE MELANOMA METASTÁTICO EM CAMUNDONGOS.....	45
6.2 O TRATAMENTO COM M1 REDUZ A QUANTIDADE DE METÁSTASES PULMONARES DE MELANOMA.....	48
6.3 HISTOLOGIA REVELA MENORES TAMANHOS E QUANTIDADE DE NÓDULOS PULMONARES.....	49
6.4 O TRATAMENTO COM M1 NÃO AUMENTA A RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA O MELANOMA.....	53

6.5 AT1R EM CÉLULAS CD11B+ GR-1BAIXO É MODULADO POR M1.....	56
6.6 TRATAMENTO COM M1 REDUZ A FORMAÇÃO DE VASOS TUMORAIS E GERA APOPTOSE DE CÉLULAS DE MELANOMA.....	58
6.7 ANÁLISE DE MARCADORES RELACIONADOS À MALIGNIDADE DO MELANOMA.....	61
6.8 METÁSTASES PULMONARES DE LWT1 NÃO SÃO CONTROLADAS PELA IMUNIDADE ADAPTATIVA.....	64
7. DISCUSSÃO.....	67
8. CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS.....	84

1. INTRODUÇÃO

Câncer é uma doença constituída de células com proliferação contínua e descontrolada, resultante de mutações adquiridas através de processos celulares e fatores ambientais. Aproximadamente 58% dos 14,9 milhões de novos casos diagnosticados anualmente no mundo inteiro resultam em morte dos pacientes. No ano de 2012, por exemplo, o câncer levou à morte aproximadamente 8,2 milhões de pessoas, conforme dados da Organização Mundial da Saúde (GLOBOCAN, 2012). No Brasil, o Ministério da Saúde, através do Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima que sejam diagnosticados em 2014 aproximadamente mais 574.000 novos casos de cânceres. Desses, 39.000 serão diagnosticados no estado do Paraná, dos quais aproximadamente 17,9% ocorrerão na capital paranaense Curitiba. Dentre os diversos tipos de cânceres, o câncer de pele tipo melanoma ocupa no Paraná o nível mais alto das taxas brutas de incidência por 100.000 habitantes (5,19 para homens e 5,05 para mulheres) quando comparado com os demais estados brasileiros (INCA, 2014).

O câncer de pele do tipo melanoma ocorre principalmente em indivíduos de pele clara. Ele é originado de melanócitos localizados na membrana basal do tecido epitelial. A transformação maligna de melanócitos para melanoma ocorre principalmente a partir de lesões cutâneas benignas chamadas “pintas”, que com o acúmulo de mutações em genes oncogênicos passam a ter proliferação celular constante e independente de fatores de crescimento. Essas mutações em genes oncogênicos podem ser para ganho de função, como, por exemplo, em genes relacionados com proliferação celular (*Braf*, *Nras* e *Pak-1*), ou para perda de função, como por exemplo em genes que regulam o ciclo celular (*p16INK4A* e *Trp53*). Adicionalmente, a transformação maligna também é caracterizada pela invasão intradérmica do melanoma para tecidos subcutâneos. Uma vez nesses tecidos, células de melanoma podem entrar em capilares sanguíneos ou vasos linfáticos e se espalharem para outras partes do corpo (FIGURA 1A - B). Esse processo é

chamado de metástase e os principais órgãos atingidos pelo melanoma são os linfonodos, medula óssea, cérebro e pulmões (HOUGHTON; POLSKY, 2002).

Apesar de lesões cutâneas de melanoma serem facilmente tratadas com geralmente 100% de cura, quando presente as metástases de melanoma são incuráveis, levando ao óbito milhares de pessoas no mundo inteiro. Nos Estados Unidos, por exemplo, são estimados para 2014 mais de 74.000 novos casos de melanoma com aproximadamente 9.700 mortes (SIEGEL *et al.*, 2014). Adicionalmente, a Austrália é considerada o país com maior incidência, com uma média de 40 casos a cada 100.000 pessoas e mortalidade de aproximadamente 10% (AIHW, 2012). Já no Brasil, anualmente são diagnosticados mais de 6.000 novos casos de melanoma (principalmente nas regiões sul e sudeste, onde há maior concentração de indivíduos de pele clara) e com frequência de mortalidade de aproximadamente 24% (INCA, 2014). Esses dados revelam que o melanoma é um problema global de saúde pública e com alta taxa de mortalidade, principalmente no Brasil. Portanto maiores estudos são necessários para melhorar as atuais formas de terapias e também para a descoberta de novos agentes terapêuticos.

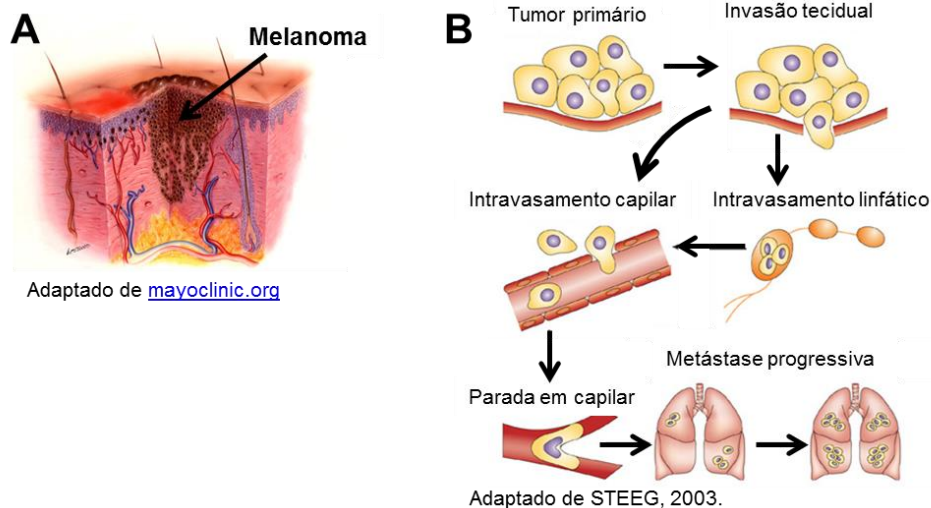


FIGURA 1 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DE MELANOMA METÁSTATICO

FONTES: Adaptado de (A) MAYO CLINIC (2014); (B) STEEG (2003).

A figura acima ilustra, de forma esquemática, o melanoma maligno na pele (A) e a formação de metástases (B).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características das células e tumores de melanoma

Uma vez que células de melanoma originam-se de melanócitos, é comum a presença de vesículas citoplasmáticas contendo melanina. A melanina é um pigmento com coloração marrom, o que facilita a identificação do melanoma: a identificação por microscopia de células contendo grânulos de melanina sugere a presença de metástases de melanoma em tecidos e órgãos que naturalmente não possuem melanócitos, como, por exemplo, os pulmões. Entretanto, uma vez que existem casos de melanoma sem grânulos de melanina, para confirmação do diagnóstico médico é comum a utilização de marcadores específicos para proteínas expressas pelo melanoma, tais como Tiosinase, HMB45 ou MART-1 (OHSIE *et al.*, 2008). Por outro lado, em alguns modelos experimentais de metástases de melanoma em camundongos, a quantificação da carga tumoral é baseada somente na presença de nódulos tumorais com a coloração marrom escura ou preta (WELCH, 1997). Curiosamente, a melanina também pode ser um alvo terapêutico. Foi relatado em um estudo anterior que o corante chamado azul de metileno, que possui alta afinidade à melanina, apresentou efeitos significativos no controle de melanoma em modelos experimentais em camundongos, com redução do volume tumoral associado a redução da proliferação celular e da expressão de enzimas relacionadas à invasão celular que são superexpressas em tumores, como heparanases (WAGNER *et al.*, 2012). A melanina é, portanto, uma característica que se destaca em células de melanoma e pode ser explorada terapêuticamente.

Outra característica comum entre biópsias de melanoma é a alta taxa de proliferação celular, geralmente avaliada pela presença do marcador Ki-67 (OHSIE *et al.*, 2008). É bem descrito que a via de sinalização da “Mitogen-Activated Protein Kinase” (MAPKinase) é desregulada em células de melanoma e constitui portanto

um importante alvo terapêutico. Essa via consiste em três enzimas que formam uma cascata de sinalização sequencial intracelular envolvendo uma série de fosforilações subsequentes. São elas as enzimas da família das “MAPKinase kinase kinases” (RAF), que fosforilam proteínas da família das “MAPKinase kinases” (MEK), que por fim fosforilam proteínas da família das “MAPKinases” (ERK). No final dessa via, é ativada a transcrição de genes envolvidos na proliferação e sobrevivência celular (CHENG; ZHANG; LI, 2013). Apesar de que em melanócitos normais essa via só é ativada por algum receptor de fator de crescimento associado à tirosina kinase, células de melanoma possuem mutações em pelo menos um dos componentes que promovem constitutiva ativação da via MAPKinase e conseqüentemente proliferação celular constante e descontrolada. Algumas das mutações já identificadas e drogas antagonistas estão resumidas abaixo (FIGURA 2).

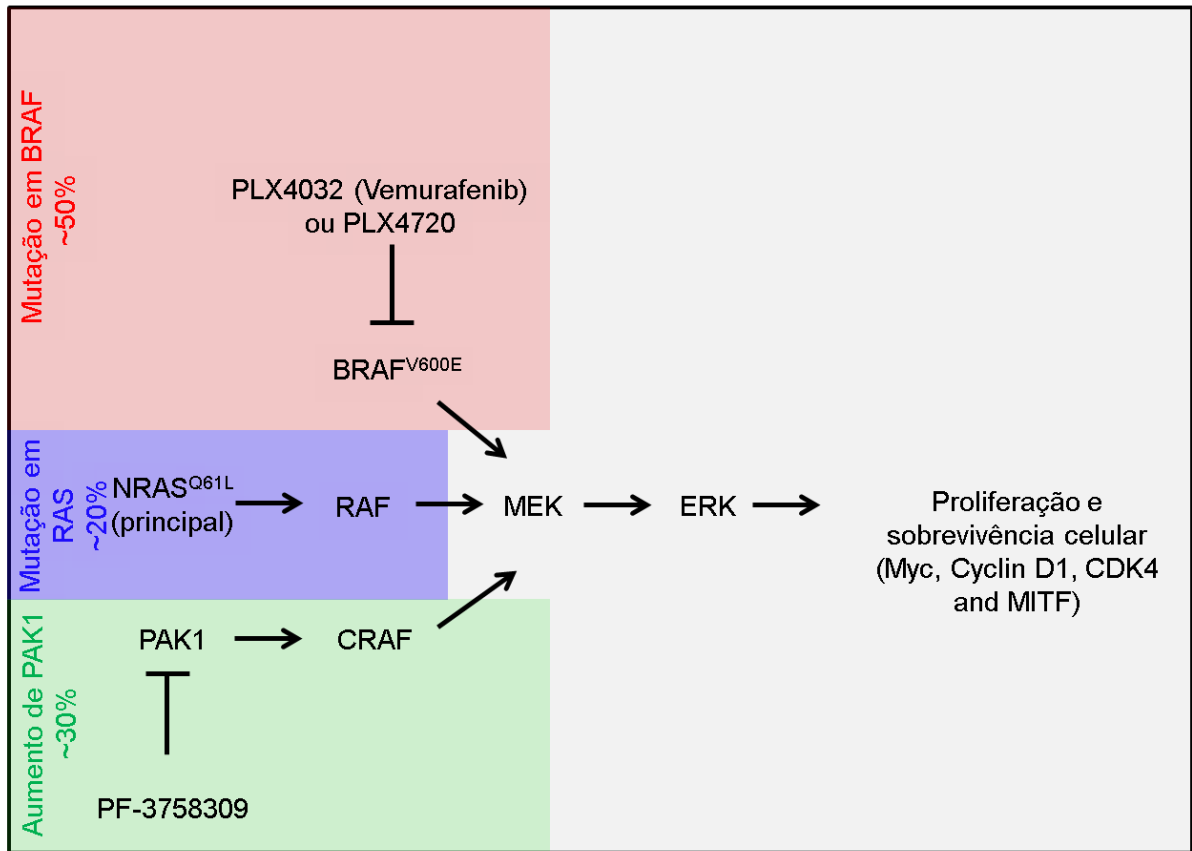


FIGURA 2 - PRINCIPAIS MUTAÇÕES NA VIA MAPKINASE EM MELANOMA HUMANO

FONTES: CHENG; ZHANG; LI (2013); JOSEPH *et al.* (2010); ONG *et al.* (2013); SEARS *et al.* (2000); TSAI *et al.* (2008).

A figura acima ilustra de forma esquemática as principais mutações encontradas em melanoma na via MAPKase, bem como seus inibidores farmacológicos específicos.

Para que uma célula de melanoma possa sobreviver e proliferar mesmo na presença de mutações, ela precisa “driblar” a via natural de inibição de divisão celular desencadeada por dano ao DNA. A proteína efetora dessa via é a p53, que ativa a transcrição de genes envolvidos no reparo ao DNA, interrupção do ciclo celular entre as fases G1/S da intérfase e, se o dano persiste, apoptose. Interessantemente, tumores de melanoma são geralmente negativos para a presença de p53 (OHSIE *et al.*, 2008). Isso ocorre por que algumas células de melanoma possuem mutações com ganho de funções em uma ubiquitina ligase chamada HDM2 (MDM2 em camundongos), que poli-ubiquitina p53 para sua posterior degradação em proteossomos. Dessa maneira, as células ficam livres para adquirirem as demais mutações e proliferarem. Sendo assim, foram testadas pre-clinicamente algumas drogas capazes de reduzir a quantidade de HDM2 funcional, produzindo efeitos significativos no controle do melanoma associados ao aumento e ativação endógena de p53, como, por exemplo, o Nutlin e 17-N-Allilamino-17-Demethoxigeldanamicina (17-AAG) (MERKEL *et al.*, 2010; VASEVA *et al.*, 2011). Um estudo clínico de fase II já foi completado e o 17-AAG demonstrou níveis aceitáveis de toxicidade e média de sobrevida de 232 dias (n = 11), contra 173 dias no grupo não tratado, em pacientes com melanoma metastático progressivo após intervenção terapêutica com drogas atuais (PACEY *et al.*, 2012).

Uma característica bastante destacada das células de melanoma é a perda de adesão intercelular. Em melanócitos, a adesão intercelular ocorre através das proteínas E-Caderina entre as células. Essa proteína recruta β -Catenina citoplasmática que faz a ligação com o citoesqueleto, estabilizando a interação entre as células. Por outro lado, células de melanoma perdem a adesão intercelular mediada por E-Caderina, em alguns casos por alterações nas regiões que interagem com proteínas acessórias. Nesse caso, os níveis de β -Catenina “livres” no citoplasma ficam aumentados. Por fim, β -Catenina também é um componente da via de sinalização Wnt, atuando no núcleo celular como um fator de transcrição para diversos genes relacionados com crescimento e proliferação de células (NELSON;

NUSSE, 2004). Embora ainda pouco compreendido, é possível que β -Catenina possa constituir um alvo terapêutico. O silenciamento gênico de β -Catenina por RNA de interferência em células de melanoma BRAF^{WT} reduz tanto a proliferação celular *in vitro* quanto a formação de tumores *in vivo* (TAKAHASHI; NISHIKAWA; TAKAKURA, 2006). Entretanto, esse silenciamento de β -Catenina reduziu também a expressão de E-Caderina e resultou no aumento da capacidade metastática associada a maiores capacidades migratórias (TAKAHASHI *et al.*, 2008). Por outro lado, foi reportado que células de melanoma mutantes BRAF^{V600E} possuem maior estabilidade da expressão de β -Catenina e que esta proteína é crítica para a formação de metástases pulmonares e nos linfonodos (DAMSKY *et al.*, 2011). Esses dados sugerem que a β -Catenina possui papéis contrastantes, variando de acordo com os seus níveis de expressão e o estado de mutação de BRAF. Sendo assim mais estudos são necessários para melhor compreender o papel da β -Catenina para o melanoma.

A interação de células de melanoma com a matriz extracelular também é de suma importância. Dentre os vários componentes da matriz extracelular encontra-se o Ácido Hialurônico. Células de melanoma expressam o receptor para Ácido Hialurônico chamado CD44 e a interação entre o ligante e receptor está relacionada com sinais para a sobrevivência celular (RICHTER *et al.*, 2012). O bloqueio da interação de CD44 com Ácido Hialurônico pelo uso de anticorpo monoclonal anti-CD44 reduziu a formação de metástases de melanoma e aumentou significativamente a sobrevivência de camundongos injetados com células de melanoma (MUMMERT *et al.*, 2003). Esses dados sugerem que a interação CD44 - Ácido Hialurônico pode ser um alvo terapêutico, e estudos clínicos envolvendo o bloqueio dessa interação são ansiosamente aguardados.

O crescimento tumoral é dependente do fornecimento de nutrientes e oxigênio por uma rede de capilares sanguíneos que são formados por um processo chamado neoangiogênese tumoral (SINGH, 2004). Células de melanoma recrutam e

estimulam a proliferação de células endoteliais vasculares através de um fator de crescimento chamado “Vascular Endothelial Growth Factor” (VEGF). Células endoteliais vasculares possuem receptores associados à proteínas “kinases”, que após interação com VEGF desencadeiam uma cascata de sinalização intracelular que resulta em proliferação e formação de novos vasos sanguíneos (MARNEROS, 2009). Sendo assim, é atrativo especular que drogas que inibem a angiogênese no melanoma reduzem também o crescimento tumoral. De fato, drogas com ação inibidora do receptor ou na via de sinalização por VEGFR, como Sorafenib e Sunitinib, foram testadas em modelos experimentais com comprovada eficácia contra o melanoma e passaram para estudos clínicos (ZAKI; BASU; CORRIE, 2012). Por outro lado, maiores estudos básicos ainda são necessários para melhor compreender a angiogênese no melanoma, principalmente para a busca do mecanismo de produção de VEGF e também por qual célula ele é produzido.

Uma das vias que controlam a angiogênese tumoral no melanoma está relacionada com o sistema Renina-Angiotensina (DESHAYES; NAHMIAS, 2005). Um dos receptores para Angiotensina II é o “Angiotensin II Type 1 Receptor” (AT1R) e está associado ao melanoma. Camundongos deficientes para AT1R (*At1r^{-/-}*) possuem menor crescimento de melanoma subcutâneo associado à supressão da angiogênese tumoral e menores quantidades de macrófagos produtores de VEGF (EGAMI *et al.*, 2003). Também foi relatado que Angiotensina II é um fator essencial para gerar macrófagos associados aos tumores, que secretam fatores de crescimento para estimular a proliferação de células tumorais (CORTEZ-RETAMOZO *et al.*, 2013). Esses dados sugeriram que AT1R pode ser um alvo terapêutico para o melanoma, e de fato o bloqueio desse receptor por um antagonista chamado Losartana reduziu o crescimento tumoral associado ao controle da angiogênese (OTAKE *et al.*, 2010). Entretanto, maiores estudos ainda são necessários para compreender o papel de AT1R em células associadas aos tumores que promovem a angiogênese tumoral.

O sistema imunológico constitui um importante mecanismo de defesa natural do organismo contra a formação de neoplasias e progressão tumoral (O’SULLIVAN *et al.*, 2012; VESELY *et al.*, 2011). Dentre os diversos componentes do sistema imunológico capazes de gerar respostas antitumorais, os diferentes tipos celulares são amplamente estudados e classificados de acordo com a natureza da resposta: inata ou adaptativa. A população de células da imunidade inata mais estudada na imunologia tumoral são as células Assassinas Naturais, mais comumente conhecidas do inglês por “Natural Killer” (NK) (VIVIER *et al.*, 2008). Essas células possuem uma grande quantidade de receptores extracelulares que reconhecem proteínas expressas por células tumorais. Os receptores podem ser para ativação ou inibição das funções de células NK (LONG *et al.*, 2013). Dentre os receptores presentes em células NK, o CD226 (DNAM-1) é uma glicoproteína de membrana da família das imunoglobulinas. Uma vez que CD226 é ativado pela ligação com seus ligantes em células tumorais, que são nectinas e outras proteínas semelhantes à nectinas (nectin-like), uma cascata de sinalização intracelular envolvendo kinases como PKC, SLP76, Vav1 e PLC γ 2 resulta no aumento de íons Ca²⁺ citoplasmáticos e consequente exocitose de grânulos contendo Perforinas, Granzimas e Interferon- γ (ANDRADE; SMYTH; MARTINET, 2014). Essas moléculas promovem apoptose e ação citostática nas células tumorais e foram demonstradas críticas para a ação anti-tumoral de células NK (LONG *et al.*, 2013; STREET; CRETNEY; SMYTH, 2001; VAN DEN BROEK *et al.*, 1995). Adicionalmente, a falta de CD226 também aumenta a carga tumoral de camundongos em modelos experimentais de câncer (IGUCHI-MANAKA *et al.*, 2008). Interessantemente, os ligantes para CD226, chamados CD155 (Polivirus receptor – PVR) e CD112, são expressos por células tumorais e células infectadas por vírus em resposta à danos ocorridos no DNA, como mutações (CHAN; SMYTH; MARTINET, 2013). CD155 é expresso por células de melanoma, como a linhagem B16F10, e a quantidade de tumores é significativamente maior quando essas células são injetadas em camundongos deficientes para CD226 (Cd226^{-/-}) (CHAN *et al.*, 2010). Sendo assim, pesquisadores no mundo inteiro especulam que essa via em células NK constitui um alvo terapêutico para

imunoterapias (MORISAKI; ONISHI; KATANO, 2012). Estudos descrevendo o papel de CD226 para as atuais formas de terapias bem como o desenvolvimento de novas imunoterapias fundamentadas em seu papel para o controle tumoral são ansiosamente aguardados.

Linfócitos T CD8⁺ são células da imunidade adaptativa com atividade citotóxica também através da secreção de Perforina, Granzimas e Intérféron- γ , semelhantemente às células NK. Entretanto, apesar de também expressarem CD226, esses linfócitos reconhecem células tumorais através de receptores tipo TCR- $\alpha\beta$ que interagem com o complexo de histocompatibilidade, chamado MHC de classe 1 em camundongos e HLA em humanos, expressos por praticamente todas as células do organismo. Essa interação é antígeno/TCR específica e um linfócito reconhece apenas um mesmo antígeno expresso por células tumorais, o que desencadeia sua ação citotóxica (VESELY *et al.*, 2011). O início da imunidade antitumoral mediada por linfócitos T CD8⁺ ocorre a partir da endocitose, processamento e apresentação de antígenos tumorais por células dendríticas ou outras células com capacidade de apresentação de antígenos, como linfócitos B e macrófagos, presentes nos linfonodos. Essa interação ativa a migração, proliferação e função dos linfócitos (JOFFRE *et al.*, 2012). Os linfócitos T CD8⁺ migram então para o local onde está o tumor atraídos pela sinalização por quimiocinas, onde exercem sua função citotóxica (VESELY *et al.*, 2011). Essas células possuem papel crítico no controle do melanoma e várias de suas vias para ativação ou inibição tem sido estudadas (ZHOU *et al.*, 2014). Uma das vias de inibição, a do CTLA-4, foi bastante explorada e seu bloqueio já constitui uma forma de terapia para o melanoma, que será discutido posteriormente nesta revisão bibliográfica.

Diversas outras células do sistema imunológico já foram descritas como importantes componentes da imunologia tumoral. Os macrófagos e neutrófilos por exemplo são comumente associados ao crescimento tumoral pela expressão de fatores de crescimento, angiogênese e imunossupressão. Por outro lado, células T

CD4⁺ podem ativar ou inibir as demais células do sistema imunológico, conforme o tipo celular. Linfócitos B ativados por células T CD4⁺ (células Th₂) produzem anticorpos contra proteínas tumorais que podem bloquear essas proteínas inibindo suas funções e ativar o sistema complemento que gera necrose da célula alvo. Adicionalmente, os anticorpos podem mediar citotoxicidade de células NK através do reconhecimento das porções constantes dos anticorpos pelas NK, processo este chamado em inglês 'Antibody-dependend Celular Cytotoxicity' (VESELY *et al.*, 2011). O sistema imunológico é, portanto, um interessante nicho para explorar diversos mecanismos de controle e terapias para o câncer, como amplamente discutido pela comunidade científica (BORDON, 2013; SCHAER; LESOKHIN; WOLCHOK, 2011; ZITVOGEL *et al.*, 2013).

2.2 Tratamentos atuais para o melanoma

Atualmente existem basicamente quatro formas diferentes, com eficiência comprovada cientificamente, para o tratamento de metástases de melanoma humano e aprovadas para uso nos Estados Unidos pela "Food and Drug Administration" (FDA), que são: 1) Dacarbazina; 2) Interleucina-2 (IL-2) recombinante; 3) Inibidores de BRAF^{V600E}; e 4) anticorpo, do Inglês, anti-"Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4" (CTLA-4). Algumas informações dessas drogas, juntamente com outras que no momento estão em estudos clínicos, são resumidas na Tabela 1.

TABELA 1: ALGUMAS DAS OPÇÕES ATUAIS DE TERAPIAS PARA O MELANOMA MALÍGNO

Nome:	Células alvo:	Modo de ação:	Fase Clínica:
Dacarbazina	Tumorais	Citotóxico	Aprovado
Interleucina-2	Linfócitos NK e T	Estimulatório	Aprovado
Vemurafenib	Tumorais	Inibidor de BRAF ^{V600E}	Aprovado
Anti-CTLA-4	Linfócitos T	Bloqueio de via de inibição	Aprovado
Anti-PD-1	Linfócitos T	Bloqueio de via de inibição	Fase I
Anti-CD137	Linfócitos NK e T	Estimulatório	Fase II
NY-ESO-1	Imunidade adaptativa	Peptídeo de melanoma	Fase II
17-AAG	Tumorais	Aumenta níveis de p53	Fase II

FONTE: CLINICAL TRIALS (2014).

NOTAS: FDA, U. S. Food and Drug Administration; CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4; PD-1, programmed death-1; 17-AAG, 17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin.

Dacarbazina ((5-(3,3-Dimetil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida)) é um agente alquilante com ação anti-neoplásica pois incorpora radicais alquiles nas bases nitrogenadas de guanina do DNA, gerando danos e morte de células proliferativas durante a divisão celular. A sobrevida de pacientes com melanoma aumenta entre 5,6 a 7,8 meses após o início do tratamento em até 12% dos pacientes tratados com Dacarbazina, sendo a sobrevida média total de 6 – 9 meses (CHAPMAN *et al.*, 2011). Entretanto, menos de 2% dos pacientes tratados sobrevivem mais que 6 anos. Apesar de sua eficiência ser evidentemente baixa, a Dacarbazina foi o primeiro agente quimioterápico para uso clínico e por 15 anos a única opção para o tratamento do melanoma (FINN; MARKOVIC; JOSEPH, 2012).

IL-2 é uma citocina naturalmente produzida por células do sistema imunológico com ação estimulatória em linfócitos citotóxicos, como células NK e T CD8⁺ (GASTEIGER *et al.*, 2013). Uma vez que essas células são efetoras contra infecções intracelulares e desenvolvimento tumoral, IL-2 recombinante foi então utilizada para potencializar a ação citotóxica contra células de melanoma. 16% dos pacientes tratados com altas doses de IL-2 (600.000 – 720.000 U/kg) responderam

ao tratamento por 5,9 meses com consequente média de sobrevida de 11,4 meses (ATKINS *et al.*, 1999).

CTLA-4 (CD152) é uma proteína de membrana citoplasmática pertencente ao grupo das imunoglobulinas e é expressa em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Ela possui 30% de homologia com CD28 e compete com ele para ligação com B7-1 (CD80) ou B7-2 (CD86) em células apresentadoras de antígeno. Quando interage com seus ligantes, além de impedir a interação do B7-1 e B7-2 com CD28, o CTLA-4 também inicia uma cascata de sinalização intracelular que resulta na ativação de fosfatases que impedem a ativação e proliferação de linfócitos T auxiliares e citotóxicos, sendo portanto um receptor associado à inibição de linfócitos T. Também, o CTLA-4 é expresso em linfócitos T reguladores e possui funções críticas para promover imunossupressão (MOCELLIN; BENNA; PILATI, 2013). Um anticorpo monoclonal humano do tipo IgG1, chamado Ipilimumab, foi construído para bloquear o sítio de ligação do CTLA-4 com seus ligantes. Pacientes com melanoma e tratados com o anti-CTLA-4 tiveram uma sobrevida média total de 27,8 meses. Entretanto, apenas 10,9% dos pacientes obtiveram uma resposta estável (HODI; O'DAY, 2010). Com base no aumento significativo da sobrevida média dos pacientes tratados com anti-CTLA-4, o desenvolvimento dessa imunoterapia é portanto considerado um grande destaque para a história do tratamento do melanoma.

Um estudo de populações revelou que aproximadamente 50% de todos os casos de melanoma no mundo possuem uma mutação em comum no gene *Braf* com substituição do códon que codifica um ácido glutâmico na posição 600 para o códon de uma valina, sendo então a proteína resultante denominada BRAF^{V600E}. A BRAF^{V600E} possui maior afinidade à ATP sendo, portanto, constitutivamente ativa na via MAPKinase, que leva à transcrição de genes relacionados com sobrevivência celular e proliferação, como *Myc*, *Ciclina D1* e *Cdk4* (DAVIES *et al.*, 2002). Por outro lado, Vemurafenib (PLX4032), e seu análogo para uso em pesquisa chamado PLX4720, é um inibidor específico para BRAF^{V600E} atuando como competidor ao sítio

de ligação do ATP. Culturas de células de melanoma mutantes BRAF^{V600E} tratadas com PLX4032 ou PLX4720 possuem menores taxas de proliferação celular associada aos reduzidos níveis de ERK fosforilada (pERK). Também, camundongos imunossuprimidos inoculados com células humanas de melanoma BRAF^{V600E} possuem inibição do crescimento de tumores subcutâneos quando tratados com os inibidores (JOSEPH *et al.*, 2010; TSAI *et al.*, 2008). Com base nesses resultados promissores, Vemurafenib foi então testado clinicamente em pacientes humanos. Testes clínicos de fase 1 e 2 revelaram a segurança e respostas ao tratamento em mais de 50% dos pacientes. Um estudo de fase 3 comparou a eficiência do tratamento com Vemurafenib (960 mg duas vezes ao dia, via oral) contra o tratamento padrão com Dacarbazina: a taxa de resposta de pacientes tratados com Vemurafenib foi de 48%, contra apenas os 5% do grupo Dacarbazina. Essa é a maior porcentagem de resposta obtida até então em estudos de fase 3 para o tratamento de melanoma. No sexto mês de tratamento, a sobrevida de pacientes tratados com Vemurafenib estava em 84%, contra 64% para Dacarbazina. A média de sobrevida obtida para os pacientes tratados com Vemurafenib desde o começo foi de 13,6 meses, com 40% dos pacientes ainda vivos no décimo oitavo mês. Interessantemente, no décimo mês de tratamento todos os pacientes do grupo Dacarbazina começaram a ser tratados com Vemurafenib, uma vez comprovado que este era um tratamento superior (CHAPMAN *et al.*, 2011). Esses dados revelaram que Vemurafenib é um tratamento para melanoma mutante BRAF^{V600E} com alta taxa de resposta e significativo aumento de sobrevida comparado com os demais tratamentos. Por outro lado, para fins de comparação, apesar do aumento de sobrevida do tratamento descrito anteriormente com anti-CTLA-4 (Ipilimumab) produzir sobrevida média de pouco mais que 25 meses, a taxa de resposta é 4 vezes menor que do Vemurafenib. Isso mostra que Vemurafenib é atualmente a terapia predominante para o tratamento da mais frequente forma de melanoma no mundo.

2.3 Terapias integrativas e complementares – Homeopatia

Apesar das formas de tratamento citadas aumentarem a sobrevivência de pacientes com melanoma, até o presente momento essa doença permanece incurável. Sendo assim, muitos pacientes buscam terapias integrativas e complementares para aumentar a eficácia dos tratamentos atuais e melhorar a qualidade de vida. Dentre as terapias integrativas e complementares, a medicina tradicional possui grande aceitação popular e tem sido utilizada no mundo inteiro. Por definição, medicina tradicional é a soma de todos os conhecimentos, habilidades e práticas baseadas em teorias, crenças e relatos populares utilizados para manutenção da saúde, prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças físicas e mentais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000). Interessantemente, essas práticas variam bastante de acordo com a cultura de diferentes nações sendo que no Brasil entre os diversos tipos existentes destacam-se atualmente a prática da Acupuntura, o uso de ervas medicinais e a Homeopatia. A Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) classifica a Homeopatia no Brasil como um medicamento dinamizado e para que seja comercializado deve possuir indicação terapêutica de acordo com os fundamentos das matérias médicas homeopáticas, estudos clínicos e publicações científicas (BRASIL, 2009).

A Homeopatia é fundamentada na teoria de que “semelhante cura semelhante”, em que uma substância que causaria doença em um indivíduo saudável por outro lado em alta diluição geraria a cura em um indivíduo doente que apresente os mesmos sintomas. Ela é baseada no uso de substâncias altamente diluídas em água seguidas de sucussão, a partir de extratos naturais, obtidos de plantas, minerais ou excepcionalmente animais, ou substâncias sintéticas. As diluições são chamadas em Inglês de “decimal of Hahnemann” em homenagem ao médico Christian Friedrich Samuel Hahnemann, o criador dessa terapia em 1796. Cada diluição dH corresponde a uma diluição de dez vezes seguida por vigorosa agitação, também chamada de sucussão (BRASIL, 2011).

Aproximadamente 64% dos pacientes com câncer utilizam alguma forma de terapia complementar (THOMPSON; KASSAB, 2000). Na Alemanha, por exemplo, de todos os pacientes da oncologia pediátrica, 45,2% utilizam Homeopatia (LÄNGLER *et al.*, 2011). Em escala global, uma média de 6,1% de todos os pacientes com câncer no mundo utilizam homeopatia desde o diagnóstico, sendo que 25% de todos os pacientes com melanoma também utilizam alguma forma de terapia complementar. O principal motivo para utilização de terapias complementares como a Homeopatia, em 50,7% dos pacientes, é aumentar a habilidade natural do corpo para combater o câncer, sendo que 22,4% deles alegam terem vivenciado esses benefícios após tratamento (MOLASSIOTIS *et al.*, 2005). Embora existam estudos clínicos que revelaram melhoras na qualidade de vida dos pacientes com câncer (ROSTOCK *et al.*, 2011), algumas análises desses estudos clínicos utilizando Homeopatia concluíram que faltam evidências que comprovem sua real eficácia (MILAZZO; RUSSELL; ERNST, 2006). Alguns estudos clínicos envolvendo a Homeopatia como tratamento complementar para o câncer estão resumidos na tabela abaixo (TABELA 2). Portanto esses dados revelam que apesar de controversa, a Homeopatia é utilizada por pacientes com câncer no mundo inteiro sem que sua eficácia já tenha sido comprovada cientificamente. Isso constitui, portanto, uma relevante questão a ser respondida pela comunidade científica.

TABELA 2: ALGUNS ESTUDOS CLÍNICOS ATUAIS QUE INVESTIGAM A AÇÃO DA HOMEOPATIA COMO UM TRATAMENTO COMPLEMENTAR PARA O CÂNCER

Atual estado:	Condição:	Intervenção:	Fase:	Identificador:
Recrutando	Tumores malignos	Complementação com homeopatia clássica ou placebo	2 e 3	NCT01509612
Recrutando	Fadiga - Efeitos da quimioterapia	Complementação com homeopatia ou placebo	1 e 2	NCT01983592
Recrutando	Câncer de mama	BRN01 ou placebo	3	NCT01246427
Ativo	Câncer	Remédios Homeopáticos	3	NCT01662076
Completo	Tumor	Tratado ou não com Homeopatia	2	NCT00861432
Completo	Câncer de cabeça e pescoço	Salina ou Traumeel S	1	NCT00584597
Completo	Câncer de mama	Placebo ou Cocculine®	3	NCT00409071

FONTE: CLINICAL TRIALS (2014).

Com base nesses fatos, o Laboratório de Pesquisa em Células Inflamatórias e Neoplásicas da Universidade Federal do Paraná tem realizado pesquisas básicas com medicamentos homeopáticos já a aproximadamente 15 anos. Diversos medicamentos já foram testados em vários modelos biológicos diferentes. Por exemplo: *Mercurius solubilis* em diluições centesimais (cH – do inglês “centesimal of Hanhemann”) de 6cH e 12cH aumentou a produção *in vitro* de Intérféron- γ por macrófagos de camundongos e aumentou a resposta à endotoxina com maior liberação de espécies reativas de nitrogênio (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011). Também, um medicamento homeopático comercial chamado *Canova* foi testado em um modelo de tumores de sarcoma: o tratamento de camundongos portadores de sarcoma 180 reduziu o volume tumoral associado à maiores frequências de células NK (SATO *et al.*, 2005).

Adicionalmente, com a experiência já adquirida por mais de uma década de pesquisa, o grupo de pesquisadores do laboratório em conjunto com médicos e farmacêuticos homeopatas, desenvolveram três medicamentos homeopáticos complexos, que significa com mais de uma substância, para testes em modelos de

camundongos com o objetivo de detectar mudanças no sistema imunológico. Os testes iniciais com os medicamentos, chamados M1, M2 e M8, revelaram aumento na produção de fator de necrose tumoral alfa por monócitos humanos cultivados *in vitro*. Mas a liberação de espécies reativas de oxigênio foi reduzida, enquanto que espécies reativas de nitrogênio foram aumentadas nos grupos tratados com M1 e M2. Estudos *in vivo* revelaram que M1, M2 e M8 aumentaram a frequência de linfócitos T CD8⁺ em linfonodos mesentéricos de camundongos (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Esses resultados sugeriram que os três medicamentos possuem ações no sistema imunológico, o que incentivou o grupo a conduzir estudos em modelos tumorais.

O M8 foi testado contra o melanoma de camundongo B16F10 e demonstrou possuir efeitos significativos no controle da formação de metástases associados à menor expressão de proteoglicanos de heparan sulfato nos tumores (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Testes com o M2 ainda são ansiosamente esperados. Estudos envolvendo o M1 por outro lado já se encontram em estados mais avançados. Inicialmente, o M1 foi testado e revelou o controle de metástases de melanoma B16F10 em camundongos C57BL/6 (GUIMARÃES, 2009). Experimentos envolvendo a formação de massas tumorais de melanoma após injeção subcutânea de B16F10 revelaram que o M1 atua contra o crescimento tumoral. Tumores de animais tratados com M1 possuíam menores tamanhos, massas, proliferação celular e angiogênese tumoral. Uma vez que a via do receptor para Angiotensina II, chamado AT1R, está relacionada com angiogênese do melanoma, como já discutido em parágrafos anteriores, a expressão desse receptor foi investigada nos tumores de melanoma. Interessantemente, imunohistoquímica para AT1R revelou que tumores de camundongos tratados com M1 possuem menores quantidades de células não tumorais AT1R⁺ na periferia do melanoma (ANDRADE, 2011). Esses dados revelaram que o M1 possui ação contra o melanoma B16F10 pela redução de angiogênese tumoral através do controle de células AT1R⁺. Por outro lado, maiores estudos ainda são necessários para melhor compreender os efeitos do tratamento e,

se conveniente, servirem de fundamentos para possíveis estudos clínicos utilizando o M1 como uma forma de medicina complementar.

3. JUSTIFICATIVA

Apesar das recentes descobertas de novas terapias para o tratamento do melanoma terem revolucionado a medicina e aumentado meses de vida de milhões de pessoas portadoras dessa doença no mundo inteiro, metástases de melanoma permanecem incuráveis, levando à óbito quase 100% dos pacientes. Portanto, existe uma demanda urgente para estudar melhorias nas atuais formas de terapias e descobrir novos tratamentos. Adicionalmente, a homeopatia é uma prática comum entre pacientes com câncer, sendo que existem relatos clínicos com evidências de melhoras na qualidade de vida e tratamento dos pacientes. Entretanto, a real eficácia do uso de homeopatia ainda precisa ser comprovada cientificamente em mais estudos pré-clínicos realizados em laboratório. Com base nesses fatos, no presente estudo foi investigado um medicamento homeopático em particular (M1) quanto aos seus efeitos contra o melanoma em modelos experimentais de camundongos.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

O presente estudo teve como objetivo principal investigar se o medicamento homeopático M1 possui efeitos relevantes contra o melanoma, em modelos experimentais de metástases pulmonares em camundongos.

4.2 Específicos

- a) Estabelecer um novo modelo metastático de melanoma *Braf*^{V600E} em camundongos;
- b) Avaliar o M1 contra a formação de metástases nos dois diferentes modelos de melanoma metastático (*Braf*^{WT} e *Braf*^{V600E});
- c) Avaliar se a ação do M1 é dependente do sistema imunológico.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 M1 e PLX4720

M1 foi manipulado e fornecido regularmente a cada experimento pela Homeoterápica Farmácia de Manipulação (Curitiba, Brasil). Sua composição é: *Chelidonium majus* (dH20), *Aconitum napellus* (dH20), *Arsenicum album* (dH18), *Asa foetida* (dH20), *Calcarea carbonica* (dH16), *Cinnamon* (dH20), *Conium maculatum* (dH17), *Echinacea purpúrea* (dH20), *Gelsemium sempervirens* (dH20), *Ipecacuanha* (dH13), *Phosphorus* (dH20), *Rhus toxicodendron* (dH17), *Silicea* (dH20), *Sulphur* (dH24) e *Thuja occidentalis* (dH19), em água. Água deionizada, fornecida também pela farmácia, foi utilizada como veículo para fins de comparação durante os experimentos. Tanto o M1 quanto a água foram sucussionados, com vigorosa agitação por trinta vezes, imediatamente antes de cada tratamento, como descrito anteriormente (OLIVEIRA *et al.*, 2011). PLX4720 foi gentilmente doado por Plexxicon (San Francisco, EUA) e dissolvido em Dimetil Sulfóxido (DMSO), que foi também utilizado como grupo veículo nos experimentos, como descrito anteriormente (KNIGHT *et al.*, 2013).

5.2 Células e Camundongos

Células de melanoma de camundongo chamadas B16F10 (American Type Culture Collection – Manassas, EUA) (GIAVAZZI; GAROFALO, 2001) foram cultivadas em meio DMEM (Lonza Bio Whittaker – Basel, Suíça) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Gibco - Grand Island, EUA) e 0,1 Molar (M) de HEPES (Lonza Bio Whittaker). Células de melanoma de camundongo chamadas SM1WT1 (KNIGHT *et al.*, 2013) e LWT1 foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado como descrito acima. Culturas de células foram mantidas em

condições livres de endotoxinas e rotineiramente testadas para a ausência de contaminação com micoplasmas pelo teste MycoAlert™ mycoplasma detection kit (Lonza) ou por marcação com DAPI seguida de análise microscópica. Camundongos machos C57BL/6 de 7 – 12 semanas e livres de patógenos específicos foram gentilmente fornecidos pelo Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (Curitiba, Brasil) e QIMR Berghofer Medical Research Institute (QIMR) (Herston, Austrália), para os experimentos realizados no Brasil e Austrália, respectivamente. Aproximadamente 700 camundongos no total foram utilizados nesse estudo. Camundongos WT, *Rag1*^{-/-}, *Rag2*^{-/-} γ c^{-/-}, *Perforina*^{-/-}, *Interferon- γ* ^{-/-} (*IFN γ* ^{-/-}) (O'SULLIVAN *et al.*, 2012) e *Cd226*^{-/-} (IGUCHI-MANAKA *et al.*, 2008) foram genotipados antes de cada experimento. Todos os procedimentos envolvendo camundongos utilizados no presente estudo foram aprovados pela comissão de ética institucional para o uso de animais em pesquisa (CEUA-UFPR, certificado N° 653) e pela comissão de ética do QIMR.

5.3 Estabelecimento do novo modelo de melanoma *Braf*^{V600E}

Células LWT1 foram obtidas da linhagem SM1WT1, oriundas de camundongos C57BL/6 transgênicos para BRAF^{V600E} (GOEL *et al.*, 2009; KNIGHT *et al.*, 2013), através de uma passagem nos pulmões de camundongos também C57BL/6 tipo selvagem (“wild type” – WT), como descrito anteriormente (NAKAMURA *et al.*, 2002). Brevemente, 5 x 10⁵ células SM1WT1 foram injetadas intravenosamente em 10 camundongos C57BL/6 tipo selvagem para desenvolvimento de metástases pulmonares. Após 30 dias, somente um dos camundongos desenvolveu metástases, e as células tumorais nos pulmões deste foram removidas e colocadas em cultura após dissociação do órgão à 37°C por 40 minutos em 1 mg/ml de colagenase tipo IV (Gibco) e 2U de DNase (Ambion - Grand Island, EUA) em PBS seguida de filtragem à 70 μ m. Essa linhagem celular foi chamada de LWT1. A presença do gene *Braf*^{V600E} nas linhagens celulares SM1WT1, LWT1 e B16F10 (controle negativo – *Braf*^{WT}) foi avaliada por genotipagem como descrito anteriormente (GOEL *et al.*, 2009).

5.4 Avaliação de susceptibilidade da LWT1 ao tratamento com PLX4720

Após obtenção da linhagem LWT1, esta foi avaliada *in vitro* e *in vivo* quanto ao tratamento com seu inibidor específico chamado PLX4720. O primeiro teste foi a determinação do Coeficiente de Eficiência (CE)₅₀ pelo ensaio de Alamar Blue (Life Technologies Inc - Carlsbad, EUA), de acordo com protocolo da bula (DAL1025) e leitura da fluorescência no equipamento Biotek Synergy H4 (Biotek – Winooski, EUA). Brevemente, 2.000 células B16F10 ou LWT1 foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após 24 horas, as culturas receberam tratamento com 0, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 ou 30 μ M de PLX4720, todos com equivalentes quantidades de DMSO (concentração final de veículo menor que 0,1% nas condições de cultura) por mais 48 horas (TSAI *et al.*, 2008).

5.5 Western Blotting

Para avaliar a susceptibilidade da LWT1 ao tratamento com o PLX4720, a inibição da via da MAPKinase também foi investigada *in vitro*. Para isso, 2.000 células LWT1 ou B16F10 foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas por 24 horas com doses de 0, 2,5, 5, e 10 μ M de PLX4720, todos com equivalentes quantidades de DMSO. Subsequentemente, as células foram ressuspendidas em tampão de “lyse” RIPA complementado com inibidores de proteases (Roche Diagnostics GmbH - Basel, Suíça), ortovanadato de sódio 1 mM (Sigma - St. Louis, EUA) e fluoreto de sódio 10 mM. As células foram então “lisadas” pela passagem em seringas de 25G por 10 vezes consecutivas e centrifugadas à 13.200 rpm à 4 °C por 20 minutos. A concentração de proteínas foi determinada por ensaio de ácido bicinônico (Pierce, Thermo Fisher Scientific - Rockford, EUA). 30 μ g de proteínas de cada amostra foram carregadas em géis de poliacrilamida com SDS e transferidas em membranas de nitrocelulose PROTRAN BA 83 (Whatman, Schleicher & Schuell, Sigma - St. Louis, EUA). Níveis de pERK foram determinados por imunomarcção com anticorpos policlonais de coelhos anti-pERK1/2Thr202/204

(D13.14.4, #4370), ERK1/2 (137F5,#4695, Cell Signaling - Beverly, EUA), e anti-c-MYC (Y69, #1472-1, Abcam - Cambridge, Inglaterra). Anticorpos conjugados com peroxidase (HRP) anti-IgG de coelhos foram utilizados como secundários (Amersham, GE Healthcare - Little Chalfont, Inglaterra). Anticorpo anti- β -actina (Sigma) foi utilizado como normalizador. Para detecção das reações, foi utilizado o sistema "Super Signal Chemiluminescent System" (Pierce, Thermo Fisher Scientific - Rockford, EUA) ou ECL-plus (Amersham).

5.6 Modelo de Metástase Experimental

A formação de metástases de melanoma nos pulmões de camundongos foi obtida como descrito anteriormente (WELCH, 1997). Resumidamente, culturas de células B16F10, SM1WT1 ou LWT1 com confluência de 80 - 90% foram desaderidas por tratamento enzimático com tripsina, ressuspendidas em meio de cultura com 10% de SFB e lavadas por 2 vezes com PBS. As células foram contadas em câmara de Neubauer e injetadas intravenosamente em 200 μ l de PBS pela veia caudal dos camundongos. A quantidade de células injetadas SM1WT1 ou LWT1 foi de 5×10^5 , enquanto de B16F10 foi de 2×10^5 por camundongo. Todos os camundongos injetados com B16F10 ou LWT1 foram eutanasiados após duas semanas da injeção, enquanto que camundongos injetados com SM1WT1 ocorreu após 30 dias. A eutanásia foi realizada por deslocamento cervical após anestesia com Ketamina (100 mg/kg) e Xilasina (20 mg/kg) ou por saturação atmosférica com CO₂. Subsequentemente, os pulmões foram removidos. Para visualizar metástases de LWT1, os pulmões foram perfundidos via traquéia com nanquim à 30% em PBS e fixados por 24 horas em fixador de Fekete. A quantidade de metástases pulmonares foi contada em microscópio estereoscópico para cada camundongo individual.

5.7 Tratamentos *in vivo*

O dia 0 corresponde ao dia da injeção de células tumorais. A LWT1 foi avaliada quanto à susceptibilidade ao tratamento com PLX4720. Para isso, PLX4720 à 20 mg/kg foi administrado do dia 1 ao 7 pela via intraperitoneal (KNIGHT *et al.*, 2013). Aproximadamente 5 camundongos por grupo foram tratados para cada experimento. Todos os tratamentos com M1 ou seu veículo (água), foram iniciados após 24 horas (dia 1) da injeção de células tumorais. Um volume de 5 ml de M1 ou veículo foram administrados por via inalatória, duas vezes a dia, do dia 1 ao 14 por 10 minutos, conforme o grupo, como descrito anteriormente (GUIMARÃES *et al.*, 2010), ou por injeções intraperitoneais diárias de 95 µl complementados com 5 µl de PBS 20x, do dia 1 ao 7. Essa segunda via de administração do M1 foi exigência do comite de ética institucional na Austrália que não permitiu a administração por inalação. Para experimentos de depleção por anticorpos monoclonais, aproximadamente 5 camundongos WT e *Rag1*^{-/-} por grupo receberam IgG controle (BioExcell – West Lebanon, EUA), anti-asialo(as)GM1 (Wako Chemicals), anti-CD4 (GK1.5) (BioExcell) ou anti-CD8β (5358) (BioExcell) na dose de 100 µg/dia por camundongo, intraperitonealmente, nos dias -1 (um dia antes de receber células tumorais), 0 e 7 relativo ao desafio tumoral.

5.8 Histologia

Pulmões com B16F10 foram removidos e fixados por 4 horas em paraformaldeído 2% (EMS – Hatfield, EUA) diluído em PBS. Após a fixação, os pulmões foram desidratados com etanol (Bond Carneiro – Curitiba, Brasil) em bateria de concentrações crescentes até chegar à 100%, seguida por diafanização com xilol (Fmaia – São Paulo, Brasil), inclusão e emblocagem em parafina (Merck –

Darmstadt, Alemanha), todos por aproximadamente 60 minutos cada. Cortes de 3 µm foram depositados sobre lâminas histológicas previamente tratadas com VECTABOND (Vector – Burlingame, EUA), conforme recomendações do fabricante. Posteriormente, as seguintes técnicas de coloração foram realizadas: Hematoxilina – Eosina, Fontana - Masson para melanina (BISHOP *et al.*, 2012), imunohistoquímica para Ki-67 (SP6) revelada pela reação com fosfatase/fast red ou imunofluorescência para β-Catenina (policlonal de coelho), P-Selectina (policlonal de cabra), Ácido Hialurônico (sonda biotinilada) (MARTINS *et al.*, 2003) e Caspase-3 ativa (policlonal de coelho), todos com revelação por biotina/estreptavidina-fluoresceína (FITC) ou texas red. Para realizar a marcação com os corantes ou anticorpos, os cortes histológicos foram inicialmente incubados em xilol para remoção de parafina e re-hidratados em concentrações decrescentes de etanol, até chegar em 70%. Subsequentemente, cortes histológicos foram lavados por 10x com PBS. Para a coloração de Hematoxilina – Eosina, o corante Hematoxilina de Harris foi adicionado por 2 minutos seguido de lavagem em água corrente por 10 minutos. Subsequentemente, os cortes foram incubados em Eosina por mais 2 minutos e lavados rapidamente em água destilada. Para a coloração de Fontana - Masson, os cortes foram incubados à 56 °C por 45 minutos em Nitrato de Prata à 5% seguido de lavagem em PBS e incubação por 2 minutos em Tiosulfato de Sódio à 2%. Subsequentemente, os cortes foram incubados por 3 minutos em Vermelho Neutro à 1% e lavados em água corrente por 5 minutos. Após a lavagem, as lâminas processadas tanto para Hematoxilina – Eosina quanto para Fontana – Masson foram novamente desidratadas em concentrações crescentes de etanol, incubadas em xilol e as lâminas permanentes montadas com Etellan (EMS). Para imunohistoquímicas, após re-hidratação e lavagem com PBS, cortes histológicos foram incubados com peróxido de hidrogênio à 3% por 10 minutos, seguido de albumina bovina 1% por 10 minutos e glicina à 0,1 M por 1 minuto. Após uma lavagem com PBS, o anticorpo anti-Ki-67 diluído 1:100 foi adicionado por 12 horas, seguida por incubação com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina e diluído 1:300. Subsequentemente, o substrato da fosfatase

alcalina chamado fast red foi incubado por 5 minutos para revelar a marcação. Núcleos celulares foram subsequentemente marcados com Hematoxilina de Harris, seguido de lavagem e desidratação com etanol, incubação com xilol e montagem da lâmina permanente com Etellan. Para imunofluorescência, após incubação com anticorpos primários, os anticorpos secundários relevantes e biotilizados foram incubados por mais 2 horas em diluição de 1:300, seguidos por incubação com estreptavidina conjugada com FITC ou Texas Red por 30 minutos na mesma diluição. Subsequentemente, núcleos celulares foram marcados com DAPI (Life Technologies Inc – Carlsbad, EUA) por 30 minutos e diluído 1:2000. Lâminas histológicas foram montadas com Fluoromount G (EMS) e armazenadas ao abrigo da luz e à 4°C até análise em microscópio.

5.9 Análises das lâminas histológicas

As análises das lâminas histológicas foram realizadas como descrito anteriormente (ANDRADE, 2011). Brevemente, as lâminas histológicas foram digitalizadas automaticamente em um microscópio Zeiss Imager.Z2 Metasystems (Zeiss – Gena, Alemanha), acoplado com sistema para varredura automatizada (Vslide, MetaSystems - Altlussheim, Alemanha). Para as colorações e imunohistoquímicas, foi utilizado a captura das imagens em campo claro. Para as imunofluorescências, lâmpadas de fluorescência com o filtro adequado para cada fluoróforo foram utilizadas. Regiões de interesse foram selecionadas para análise com o software ImageJ (NIH – Bethesda, EUA). Para as lâminas provenientes da coloração de Hematoxilina – Eosina, nódulos representativos foram selecionados por um observador e suas áreas foram quantificadas em μm^2 . Para a coloração de Fontana-Masson para melanina, regiões foram selecionadas com o aumento de 5x e a quantidade de nódulos foi avaliada para a presença de marcação para melanina, que corresponde à fração de área preta em porcentagem da imagem, utilizando o 'plugin' "Colour Deconvolution RGB" seguido por "threshold" e quantificação (ANDRADE, 2011). Um mesmo valor de "threshold" foi utilizado para todos os

grupos. A imunohistoquímica para Ki-67 foi analisada através da contagem do número de células de melanoma Ki-67⁺ e Ki-67⁻ seguida de cálculo para porcentagem relativa de células de melanoma positivas, utilizando o plugin 'Cell Counter'. Todas as imunofluorescências foram analisadas através de seleção da área da imagem ocupada somente pelo nódulo de melanoma seguida de quantificação pelo "Colour Deconvolution RGB" e quantificação da cor correspondente à marcação positiva nos nódulos. Em todas as análises histológicas, apenas um corte por pulmão de camundongo foi utilizado. Aproximadamente 10 nódulos de melanoma pulmonar por camundongo foram analisados, sendo que a média de cada camundongo foi utilizada para análise estatística entre grupos de no mínimo 3 camundongos.

5.10 Citometria de Fluxo

Para detecção de leucócitos pulmonares, camundongos injetados com B16F10 tiveram o sangue removido por lavagem com PBS através do ventrículo direito e os pulmões removidos e cortados em pequenos fragmentos. Subsequentemente, as amostras foram incubadas à 37°C por 40 minutos em 1 mg/ml de colagenase tipo IV (Gibco) e 2U de DNase (Ambion - Grand Island, EUA) em PBS. Posteriormente, o tecido homogeneizado foi filtrado à 70 µm e lavado com PBS, como descrito anteriormente (CHOW *et al.*, 2012). Para a imunomarcagem, suspensões celulares obtidas dos pulmões ou de culturas de células tumorais foram incubadas por 10 minutos com anti-CD16/CD32 (2.4G2) (diluição 1:100) à 4°C, e então marcados para: CD11c (N418), F4/80 (BM8), B220 (RA3-6B2), NK1.1 (PK136), CD11b (M1/70), CD155 (4423), Rae-1 (186107), H2K^b (AF6-88.5), H2D^b (28-14-8), Gr-1 (RB6-8C5), CD3ε (145-2C11), CD4 (RM4-5), CD8a (53.6.7) e AT1R (policlonal de coelho) (Biolegend – San Diego, EUA), todos diluídos 1:200 e incubados por 60 minutos cada. Células não viáveis foram excluídas com 7-AAD (1 µl por amostra). Amostras foram adquiridas em citômetro LSRIV (BD Biosciences – San Jose, EUA) com posterior análise no software FlowJo (Tree Star – Ashland,

EUA). Para avaliação do fluido intersticial dos pulmões, pulmões perfundidos com PBS foram incubados por 2 horas em PBS à 37°C, como descrito previamente (CHOW *et al.*, 2012). Subsequentemente, a solução foi recuperada e analisada para a presença das seguintes citocinas, utilizando Cytometric Bead Assay (CBA) (BD Biosciences) por citometria de fluxo em um FACScalibur (BD Biosciences): Interleucina-12 subunidade p70 (IL-12p70), Interferon- γ (IFN- γ), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), “Monocyte Chemoattracting Protein-1” (MCP-1) e Fator de Necrose Tumoral (TNF), utilizando as diluições conforme recomendações do fabricante.

5.11 Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com teste t de Student não pareado ou Mann Whitney U (VAUX; FIDLER; CUMMING, 2012), conforme indicado para cada figura. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. O teste t de Student foi utilizado quando os dados possuíam uma aparente distribuição normal. O teste Mann Whitney U foi utilizado quando a variância da amostra estava aparentemente grande, sugerindo uma distribuição não paramétrica. Os gráficos de barra ou de dispersão foram construídos com os valores de média mais ou menos os de desvio padrão. Nos gráficos de dispersão, cada símbolo representa um camundongo individual. Dados são representativos de ao menos dois experimentos independentes. “Outliers” foram identificados pelo teste de Grubbs e removidos quando $p < 0,05$, antes dos testes estatísticos para comparação entre amostras. Tanto os testes estatísticos quanto a montagem dos gráficos foram todos realizados com o software Prism 6 (GraphPad – La Jolla, EUA).

6. RESULTADOS

6.1 Estabelecimento dos modelos de melanoma metastático em camundongos

No modelo de metástase experimental, a quantidade de tumores nos pulmões está correlacionada com a malignidade de uma linhagem celular ou a eficiência de um tratamento anti-neoplásico (WELCH, 1997). O primeiro passo para testar uma droga anti-neoplásica é escolher o modelo adequado e realizar a padronização. Como o presente estudo visou também avaliar a ação do M1 nas duas formas de melanoma, a mutante no gene *Braf* (*Braf*^{V600E}) e a não mutante (*Braf*^{wt}), utilizou-se uma linhagem previamente descrita de melanoma BRAF^{V600E}, chamada SM1WT1 (GOEL *et al.*, 2009; KNIGHT *et al.*, 2013). Essa linhagem celular foi inicialmente utilizada para gerar uma linhagem metastática através da passagem intravenosa para os pulmões de camundongos C57BL/6 (FIGURA 3A), como descrito em materiais e métodos. Essa linhagem metastática obtida foi chamada de LWT1 e foi observado que induziu formação consistente e dose-dependente de metástases pulmonares, enquanto que a linhagem original, SM1WT1, não produziu a quantidade necessária (FIGURA 3B – C).

Após obtenção da linhagem metastática, o próximo passo foi confirmar a dependência da proliferação celular por BRAF^{V600E} através de sua inibição *in vitro* por PLX4720 (um inibidor de BRAF^{V600E}, como discutido anteriormente). Esse ensaio revelou que a linhagem LWT1 possui um moderado nível de resistência ao tratamento (CE₅₀ = 15,5 µM), enquanto que uma linhagem não mutante para *Braf* (BRAF^{WT}), chamada B16F10 e utilizada como controle, praticamente não foi inibida (CE₅₀ = 69,2 µM) (FIGURA 3D). Para confirmar que a droga estava atuando através da inibição de BRAF^{V600E} e consequente da via da MAPKinase, os níveis de pERK foram avaliados em ambas as linhagens celulares. Apesar de pERK estar constitutivamente ativa na LWT1, o tratamento com PLX4720 reduziu visualmente os

níveis de pERK e de um de seus alvos chamado c-MYC, enquanto que a B16F10 permaneceu praticamente inalterada (FIGURA 3E).

O próximo passo foi então verificar a formação de metástases de LWT1 e B16F10 e a sensibilidade ao tratamento *in vivo* com PLX4720. Interessantemente, o tratamento reduziu a formação de metástases de LWT1 em aproximadamente 50% (FIGURA 3F), enquanto que as de B16F10 não foram alteradas (FIGURA 3G). Esses resultados, portanto, validam ambos os modelos de melanoma BRAF^{WT} e BRAF^{V600E}, que são B16F10 e LWT1 respectivamente, para futuros testes com M1.

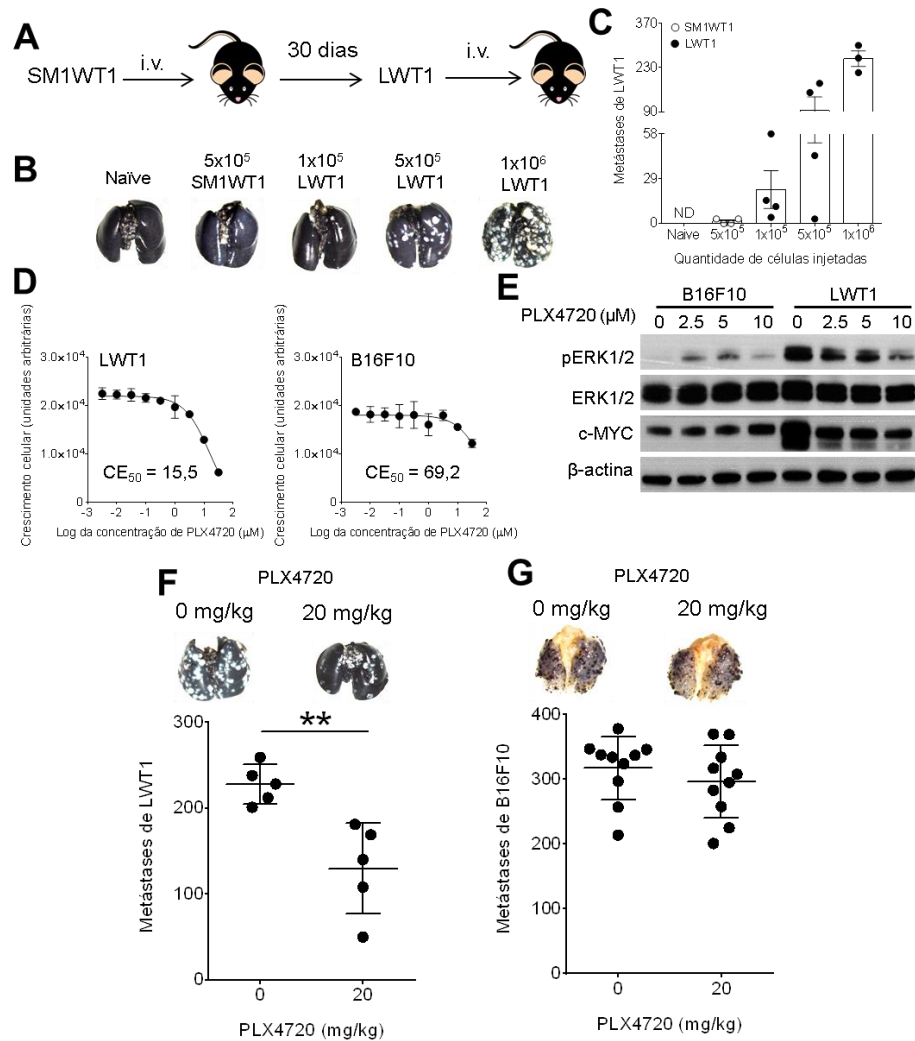


FIGURA 3 - ESTABELECIMENTO DOS MODELOS DE MELANOMA METÁSTÁTICO EM CAMUNDONGOS

Camundongos C57BL/6 foram injetados com diferentes linhagens de células de melanoma. (A) 5×10^5 células SM1WT1 foram injetadas intravenosamente (iv) e camundongos eutanasiados após 30 dias; células LWT1 foram então obtidas dos pulmões, postas em cultura e subsequentemente injetadas iv para avaliar a formação de metástases pulmonares, conforme descrito em Mateirais e Metodos. (B - C) Determinação da quantidade de células necessárias para formar metástases. (D) Avaliação *in vitro* do tratamento com PLX4720 das linhagens indicadas. (E) Análise do mecanismo de ação do PLX4720 por Western Blotting. (F) 5×10^5 LWT1 foram injetadas iv em camundongos e estes tratados com PLX4720 do dia 1 – 7. (G) 2×10^5 B16F10 foram injetadas iv e camundongos tratados do dia 1 – 7. Após duas semanas do desafio tumoral, camundongos foram eutanasiados e pulmões removidos. A quantidade de metástases foi contada para cada camundongo individual; nos gráficos, cada símbolo representa um camundongo. Gráficos construídos com média \pm desvio padrão. Dados representativos de ao menos dois experimentos independentes. Estatística realizada por testes bicaudais t de Student. $**p < 0,01$.

6.2 O tratamento com M1 reduz a quantidade de metástases pulmonares de melanoma

Para investigar se o medicamento dinamizado chamado M1 possui algum efeito contra o melanoma de camundongos, os dois modelos experimentais foram utilizados: B16F10 e LWT1. Quando inoculadas na veia caudal de camundongos, ambas as linhagens celulares desenvolvem metástases pulmonares, conforme descrito anteriormente. Interessantemente, o tratamento com M1 reduziu em aproximadamente 40% a formação de metástases pulmonares de B16F10 em relação ao tratamento com água (FIGURA 4A), confirmando resultados anteriores (GUIMARÃES, 2009). Esse resultado foi independente da via de administração. Quanto à LWT1, camundongos tratados com M1 possuem aproximadamente duas vezes menos metástases (FIGURA 4B). Esses dados revelam que o tratamento com M1 é eficiente contra o melanoma metastático pulmonar, independentemente de mutação de BRAF.

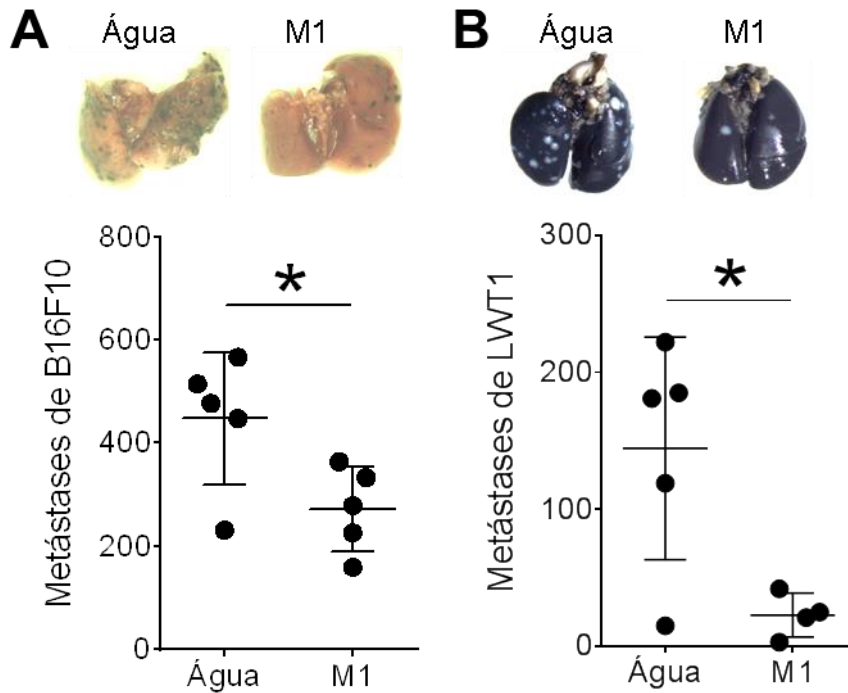


FIGURA 4 - A FORMAÇÃO DE METÁSTASES DE MELANOMA É INIBIDA POR TRATAMENTO COM M1

Camundongos C57BL/6 foram injetados com 5×10^5 células B16F10 (A) ou LWT1 (B) e tratados com M1 ou água, como descrito em materiais e métodos. Após duas semanas, camundongos foram eutanasiados e pulmões removidos. A quantidade de metástases foi contada em cada pulmão. Gráficos construídos com valores de média \pm desvio padrão; cada símbolo representa um camundongo. Dados representativos de três experimentos independentes. Estatísticas realizadas por testes t de Student (A) e Mann-Whitney (B). Um outlier identificado e removido pelo teste de Grubbs em (B) no grupo M1. * $p \leq 0,05$.

6.3 Histologia revela menores tamanhos e quantidade de nódulos pulmonares

Uma vez encontrado que o tratamento com M1 leva a menores quantidades de metástases pulmonares de melanoma nos camundongos, o próximo passo foi realizar análises histológicas dos pulmões para obter maiores informações. Para essa análise, somente pulmões com B16F10 foram processados, uma vez que pulmões com LWT1 estavam perfundidos com nanquim, impossibilitando o uso para

outras análises. Para validar a análise histológica, inicialmente as lâminas de pulmões com B16F10 foram processadas para a coloração de Fontana - Masson, a qual enfatiza a visualização de melanina das células de melanoma pela marcação com nitrato de prata, pois produz uma coloração próxima ao preto que pode ser analisada pelo software ImageJ (FIGURA 5A). Essa técnica confirmou o dado anterior: pulmões de camundongos tratados com M1 têm menores quantidades de melanoma (FIGURA 5B). Adicionalmente, a análise das lâminas com coloração de Hematoxilina – Eosina revelou que o tamanho médio dos nódulos de melanoma também estava significativamente reduzido em camundongos tratados com M1 (FIGURA 6A). Uma vez que o tamanho dos nódulos é logicamente determinado pela quantidade de proliferação celular, esta foi marcada com o uso de anticorpo anti-Ki-67. Essa técnica revelou que melanoma de camundongos tratados com M1 possuem aproximadamente 50% menos proliferação do que animais tratados com água (FIGURA 6B). Esses dados, portanto, além de confirmar que o M1 reduz a formação de metástases pulmonares de B16F10 em camundongos, também revelam que o tamanho tumoral é reduzido devido à redução da proliferação celular.

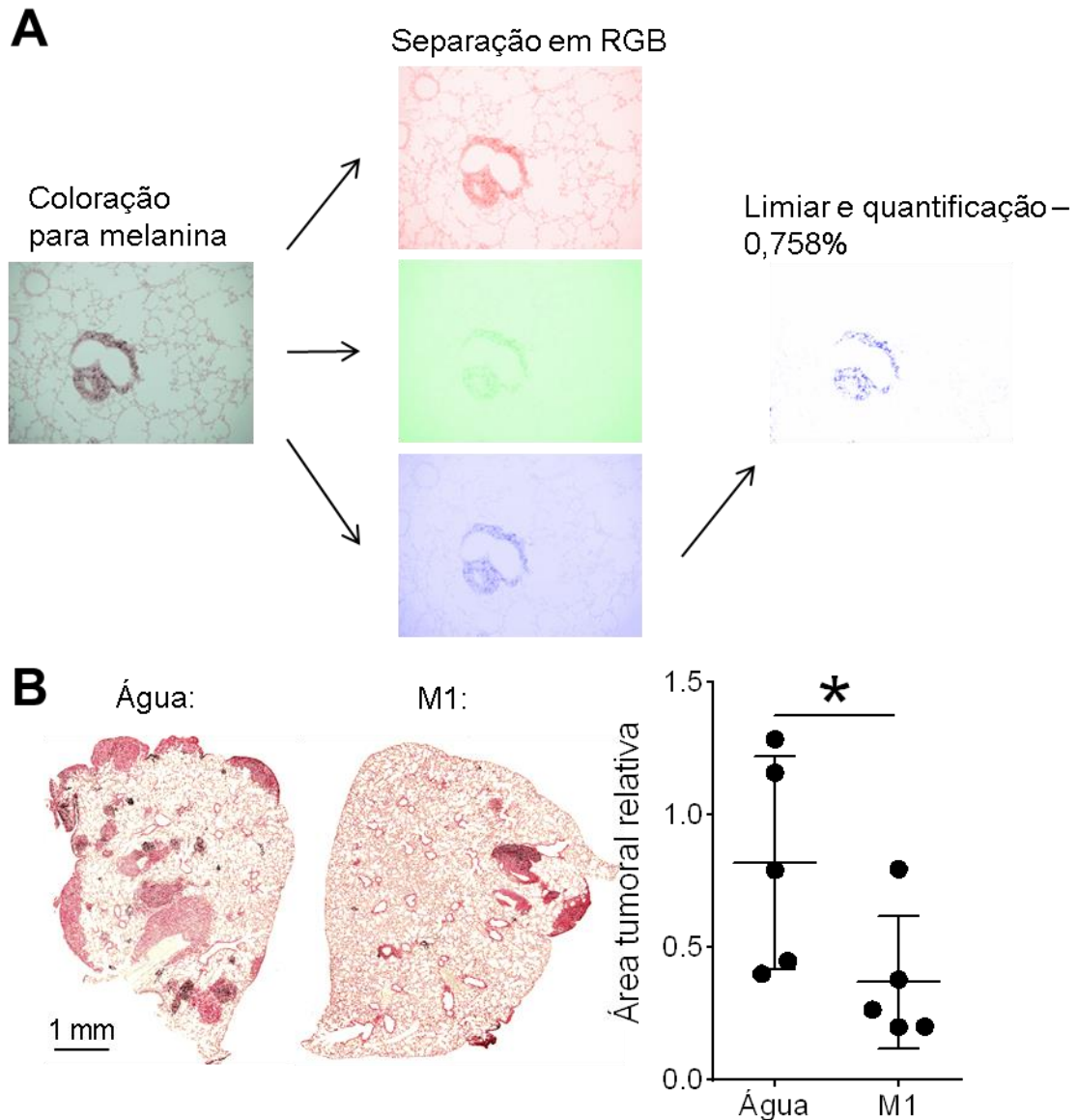


FIGURA 5 - M1 REDUZ A METÁSTASE PULMONAR PELO MELANOMA

Camundongos C57BL/6 foram injetados com 5×10^5 células B16F10 e tratados com M-1 ou água, como descrito em Materiais e Métodos. Após 14 dias de tratamento, os camundongos foram eutanasiados, os pulmões foram removidos e processados para histologia com coloração de Fontana – Masson, para evidenciar a melanina, cuja coloração destaca núcleos celulares em vermelho e melanina em marrom. (A) Ilustração do método para análise das micrografias pelo software ImageJ para determinação da porcentagem da área pulmonar ocupada pelo melanoma. RGB = 'Red', 'Green' e 'Blue'. (B) Comparação entre os grupos água e M1, com um corte analisado por pulmão. Gráfico construído com média \pm desvio padrão de cinco camundongos, cada um com aproximadamente dez micrografias analisadas. Dados representativos de dois experimentos independentes. Estatística realizada por testes Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$.

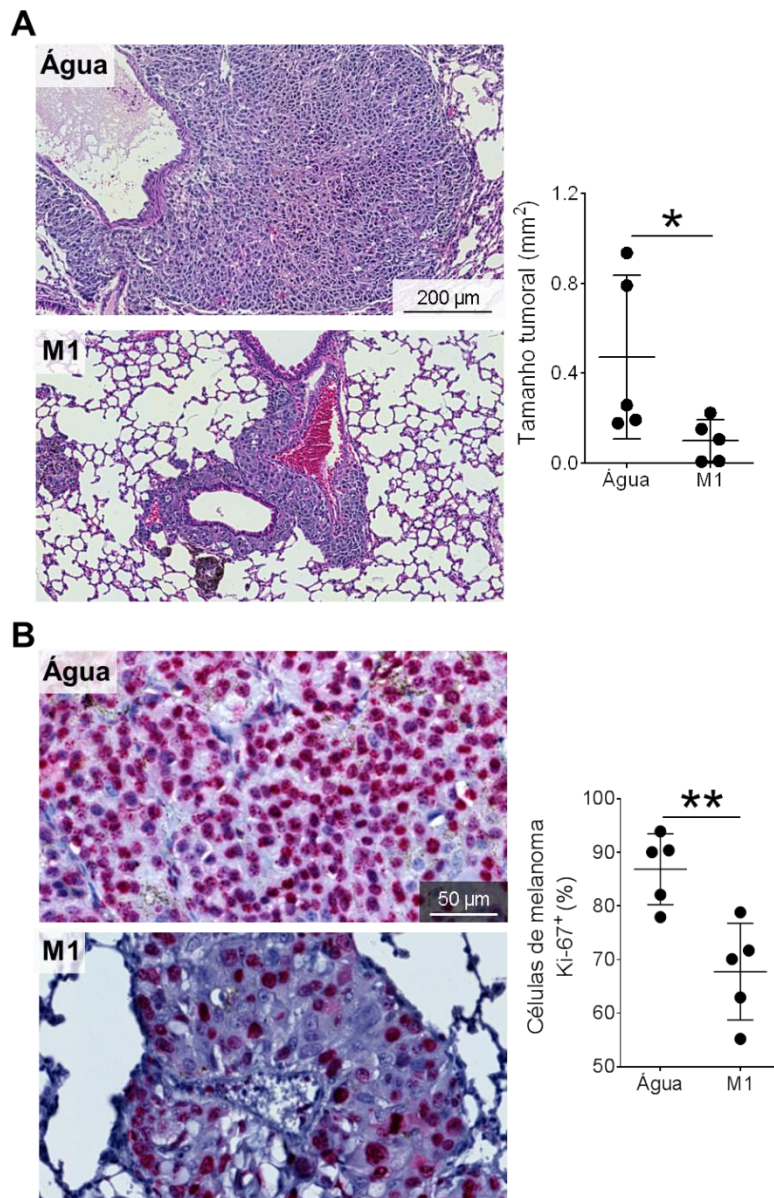


FIGURA 6 - M1 REDUZ O TAMANHO E PROLIFERAÇÃO DOS NÓDULOS TUMORAIS

Camundongos C57BL/6 foram injetados com 5×10^5 células B16F10 e tratados com M-1 ou água por 14 dias. Ao final do período de tratamento, os camundongos foram eutanasiados, os pulmões foram removidos e processados para histologia com um corte para cada pulmão. (A) Coloração de Hematoxilina-Eosina, que destaca citoplasma celular em rosa e núcleos celulares em azul. (B) Imunohistoquímica para Ki-67 com contracoloração de Hematoxilina, que destaca núcleos de células proliferativas (Ki-67⁺) em lilás e núcleos totais em azul. Gráficos construídos com média \pm desvio padrão de cinco camundongos cada. Dados representativos de dois experimentos independentes. Estatística realizada por testes bicaudais t de Student (B) e Mann-Whitney (A). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

6.4 O tratamento com M1 não aumenta a resposta imunológica contra o melanoma

Foi relatado em um estudo anterior que M1 atuava no sistema imunológico de camundongos saudáveis, aumentando a frequência de linfócitos T CD8⁺ nos linfonodos mesentéricos (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Dessa maneira foi atrativo especular no presente estudo que a ação do M1 contra o melanoma estaria relacionado com maior resposta imunológica nos pulmões, que poderia promover o controle do melanoma. Portanto foi realizado imunofenotipagem por citometria de fluxo de células do sistema imunológico presentes nos pulmões de camundongos com melanoma B16F10 e tratados com M1 ou água. Apesar de ser possível identificar várias populações de células com o uso de marcadores específicos (descrito em Materiais e Métodos), o tratamento com M1 não alterou as quantidades de macrófagos, células dendríticas, células NK, células T CD8⁺, células T CD4⁺ e células B (FIGURA 7A). Também, o perfil de citocinas presente no microambiente pulmonar poderia sugerir uma resposta imunológica diferenciada. Entretanto, animais tratados com M1 ou água não possuem alteração significativa na quantidade de citocinas inflamatórias (FIGURA 7B). Apesar dos níveis de IL-10 estarem significativamente aumentados no grupo M1, os níveis detectados são muito baixos para serem considerados biologicamente relevantes e estão muito próximos do limite de detecção do experimento (discutido em maiores detalhes em Discussão). Para excluir definitivamente a possibilidade do papel de linfócitos no tratamento com M1, camundongos deficientes para linfócitos T e B totais (*Rag1*^{-/-}) foram injetados com melanoma LWT1 e tratados com anti-asGM1 para depletar adicionalmente células NK, ou tratados apenas com IgG controle. Interessantemente, apesar da ausência dessas células, a ação do M1 contra o melanoma ainda foi detectada (FIGURA 8). Esses dados revelam que os efeitos anti-melanoma do M1 não estão associados à resposta anti-tumoral mediada por linfócitos da imunidade inata e adaptativa.

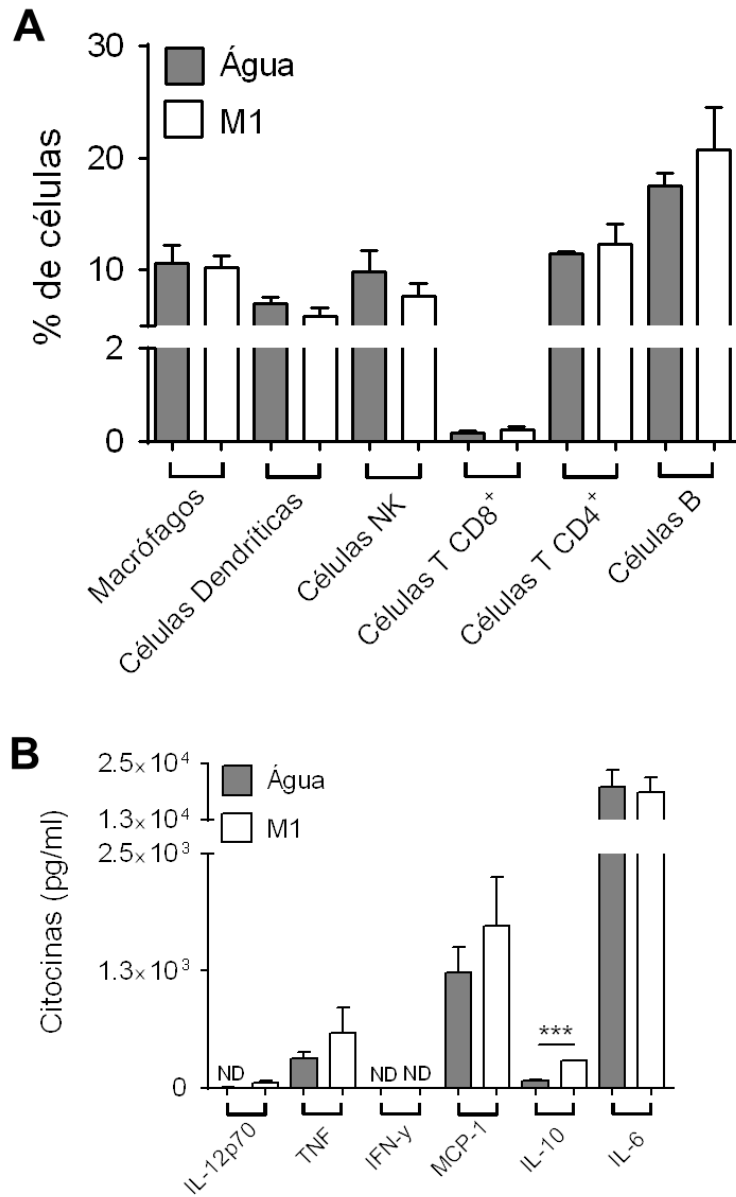


FIGURA 7 - O SISTEMA IMUNOLÓGICO NÃO ESTÁ ALTERADO EM CAMUNDONGOS COM MELANOMA B16F10 E TRATADOS COM M1

Camundongos foram injetados com 5×10^5 células B16F10 e tratados com M1 ou água. Após o período de tratamento, os camundongos foram eutanasiados, os pulmões foram perfundidos com PBS, removidos e processados para citometria de fluxo, conforme descrito em Materiais e Métodos. (A) Células do sistema imunológico foram marcadas com diferentes anticorpos, como descrito em Materiais e Métodos. (B) O conteúdo de citocinas no líquido intersticial dos pulmões foi determinado por CBA e citometria de fluxo. ND, não detectado. Gráficos construídos com valores de média \pm desvio padrão de cinco camundongos por grupo (A) ou ao menos 3 camundongos por grupo (B), de 2 experimentos independentes. Estatística realizada por teste bicaudal não pareado t de Student. *** $p \leq 0.001$.

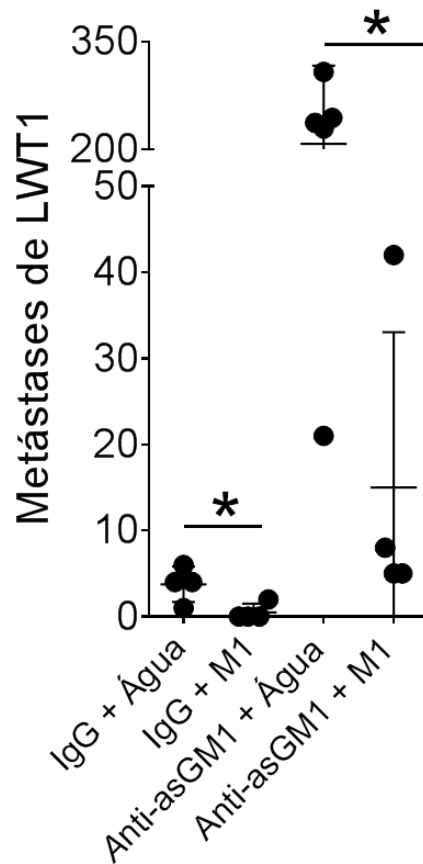


FIGURA 8 - M1 NÃO PRECISA DE IMUNIDADE ADAPTATIVA E INATA MEDIADA POR LINFÓCITOS PARA TER EFEITOS CONTRA MELANOMA LWT1

Camundongos *Rag1*^{-/-} foram injetados com 5×10^5 LWT1 e tratados com M1 ou água. Após o período de tratamento os camundongos foram eutanasiados, os pulmões foram perfundidos com nanquim e fixados com fixador Fekete. Camundongos *Rag1*^{-/-} foram adicionalmente tratados com 100µg de IgG controle ou Anti-asGM1, para depletar células NK, nos dias -1, 0 e 7 relativo à injeção de LWT1. Gráficos construídos com valores de média \pm desvio padrão, onde cada símbolo representa um camundongo. Estatística realizada por teste bicaudal não pareado t de Student. Um outlier removido no grupo Anti-asGM1 + M-1. * $p \leq 0.05$.

6.5 AT1R em células CD11b⁺ Gr-1^{baixo} é modulado por M1

Estudos anteriores revelaram a importância de uma população de células com morfologia nuclear semelhante a neutrófilos, mas com ação imunossupressora no ambiente do melanoma pela secreção de diversas citocinas que inibem a ação do sistema imunológico. Elas são chamadas de “Myeloid-derived Suppressor Cells” (MDSC) e podem ser caracterizadas por citometria de fluxo pelo uso dos marcadores CD11b e Gr-1, sendo elas positivas para ambos (DOLCETTI *et al.*, 2010; YOUN *et al.*, 2008). MDSC podem ser encontradas nos pulmões de camundongos com melanoma e diferenciadas em três populações CD11b⁺, com base na expressão de Gr-1: Gr-1^{baixo}, Gr-1^{intermediário (int)} e Gr-1^{alto} (CHOW *et al.*, 2012). No presente estudo, as três populações também foram identificadas por citometria de fluxo. Interessantemente, pulmões de camundongos com melanoma e tratados com M1 possuem menor frequência das células CD11b⁺ Gr-1^{baixo}, enquanto que as demais não foram modificadas (FIGURA 9A). Esses dados revelam que a ação do M1 está relacionada ao controle de uma das populações de células MDSC nos pulmões.

Uma vez que o perfil de citocinas não estava significativamente alterado em camundongos tratados com M1, foi levantada a questão de qual seria então o papel das células CD11b⁺ Gr-1^{baixo} para a ação do M1 no controle de metástases de melanoma que não fosse a produção de citocinas imunossupressoras. Foi relatado anteriormente que um receptor para Angiotensina II, chamado “Angiotensin II Type 1 Receptor” (AT1R), é expresso por macrófagos associados a tumores (EGAMI *et al.*, 2003). O bloqueio desse receptor pelo antagonista Losartana reduz o crescimento tumoral (OTAKE *et al.*, 2010). Sendo assim, no presente estudo a expressão de AT1R foi investigada por citometria de fluxo nas diferentes populações de células encontradas nos pulmões de camundongos com melanoma. AT1R não foi encontrado em macrófagos, células dendríticas, células NK, células T CD8⁺, células T CD4⁺ e células B (FIGURA 10). Por outro lado, surpreendentemente, células

MDSC possuem significativa expressão de AT1R, e nos animais tratados com M1 as células $CD11b^+ Gr-1^{baixo}$ possuem menor expressão de AT1R (FIGURA 9B). Aqui é a primeira vez que é relatado que esse receptor é expresso por células MDSC, e esses dados sugerem que AT1R em células $CD11b^+ Gr-1^{baixo}$ é modulado pelo M1.

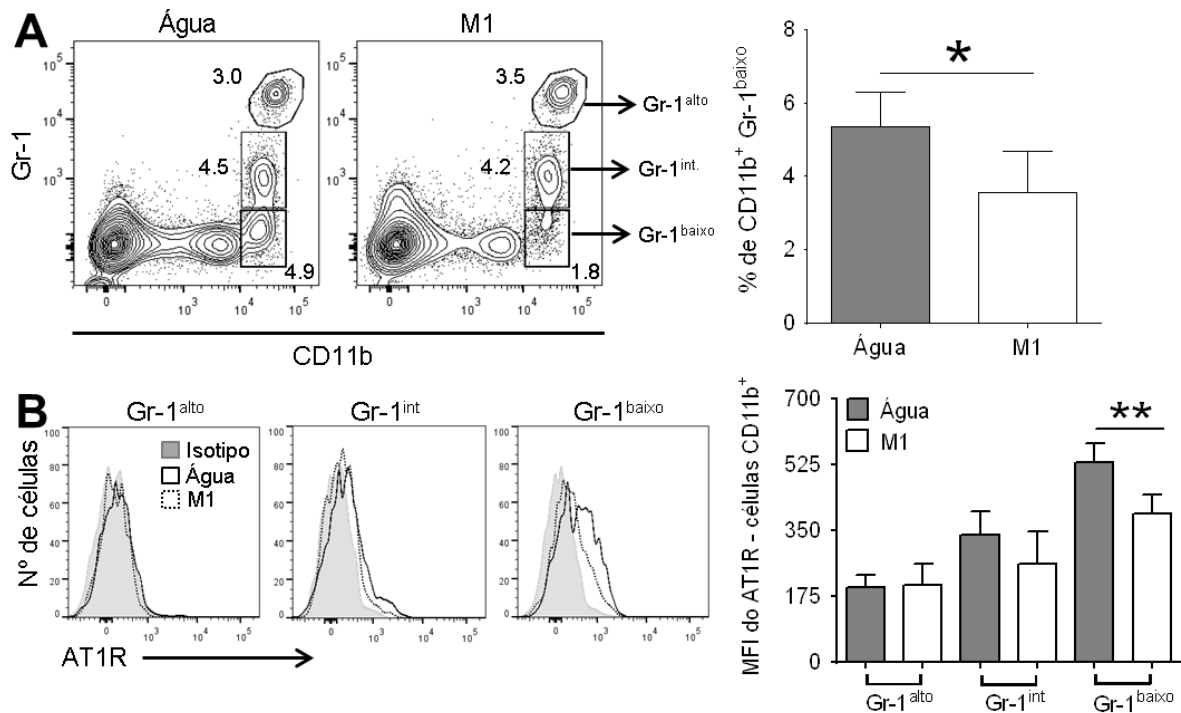


FIGURA 9 - REDUÇÃO DE CÉLULAS $CD11b^+ Gr-1^{BAIXO} AT1R^+$ ESTÁ ASSOCIADA AO M1 E MELANOMA

5 camundongos por grupo foram injetados com 5×10^5 células B16F10 e tratados com M1 ou água como descrito em Materiais e Métodos. Após o período de tratamento, os camundongos foram eutanasiados, os pulmões foram perfundidos com PBS, removidos e processados para citometria de fluxo. (A) Diferentes populações de células identificadas pela marcação CD11b/Gr-1. (B) Expressão de AT1R nas células CD11b⁺ Gr-1⁺. Dados representativos de dois experimentos independentes. Gráficos construídos com valores de média \pm desvio padrão. Estatística realizada por teste bicaudal não pareado t de Student. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

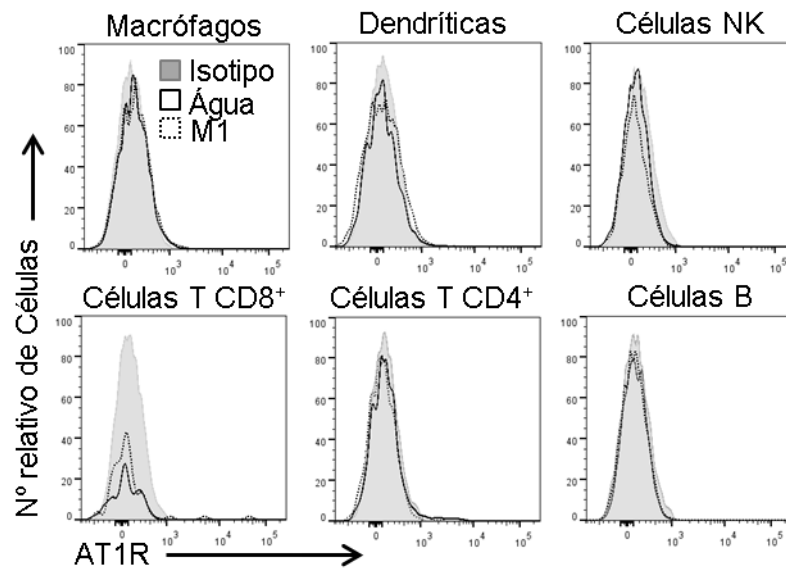


FIGURA 10 - AT1R NÃO É EXPRESSO PELAS DEMAIS POPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS PULMONARES

5 camundongos por grupo foram injetados com 5×10^5 células B16F10 e tratados com M1 ou água como descrito em Materiais e Métodos. Após o período de tratamento, os camundongos foram eutanasiados, os pulmões foram perfundidos com PBS, removidos e processados para citometria de fluxo. Células do sistema imunológico foram marcadas com diferentes anticorpos e para AT1R ou isotipo relevante.

6.6 Tratamento com M1 reduz a formação de vasos tumorais e gera apoptose de células de melanoma

Foi relatado anteriormente que a via de sinalização do AT1R expresso em macrófagos associados a tumores leva à expressão de VEGF, um fator angiogênico (EGAMI *et al.*, 2003). Por outro lado, o bloqueio de AT1R pelo antagonista farmacológico chamado Losartana leva à menor angiogênese tumoral (OTAKE *et al.*, 2010). Isso sugere que a menor frequência de células $CD11b^+ Gr-1^{baixo} AT1R^+$ em conjunto com menor expressão de AT1R por M1, ambos encontrados no presente estudo, poderiam levar à uma menor angiogênese tumoral. Para testar essa hipótese, lâminas histológicas dos pulmões de camundongos com melanoma e tratados com M1 ou água foram processadas para imunomarcagem. O marcador de vaso utilizado foi P-Selectina, que é expresso exclusivamente por plaquetas e

células endoteliais vasculares no ambiente pulmonar, mas não por células de melanoma (LUDWIG, 2004; STEVENS, 2011). Interessantemente, no presente estudo foi possível encontrar algumas células B16F10 marcadas para P-Selectina (FIGURA 11A), sugerindo a presença de plaquetas aderidas às células, como descrito anteriormente (NIESWANDT *et al.*, 1999). Por outro lado, várias outras células de menores tamanhos e morfologia semelhantes à de células endoteliais vasculares estavam marcadas para P-Selectina (FIGURA 11B), o que sugere a presença de capilares sanguíneos intratumorais. A quantificação dessas células pelo ImageJ revelou que o M1 leva à uma redução significativa de células P-Selectina⁺ em melanoma (FIGURA 11D). Uma vez que tumores dependem dos capilares sanguíneos para obterem nutrientes e que uma angiogênese prejudicada pode levar à morte de células tumorais (MARNEROS, 2009), o próximo passo foi avaliar a marcação para Caspase-3 ativa (FIGURA 11C), um marcador de apoptose (SNIGDHA *et al.*, 2012). Interessantemente, as metástases de melanoma presentes em camundongos tratados com M1 possuem grande quantidade de células tumorais em apoptose (FIGURA 11E). Esses dados sugerem, portanto, que metástases de melanoma em camundongos tratados com M1 possuem menor angiogênese tumoral e consequente aumento de apoptose intra-tumoral. Adicionalmente, esses dados revelam uma associação entre menor expressão de AT1R em MDSC e reduzida angiogênese tumoral, ambos como consequência do tratamento com M1.

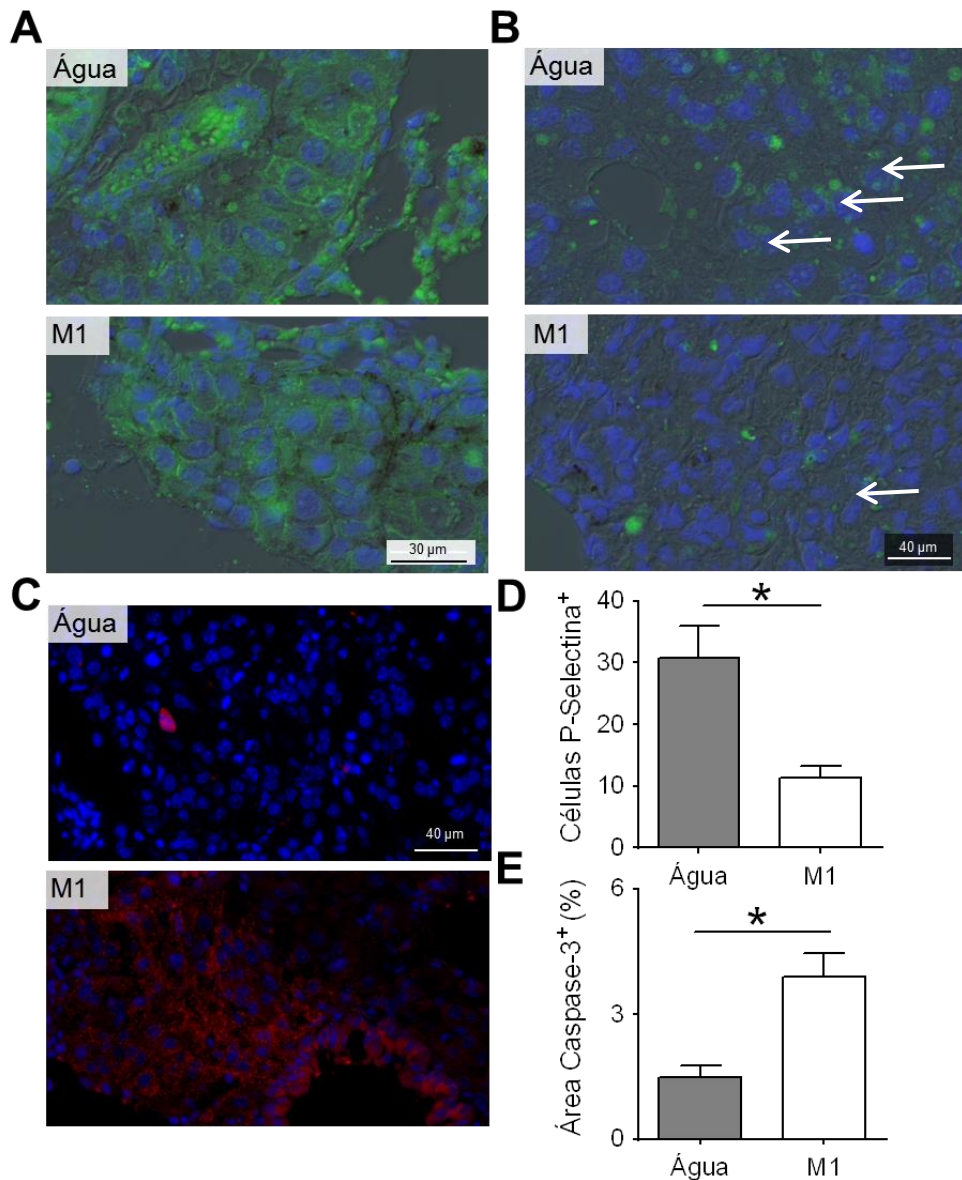


FIGURA 11 - M1 REDUZ A ANGIOGÊNESE TUMORAL E GERA APOPTOSE EM METÁSTASES DE MELANOMA

Camundongos C57BL/6 foram injetados com 5×10^5 células B16F10 e tratados com M1 ou água, como descrito em Materiais e Métodos. Após 14 dias de tratamento, os camundongos foram eutanasiados, os pulmões foram removidos e processados para histologia. (A - B) Imunofluorescência para P-Selectina (verde) identifica plaquetas em células de melanoma (A) e células endoteliais intratumorais (setas) (B). (C) Imunofluorescência para Caspase-3 ativa, identificando células em apoptose. (D) Quantificação das células endoteliais intratumorais P-Selectina⁺. (E) Quantificação da área em apoptose Caspase-3⁺. Gráficos construídos com média \pm desvio padrão de três camundongos por grupo. Estatística realizada por testes bicaudais t de Student. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

6.7 Análise de marcadores relacionados à malignidade do melanoma

Uma vez que as análises feitas até então revelaram que M1 exerce controle do crescimento de metástases pulmonares de melanoma em camundongos, o próximo passo foi avaliar a presença por imunofluorescência de diferentes proteínas associadas à malignidade tumoral. Por exemplo: uma grande expressão induzida experimentalmente de β -Catenina em células de melanoma foi associada à menores taxas de proliferação celular e portanto menores tamanhos de tumores (CHIEN *et al.*, 2009). Uma vez encontrado no presente estudo que as metástases de melanoma de camundongos tratados com M1 possuíam menores tamanhos e taxas de proliferação (evidenciada por Ki-67), a expressão de β -Catenina foi investigada. Interessantemente, tumores de animais tratados com M1 possuem maiores quantidades de β -Catenina (FIGURA 12).

Também, foi relatado que a interação de moléculas de matriz extracelular com receptores em células de melanoma desencadeiam diferentes cascatas de sinalizações relacionadas com sobrevivência e proliferação celular (SANDERSON *et al.*, 2005). O Ácido Hialurônico é um glicosaminoglicano presente no microambiente tumoral do melanoma e a interação com seu receptor chamado CD44, presente em células de melanoma, foi associado ao potencial metastático da B16F10 (MUMMERT *et al.*, 2003). No presente estudo, tanto o Ácido Hialurônico quanto o CD44 foram investigados por imunofluorescência e a histologia revelou que tumores de melanoma pulmonar em camundongos tratados com M1 possuem menores quantidades de Ácido Hialurônico (FIGURA 13A), mas quantidades equivalentes de CD44 (FIGURA 13B).

Em conjunto, esses dados sugerem que as metástases de melanoma em camundongos tratados com M1 possuem um fenótipo associado com reduzida malignidade tumoral.

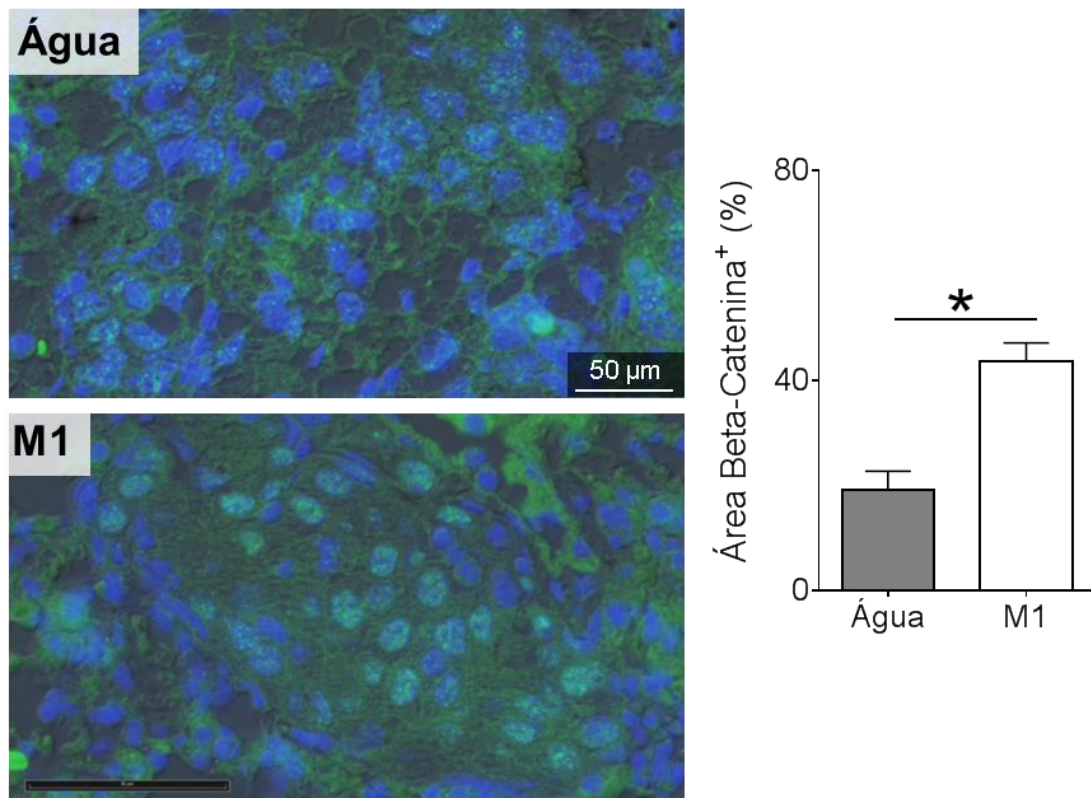


FIGURA 12 - TRATAMENTO COM M1 AUMENTA β -CATENINA NO MELANOMA PULMONAR

Camundongos C57BL/6 foram injetados com 5×10^5 células B16F10 e tratados com M1 ou água, como descrito em Materiais e Métodos. Após período de tratamento, os camundongos foram eutanasiados e os pulmões foram removidos. A expressão de β -Catenina (verde) foi investigada por imunofluorescência seguida de análise pelo ImageJ. Gráfico construído com média \pm desvio padrão. Dados representativos de dois experimentos independentes. Estatística realizada por teste bicaudal t de Student. * $p \leq 0,05$.

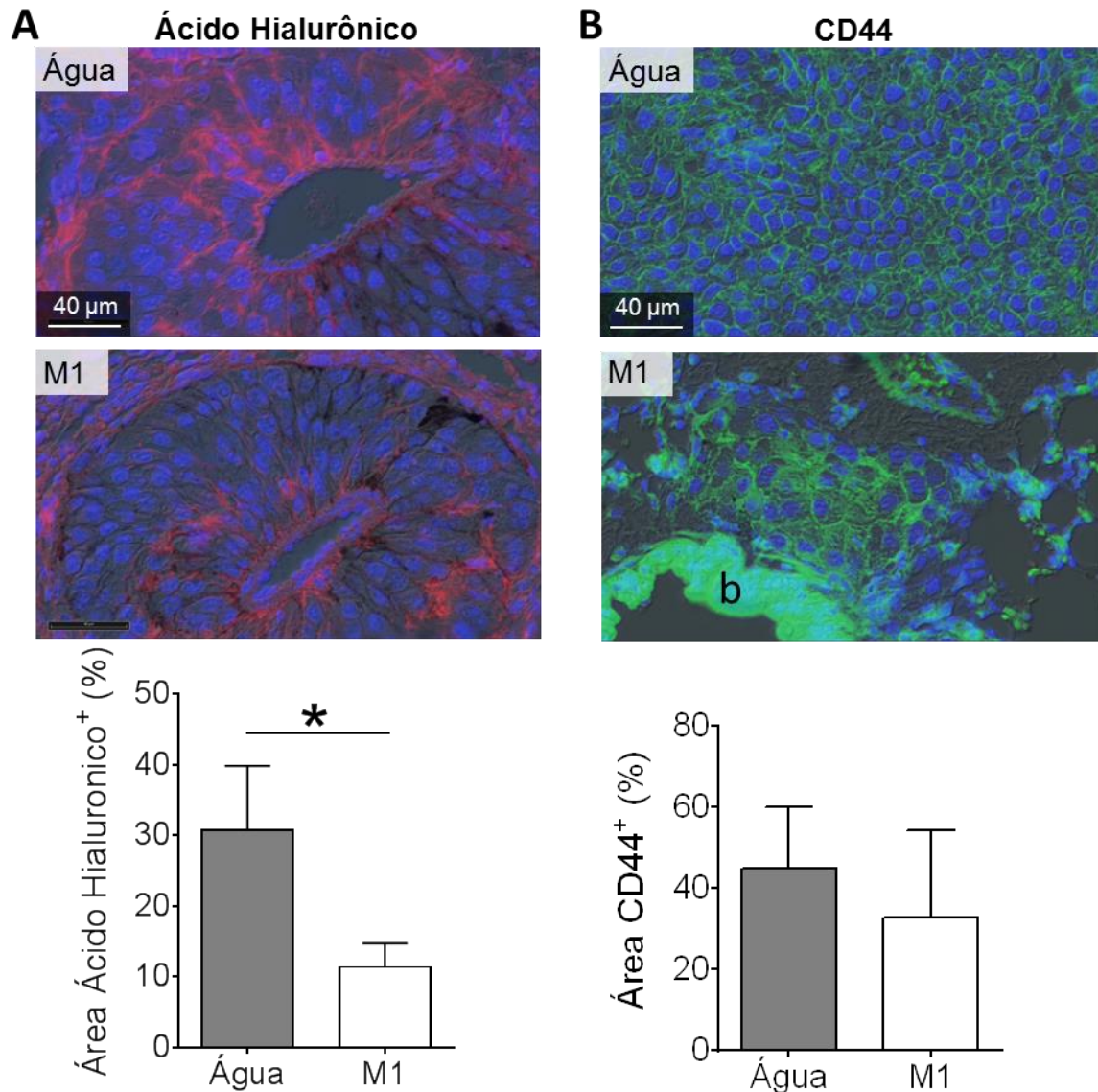


FIGURA 13 - ANÁLISE DE MARCADORES DE PROGNÓSTICO EM METÁSTASES DE MELANOMA

Camundongos C57BL/6 foram injetados com 5×10^5 células B16F10 e tratados com M-1 ou água, como descrito em Materiais e Métodos. Após o período de tratamento, os camundongos foram eutanasiados e os pulmões foram emovidos. (A-B) A expressão de diferentes proteínas intratumorais foi analisada por imunofluorescência e análise por ImageJ. (A) Ácido Hialurônico (vermelho). (B) CD44 (verde). A letra "b" na micrografia de imunofluorescência para CD44 indica um bronquíolo altamente marcado para CD44. Gráficos construídos com média \pm desvio padrão. Dados representativos de pelo menos dois experimentos independentes com três camundongos por grupo. Estatística realizada por testes bicaudais t de Student. * $p \leq 0,05$.

6.8 Metástases pulmonares de LWT1 não são controladas pela imunidade adaptativa

Uma vez que o modelo de melanoma metastático da linhagem LWT1 foi desenvolvido especialmente para este trabalho, sendo portanto uma linhagem nova e ainda não conhecida apropriadamente, o controle mediado pelo sistema imunológico para inibição da formação de metástase foi avaliado. Essa análise é de suma importância uma vez que os motivos que levaram à investigação do M1 como um agente anti-melanoma é fundamentado em seus efeitos de potencialização em linfócitos T CD8⁺, descritos anteriormente (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Portanto maiores informações sobre a LWT1 foram necessárias. Por outro lado, a linhagem B16F10 já está bem descrita na literatura (CHOW *et al.*, 2012; FIDLER, 1975; MARTÍNEZ CONESA *et al.*, 2009). O primeiro passo para essa investigação foi verificar a formação de metástases de LWT1 em camundongos imunossuprimidos *Rag1*^{-/-} e *Rag2*^{-/-}*γc*^{-/-}, que não possuem linfócitos T e B, ou não possuem T, B e células NK, respectivamente (O'SULLIVAN *et al.*, 2012). Curiosamente, a formação de metástases de LWT1 em pulmões de camundongos *Rag1*^{-/-} foi significativamente inibida, enquanto que aumentada em camundongos *Rag2*^{-/-}*γc*^{-/-} (FIGURA 14A), o que sugere que a imunidade adaptativa não desempenha papel no controle da LWT1 e que células NK podem estar expandidas ou ativadas em camundongos *Rag1*^{-/-}. Essa ativação de células NK em camundongos *Rag1*^{-/-} já foi relatada anteriormente devida à ausência de células T reguladoras (GASTEIGER *et al.*, 2013; O'SULLIVAN *et al.*, 2012). O papel das células NK para o controle de metástases de LWT1, bem como a ausência de função da imunidade adaptativa, foram ambas confirmadas por depleção de linfócitos T CD4⁺, ou de CD8⁺, ou de ambos, ou de apenas células NK, revelando maior aumento de metástases somente na depleção de células NK (FIGURA 14B). Isso sugere novamente que apenas células NK controlam LWT1.

O próximo passo foi avaliar a expressão dos dois alelos de MHC de classe 1, H2K^b e H2D^b nas células LWT1, que foi realizado por citometria de fluxo. O resultado revelou baixa expressão para essas moléculas, enquanto que dos dois ligantes para células NK, Rae-1 e CD155, que são reconhecidos por NKG2D e CD226 presentes nas células NK, respectivamente (LONG *et al.*, 2013), somente CD155 foi detectado em alto nível (FIGURA 14C). Sendo assim, a formação de metástases de LWT1 em camundongos deficientes para CD226 (*Cd226*^{-/-}) foi investigada e revelou um aumento de aproximadamente 50% (FIGURA 14D). Curiosamente, uma vez que interações CD226 com CD155 entre células NK e tumorais, respectivamente, levam à secreção de Perforinas e Interferon- γ (ANDRADE; SMYTH; MARTINET, 2014), a formação de metástases de LWT1 foi investigada em camundongos deficientes para Perforina (*Perforina*^{-/-}) e para Interferon- γ (*Ifn γ* ^{-/-}). Esse experimento revelou que ambos os “knockouts” possuem mais metástases, com uma formação de alto nível e mais proeminente nos camundongos *Perforina*^{-/-} (FIGURA 14E). Esses dados sugerem que LWT1 nos pulmões não são controladas pela imunidade adaptativa, mas sim por células NK. Adicionalmente, a via do CD226, Interferon- γ e citotoxicidade mediada por Perforina são mecanismos de controle da LWT1 exercidos pelas células NK. Esses dados também revelam que os efeitos do M1 como potencializador de linfócitos T CD8⁺ descritos anteriormente (OLIVEIRA *et al.*, 2011) não poderiam afetar o modelo da linhagem LWT1, uma vez que a formação de metástases dessas células não é controlada pelos linfócitos T.

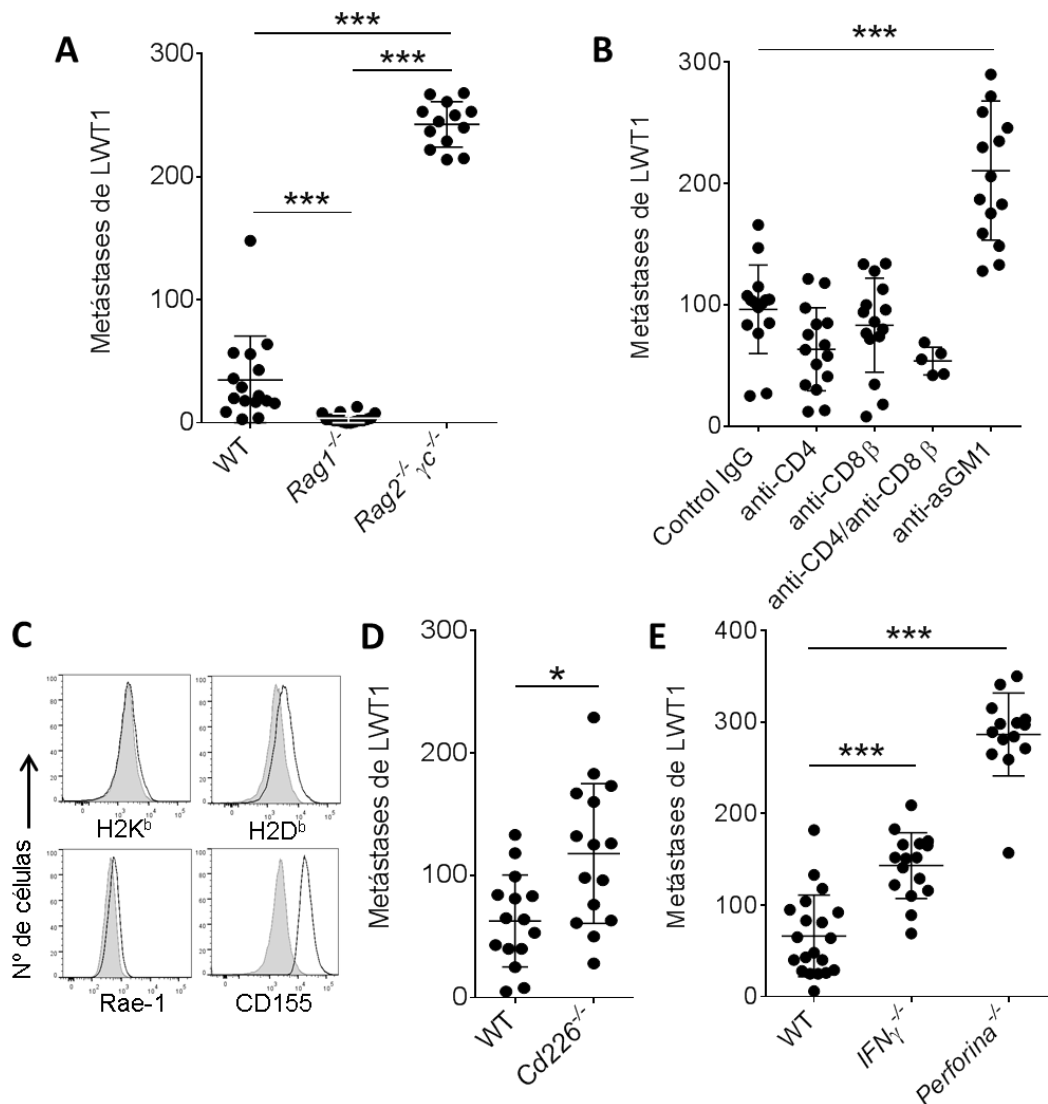


FIGURA 14 - METÁSTASES PULMONARES DE LWT1 NÃO SÃO CONTROLADAS POR LINFÓCITOS T CD8⁺, MAS SIM POR CÉLULAS NK

(A, B, D, E) Camundongos C57BL/6 WT ou os knock-outs indicados foram injetados iv com 5×10^5 células LWT1 e eutanasiados após 14 dias. (B) Camundongos WT foram depletados para linfócitos T CD4, ou para CD8, ou para ambos, ou para apenas células NK, por injeções intraperitoneais de anticorpos administrados nos dias -1, 0 e 7, como descritas em Materiais e Métodos. A quantidade de metástases foi contada para cada camundongo individual, representados pelos símbolos nos gráficos. Gráficos construídos com média \pm desvio padrão da soma de dois experimentos independentes. Estatística realizada por testes bicaudais t de Student. $^{***}p < 0,01$. (C) Células LWT1 foram processadas para citometria de fluxo e a expressão das moléculas indicadas foi avaliada por anticorpos. Para cada histograma, a curva cinza representa o controle isotópico relevante.

7. DISCUSSÃO

Apesar das descobertas em pesquisa básica e também de novas terapias desenvolvidas na década passada, o melanoma metastático ainda é uma doença que provoca a morte de quase todos os pacientes. Como tentativa de melhorar a resposta de terapias atuais, muitos pacientes com câncer utilizam medicamentos homeopáticos como uma forma de tratamento complementar, sem que haja evidência científica comprovando sua real eficácia. Com base nesses fatos, o Laboratório de Pesquisa em Células Inflamatórias e Neoplásicas da UFPR tem pesquisado diversas formulações homeopáticas que promovam alterações significativas e benéficas no sistema imunológico. Por exemplo: o tratamento de camundongos com uma dessas formulações, chamada 'M1', aumentou a quantidade de células T CD8⁺ em linfonodos mesentéricos (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Uma vez que essas células constituem parte da imunidade contra tumores, a ação do M1 foi investigada *in vivo* contra o melanoma de camundongo (ANDRADE, 2011; GUIMARÃES, 2009). Para adquirir maiores informações, no presente estudo o M1 foi testado como tratamento para o melanoma metastático e produziu resultados significativos com inibição do melanoma pulmonar. De maneira inesperada, os efeitos anti-melanoma do M1 foram independentes da imunidade adaptativa. Por outro lado, a menor formação de metástases foi associada à menor quantidade de células MDSC AT1R⁺, angiogênese e proliferação celular, sugerindo uma relação entre esses dados. O M1 constitui, portanto, um dos primeiros medicamentos homeopáticos com ação anti-melanoma comprovada cientificamente.

Até o presente momento, existiam dois modelos de melanoma transplantáveis em camundongos: a injeção de células B16F10 ou SM1WT1. Células B16F10 foram originadas da linhagem B16, que é um melanoma que surgiu espontaneamente há décadas em um camundongo da espécie *Mus musculus* linhagem C57BL/6 (FIDLER; KRIPKE, 1977). A B16 foi injetada intravenosamente em outro camundongo do mesmo tipo e formou algumas metástases pulmonares.

Essas metástases foram isoladas, postas em cultura celular e reinjetadas intravenosamente em um novo camundongo, que produziu dessa vez quantidade maior de metástases. Essa linhagem que passou por uma vez nos pulmões do camundongo foi então chamada de B16F1, em homenagem ao seu criador chamado Isaiah J. Fidler (FIDLER, 1975). Essa célula foi passada por mais nove vezes nos pulmões de camundongos utilizando o mesmo procedimento, recebendo o nome então de B16F10. O potencial metastático, que é a quantidade de nódulos formados nos pulmões, é maior na B16F10 do que na B16F1, quando mesmas quantidades de células são injetadas (NAKAMURA *et al.*, 2002). Sendo assim a B16F10 é um modelo de extrema relevância para estudos de melanoma em camundongos e várias drogas foram inicialmente testadas utilizando esse modelo, como IL-2 (ROSENDAHL *et al.*, 1999), Dacarbazina (HERVIEU *et al.*, 2013) e anti-CTLA-4 (ELSAS; HURWITZ; ALLISON, 1999), atualmente em uso.

Por outro lado, a B16F10 é uma linhagem celular de melanoma que não possui mutação no gene *Braf*, sendo a BRAF^{WT} (HOOIJKAAS *et al.*, 2012). Uma vez que a mutação BRAF^{V600E} está presente em aproximadamente 50% de todos os casos de melanoma humano (DAVIES *et al.*, 2002), foi necessário a criação de um modelo de melanoma com essa mutação para desenvolvimento em camundongos. Para isso, pesquisadores inseriram no DNA de camundongos C57BL/6 o gene humano *Braf*^{V600E} adjacente ao gene *Tirosinase*, que é expresso por melanócitos para a produção da enzima responsável por gerar melanina. Esses camundongos transgênicos são, portanto, mutantes BRAF^{V600E} somente em melanócitos e desenvolvem melanoma espontaneamente com maior frequência, sugerindo que *Braf*^{V600E} é oncogênico (GOEL *et al.*, 2009). Um tumor de melanoma foi obtido desses camundongos e recebeu o nome de SM1. A linhagem SM1 foi injetada subcutaneamente em um camundongo C57BL/6 e produziu um tumor, que foi subsequentemente isolado e posto em cultura. A linhagem resultante foi então chamada de SM1WT1, devido ao fato do camundongo injetado ser do tipo selvagem (KNIGHT *et al.*, 2013). O modelo de injeção subcutânea dessa linhagem foi então

utilizado para testes com os inibidores de BRAF^{V600E} Vemurafenib e seu análogo o PLX4720 (HOOIJKAAS *et al.*, 2012; KNIGHT *et al.*, 2013).

Apesar da linhagem SM1WT1 ser de extrema relevância clínica pois possui a mutação em BRAF, ela possui baixo potencial metastático e desenvolve apenas tumores subcutâneos. Uma vez que metástases de melanoma são largamente encontradas em pulmões de pacientes, foi importante a criação de um modelo de melanoma BRAF^{V600E} que possua potencial metastático para os pulmões de camundongos. Para isso, no presente estudo a linhagem SM1WT1 passou pelo mesmo procedimento adotado na linhagem B16F10, com a injeção intravenosa de células SM1WT1 e isolamento de metástases nos pulmões seguido de cultura celular. Essas células resultantes foram originalmente chamadas de SM1WT1-LWT1, mas para abreviar o nome foram denominadas no presente estudo apenas de LWT1. Assim, de forma pioneira, esse é o único modelo metastático de melanoma com a mutação *Braf*^{V600E} e constitui, portanto, um modelo com grande relevância clínica. Também, devido ao potencial metastático nos pulmões de camundongos, esse modelo é paralelo à B16F10, mas com a mutação em BRAF. Portanto os modelos de injeção de B16F10 ou LWT1 são plataformas para estudos de melanoma metastático BRAF^{WT} ou BRAF^{V600E}, respectivamente.

Uma vez obtido o modelo LWT1, essa linhagem foi avaliada pela susceptibilidade ao tratamento com o inibidor de BRAF^{V600E} PLX4720. LWT1 possui um relativo nível de resistência ao tratamento, uma vez que seu CE₅₀ é de 15,5 µM, semelhantemente à linhagem original SM1WT1 (CE₅₀ 11,3 µM) (KNIGHT; *et al.*, 2013). Isso porque linhagens de melanoma humano com a mutação em BRAF possuem CE₅₀ em escalas de ηM (KNIGHT; *et al.*, 2013). Por outro lado, a linhagem B16F10, que é o melanoma controle (BRAFF^{WT}), possui CE₅₀ de 69,2 µM, sugerindo portanto que a ação do PLX4720 é específica para melanoma com BRAF^{V600E}. Esses resultados foram também confirmados pelo reduzido nível de pERK na LWT1 após tratamento com PLX4720. Por fim, o tratamento *in vivo* com PLX4720 resultou

na inibição de metástases somente da LWT1, enquanto que a B16F10 não foi inibida. Esses dados sugeriram que LWT1 é um modelo metastático de melanoma BRAF^{V600E} e susceptível ao tratamento com PLX4720. É importante salientar que essa é a primeira vez que PLX4720 é testado em um modelo metastático em camundongos imunocompetentes.

Uma vez obtido então os dois modelos para melanoma metastático, a ação do M1 foi investigada. Para isso, o tratamento com M1 foi comparado ao tratamento com água, que é o veículo das matrizes homeopáticas durante as diluições seriadas. De maneira interessante, o M1 atuou em ambos os modelos, B16F10 e LWT1, com evidente e estatisticamente significativa inibição de metástases pulmonares. Uma vez que o M1 atuou em ambas as linhagens, isso sugere que ele atua independentemente do estado de mutação de BRAF. Portanto é atrativo especular que nesses dois modelos, o M1 não possui ação contra as linhagens tumorais *per se*, mas sim provavelmente de uma maneira dependente do organismo. Esses resultados sugerem que M1 possui uma ação ampla contra o melanoma metastático e não possui especificidade baseada em mutações. Isso constitui uma vantagem em relação aos tratamentos específicos, como o PLX4720 e Vemurafenib, pois indica que o M1 pode ser usado para tratar tanto melanoma BRAF^{V600E} quanto melanoma BRAF^{WT}.

A quantificação de metástases pulmonares de B16F10 e LWT1 foi realizada em um microscópio estereoscópico, que permite a visualização somente das metástases da superfície dos pulmões. Com base nisso, levantou-se a questão se havia também alguma alteração nas metástases presentes no interior dos pulmões. Para isso, os pulmões de camundongos com metástases de B16F10 foram processados para histologia. Por outro lado, os pulmões com LWT1 não foram processados pelo fato de que eles já estavam perfundidos com nanquim para a visualização de metástases por estereoscopia, impossibilitando uma histologia adequada devido aos tecidos já estarem corados.

A análise microscópica dos pulmões com B16F10 foi iniciada pela coloração de Fontana – Masson para melanina. Essa técnica enfatiza a presença de melanina e permitiu uma fácil identificação das metástases de melanoma. Devido ao alto contraste em relação à coloração de fundo de vermelho neutro, a melanina marcada foi quantificada e corresponde portanto à quantidade de melanoma. Essa técnica revelou que o tratamento com M1 reduziu a formação de metástases de melanoma em todo o ambiente pulmonar, externo e interno, adicionando maior confiança nos dados referentes aos efeitos anti-melanoma do M1 e validando a técnica histológica baseada na análise da coloração pelo software ImageJ. Por outro lado, uma vez que apenas um corte por pulmão foi utilizado para análise, esse tipo de avaliação utiliza uma amostragem pequena do pulmão total. Essa é provavelmente a causa da grande variabilidade amostral encontrada nos resultados com histologia.

Até a coloração de Fontana – Masson, as análises do melanoma pulmonar foram baseadas em quantidade e nível de colonização pulmonar. Entretanto, cada nódulo de melanoma pode ser originado de apenas uma célula B16F10 ou de várias células aderidas entre si quando atingem o ambiente pulmonar, originando nódulos de maiores tamanhos (FIDLER, 1973). Sendo assim, foi questionado se além de reduzir a quantidade de metástases o tratamento com M1 também poderia ter reduzido o tamanho delas. Para isso a coloração de Hematoxilina – Eosina foi utilizada para avaliar microscopicamente os pulmões com B16F10. Com essa coloração, os tumores de melanoma foram identificados como aglomerações celulares presentes principalmente próximas aos vasos sanguíneos. Em algumas dessas estruturas também foi possível identificar a presença de melanina, confirmando se tratar de melanoma, embora pareça óbvio. Também, a quantificação pelo software foi absoluta, em mm^2 . Entretanto, a seleção dos nódulos a serem avaliados foi subjetiva, sendo que alguns nódulos representativos de cada lâmina foram escolhidos e a média entre eles calculada para cada camundongo, com comparação e estatística entre camundongos. Não foi possível quantificar todos os nódulos de cada lâmina histológica por que a quantidade é muito grande para

análise pelo software ImageJ. Além do mais, a quantidade de nódulos é diferente entre os grupos água e M1, apresentando portanto duas variáveis: tratamento e número de nódulos. Todos esses fatos fizeram com que a análise do tamanho dos nódulos apresentasse grande variação dentro de um mesmo grupo. Entretanto, o valor de média no grupo tratado com água foi estatisticamente maior do que no grupo tratado com M1, o que revela que os nódulos pulmonares de melanoma de camundongos tratados com M1 são menores. Esses dados sugerem que o tratamento com M1, além de reduzir a quantidade de metástases pulmonares, também reduz o tamanho dos tumores de melanoma.

Uma vez que a frequência de proliferação celular também determina o tamanho das metástases, essa foi investigada. Para identificar células de melanoma proliferativas, um marcador de proliferação foi utilizado. Ki-67 é uma proteína expressa somente por células em proliferação, sendo que seus níveis reduzem rapidamente após o final da citocinese na mitose (DE ANDRADE *et al.*, 2013; DIERENDONCK; WIJSMAN; CORNELISSET, 1991). No presente estudo, as metástases de melanoma foram identificadas da mesma maneira como para a coloração de Hematoxilina – Eosina, baseada em aglomerações celulares próximas a vasos. Todos os núcleos de células B16F10 foram analisados, em aproximadamente cinco nódulos por camundongo. A média de cada camundongo foi adicionada em um gráfico de médias para cinco camundongos por grupo. Essa técnica revelou que melanoma de camundongos tratados com M1 possuem menos células B16F10 Ki-67⁺, e, portanto, menor frequência de proliferação celular. Sendo assim, esse dado revela que o menor tamanho das metástases de melanoma é consequência de menor proliferação celular. Embora esse dado pareça óbvio, como citado anteriormente, o tamanho dos nódulos também é consequência da quantidade de células que tiveram sucesso nas fases iniciais da colonização pulmonar. Aglomerados de células B16F10 injetadas intravenosamente produzem nódulos maiores do que células completamente dissociadas entre si (FIDLER, 1973). Uma vez que o M1 é administrado aos camundongos após 24 horas da

injeção de células, é provável que essas já tenham se estabelecido no ambiente tumoral em níveis equivalentes entre os grupos. Entretanto, quando o tratamento com M1 é iniciado, este direta ou indiretamente reduz a proliferação das células B16F10 estabelecidas nos pulmões, resultando em menores tamanhos tumorais observados após 14 dias de tratamento. Ainda, é atrativo especular que a quantidade de metástases também possa ser resultado desse efeito na proliferação, pois uma célula apenas, ou pequenos aglomerados celulares com baixa proliferação celular, são dificilmente visualizados pela microscopia estereoscópica na superfície dos pulmões.

O sistema imunológico possui a capacidade de controlar e inibir o desenvolvimento de tumores. Células NK e T CD8⁺ são os componentes citotóxicos do sistema imunológico que podem matar a célula tumoral pela secreção de granzimas e perforinas ou inibir a proliferação celular pela secreção de Interferon- γ (VESELY *et al.*, 2011). O M1 aumentou a frequência de células T CD8⁺ analisadas por citometria de fluxo de linfonodos mesentéricos de camundongos albinos suíços (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Esse dado é o fundamento para avaliações do potencial anti-melanoma do tratamento com M1 (ANDRADE, 2011; GUIMARÃES, 2009). Uma vez que no presente estudo foi encontrada menores formações de metástases de melanoma pulmonar em camundongos tratados com M1, o próximo passo foi avaliar se esse resultado estaria relacionado com aumento da resposta imunológica nos pulmões. A hipótese era de que células T CD8⁺ estariam aumentadas em pulmões de camundongos, onde exerceriam maior inibição do melanoma. Entretanto, a análise das células pulmonares por citometria de fluxo revelou que entre as populações de leucócitos pulmonares, os linfócitos T CD8⁺ são as que estão presentes em menores quantidades. Adicionalmente, não há diferenças entre os grupos tratados com água ou com M1. Esses dados sugeriram que os efeitos do M1 não estão relacionados com linfócitos T CD8⁺. Adicionalmente, as citocinas nos pulmões também foram avaliadas e não foi possível detectar grandes níveis de IL-12p70 e IL-10, que são duas das principais citocinas importantes para a imunologia

tumoral (VESELY *et al.*, 2011). Embora IL-12p70 tenha sido encontrada somente em pulmões do grupo M1 e que IL-10 esta significativamente aumentada nesse mesmo grupo, se comparado com TNF, MCP-1 e IL-6, os níveis encontrados são aparentemente baixos, sendo muito próximos do limite mínimo de detecção do ensaio pelo “BD CBA Mouse Inflammation Kit” (10,7 pg/ml para IL12p70 e 17,5 pg/ml para IL-10). Para confirmar que o sistema imunológico não está relacionado à ação do M1, camundongos deficientes para o gene *Rag1* foram injetados com melanoma LWT1 e tratados com M1 ou água. Esses camundongos não possuem imunidade adaptativa, pois o gene *Rag1* é crítico para a recombinação de TCRs e cadeias de imunoglobulinas de linfócitos T e B, respectivamente, e sem a qual eles não saem da medula óssea para maturação no timo e baço (O’SULLIVAN *et al.*, 2012). Uma vez que camundongos *Rag1*^{-/-} possuem imunidade inata, células NK foram depletadas em alguns animais com anticorpo anti-asGM1. Curiosamente, esse experimento revelou que para ambos os casos, o M1 ainda surtiu efeito contra metástases de melanoma LWT1, sugerindo que apesar dos dados publicados anteriormente com camundongos albinos suíços, a ação anti-melanoma do M1 não está associada à imunidade adaptativa ou inata contra tumores.

Por outro lado, o tratamento com M1 reduziu os níveis de células CD11b⁺ Gr-1^{baixo} nos pulmões de camundongos com melanoma. Essas células são imunossupressoras e chamadas do Inglês por ‘Myeloid-derived Supressor Cells’ (MDSC) pelo fato de possuírem núcleos celulares semelhantes às células de origem mielóides e pela expressão dos marcadores CD11b e Gr-1, típicos de monócitos e neutrófilos, respectivamente (DOLCETTI *et al.*, 2010). Elas são células que se acumulam em tumores onde exercem sua ação imunossupressora pela secreção de citocinas (YOUN *et al.*, 2008). MDSC no ambiente tumoral secretam ‘Transforming Growth Factor-β’ (TGF-β) que por sua vez inibe a proliferação e produção de Interferon-γ pelos linfócitos T CD8⁺ (GABRILOVICH; NAGARAJ, 2009). Elas também já foram encontradas em pulmões de camundongos com melanoma B16F10, onde produzem diversas citocinas, dentre as já identificadas estão: Interleucina-1β,

Interleucina-2, Interleucina-6, Interleucina-10, Interleucina-12p70 e Interleucina-17 (CHOW *et al.*, 2012). No presente estudo, a frequência pulmonar da subpopulação de células MDSC identificadas como CD11b⁺ Gr-1^{baixo} foi reduzida pelo tratamento com M1, sugerindo que a ação anti-melanoma do M1 poderia estar relacionada à menor imunossupressão. Entretanto, os níveis de citocinas imunossupressoras não estavam relevantemente modificados pelo tratamento. Adicionalmente, como já discutido no parágrafo anterior, o presente estudo demonstrou que a ação do M1 não está relacionada e não depende da imunidade adaptativa ou inata nos pulmões dos camundongos com melanoma. Sendo assim, uma vez encontrado redução em uma das populações de MDSC nos pulmões após tratamento com M1, foi atrativo especular que as células CD11b⁺ Gr-1^{baixo} possuem uma função ainda não revelada, nem descrita na literatura, cuja modulação esteja relacionada ao tratamento com M1.

É possível sugerir várias outras funções que podem ser desempenhadas pelas MDSC em ambiente tumoral. Um exemplo é sua ação pro-inflamatória pela secreção de Interleucina-1 β , que aumenta o desenvolvimento de tumores gastro-intestinais (TU *et al.*, 2008) e tumores de mama (BUNT *et al.*, 2007) em modelos de camundongos. Importaneamente, a inflamação relacionada a tumores, caracterizada pela maior presença de citocinas Interleucina-1 e Interleucina-6, aumenta o fenótipo metastático e crescimento tumoral (CHOW; MÖLLER; SMYTH, 2012; COLOTTA *et al.*, 2009; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Entretanto, no presente estudo não foram encontradas mudanças significativas na presença das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF nos pulmões de camundongos com melanoma e tratados com M1. Esses dados, portanto, desencorajaram estudos para investigarem uma possível ação anti-inflamatória do M1 nas MDSC.

RNAs mensageiros de um fator de crescimento para células endoteliais vasculares, o VEGF, já foram encontrados anteriormente em células MDSC humanas derivadas do sangue periférico (LECHNER; LIEBERTZ; EPSTEIN, 2010).

Uma das vias para produção desse fator em células endoteliais começa pela ativação do receptor para Angiotensina II chamado AT1R, que desencadeia uma cascata de sinalização intracelular pela via da MAPKinase com posterior ativação de ERK, que ativa a transcrição gênica de fatores de crescimento como o VEGF (YIN; YAN; BERK, 2003). Sendo assim, estudos vêm descrevendo o papel da Angiotensina II no crescimento e angiogênese tumoral (DESHAYES; NAHMIAS, 2005). Camundongos deficientes para AT1R (*At1r^{-/-}*) possuem menor desenvolvimento de melanoma subcutâneo, com reduzidas taxas de proliferação celular e angiogênese (EGAMI *et al.*, 2003). O bloqueio farmacológico do AT1R pela droga Losartana também reduziu o crescimento do melanoma e controlou a angiogênese tumoral em camundongos (OTAKE *et al.*, 2010). Adicionalmente, os papéis pró-tumorais e angiogênicos da Angiotensina II foram associados a produção de células mielóides associadas a tumores, como macrófagos (CORTEZ-RETAMOZO *et al.*, 2013). Também, macrófagos (identificados como células F4/80⁺ no estudo citado) associados à tumores expressam AT1R e produzem VEGF (EGAMI *et al.*, 2003). Isso revela que a via da interação da Angiotensina II com seu receptor AT1R está associada à progressão tumoral, pelo recrutamento de células endoteliais vasculares e posterior formação de vasos no microambiente tumoral. Interessantemente, essa via também já foi descrita em outros tipos de cânceres, como câncer de rim (MIYAJIMA; KOSAKA; ASANO, 2002), pâncreas (FUJIMOTO *et al.*, 2001), cérebro e espinha (glioma) (ARRIETA *et al.*, 2005). No presente estudo, o AT1R foi investigado em diferentes populações de leucócitos pulmonares. Entretanto, AT1R não foi encontrado nos macrófagos identificados no presente estudo (CD11b⁺ F4/80⁺ CD11c⁻) e nem em células dendríticas (CD11c⁺ CD11b⁻), células T (TCR-β⁺ CD3ε⁺) CD4⁺ ou CD8⁺, células B (B220⁺ TCR-β⁻ CD3ε⁻) ou células NK (NK1.1⁺ TCR-β⁻ CD3ε⁻). Por outro lado, a expressão de AT1R foi encontrada em todas as células MDSC CD11b⁺ Gr-1⁺ presentes nos pulmões dos camundongos. Curiosamente, o AT1R é mais expresso nas CD11b⁺ Gr-1^{baixo}, que é justamente a população de MDSC menos frequente pelo tratamento com M1. Também, a análise da quantificação relativa da expressão de AT1R pela média da fluorescência por

citometria de fluxo revelou que o M1 diminuiu sua expressão nas células CD11b⁺ Gr-1^{baixo}. Esses dados sugerem um mecanismo de ação celular do M1, que é a redução do recrutamento de MDSC AT1R⁺ para os pulmões de camundongos com melanoma B16F10 e tratados com M1. Assim, de forma pioneira, esse trabalho mostra que o AT1R é expresso por MDSC, o que fortemente acrescenta uma nova função a essas células para o desenvolvimento tumoral: a angiogênese.

Fundamentado nesses achados, o próximo passo foi investigar a angiogênese tumoral nos camundongos tratados com M1. Diversos marcadores de células endoteliais foram testados, como CD31, CD34 e P-Selectina; entretanto, devido à falta de marcação positiva associada a marcações inespecíficas nas reações para CD31 e CD34 (dados não mostrados) somente a P-Selectina foi utilizada. P-Selectina (CD62P) é uma glicoproteína expressa por células endoteliais vasculares e plaquetas, sendo exclusivamente encontrada somente por essas células no ambiente pulmonar, inclusive quando metástases de B16F10 estão presentes (LUDWIG, 2004; STEVENS, 2011). Seu ligante é o 'P-Selectin glycoprotein ligand-1', encontrado em leucócitos, e essa interação é crítica para o recrutamento de leucócitos em situações de injúria e inflamação. Adicionalmente, a expressão de P-Selectina é aumentada nesses casos (STEVENS, 2011). Sendo assim, a presença de células P-Selectina⁺ dentro dos tumores sugere infiltração de células endoteliais vasculares e, portanto, angiogênese. No presente estudo, P-Selectina foi investigada por imunofluorescência de lâminas histológicas, e essa técnica revelou que melanoma pulmonar de camundongos tratados com M1 possuem menores quantidades de células com características morfológicas de endoteliais vasculares e positivas para P-Selectina. Esse dado sugere que os tumores dos camundongos tratados com M1 estão com menor angiogênese e sofrem por falta de nutrientes para crescimento adequado. Isso leva consequentemente à redução na quantidade e tamanho das metástases de melanoma, ambos resultados também encontrados no presente estudo.

A angiogênese tumoral é um processo crítico para o crescimento do melanoma, pois é através do sistema sanguíneo que as células obtêm os nutrientes necessários para sobrevivência e crescimento (MARNEROS, 2009). Sendo assim, a angiogênese constitui um alvo terapêutico para o desenvolvimento de novas drogas contra o melanoma (EMMETT; DEWING; PRITCHARD-JONES, 2011). Por exemplo: anticorpos monoclonais que ligam e bloqueiam o VEGF, como o Bevacizumab, impedem sua interação com o receptor em células endoteliais vasculares, inibindo proliferação e conseqüentemente a formação de novos vasos intratumorais. Isso leva à condições de hipóxia e falta de nutrientes no melanoma, que responde com menor proliferação celular e apoptose, inibindo portanto o crescimento tumoral (ZAKI; BASU; CORRIE, 2012). Recentemente, Bevacizumab foi testado em um estudo clínico de fase 3 e apresentou um aumento não estatisticamente confirmado ($p = 0,18$) na sobrevivência de pacientes com metástases de melanoma (CORRIE *et al.*, 2014). No presente estudo, os dados obtidos com o tratamento com M1 sugerem que este atua através da inibição da angiogênese tumoral. De maneira interessante, a diminuição da proliferação celular e o concomitante aumento de apoptose de células de melanoma sugerem que a inibição da angiogênese pelo M1 foi significativa e afetou os tumores. Metástases de melanoma em camundongos tratados com M1, portanto, estão em condições de falta de nutrientes, o que leva à inibição do crescimento tumoral, baixas taxas de proliferação e aumento de apoptose.

A β -Catenina é uma proteína acessória citoplasmática com dupla função, associada à adesão intercelular quando fisicamente interage com E-Caderina e transcrição gênica quando associada ao fator de transcrição TCF no final da via de sinalização por Wnt (NELSON; NUSSE, 2004). Células de melanoma possuem pouca adesão intercelular por E-Caderina e, portanto, é maior a quantidade de β -Catenina com função na transcrição gênica. Sendo assim, vários laboratórios pelo mundo têm investigado a função dessa proteína nas células de melanoma. Resultados contrastantes foram relatados. O silenciamento gênico por RNA de

interferência do gene da β -Catenina suprimiu o crescimento *in vivo* do melanoma B16 injetado subcutaneamente em camundongos (TAKAHASHI; NISHIKAWA; TAKAKURA, 2006). Por outro lado, quando essas células de melanoma silenciadas para β -Catenina são injetadas intravenosamente nos camundongos, a quantidade de metástases é aumentada em aproximadamente 50% (TAKAHASHI *et al.*, 2008). Adicionalmente, foi demonstrado que o silenciamento gênico de células de melanoma humano reduz a invasão *in vitro* associada à menor expressão da metaloprotease MT1-MMP (ARAZARENA *et al.*, 2012). Um estudo de amostras humanas de melanoma cutâneo demonstrou que a expressão de β -Catenina é inversamente proporcional à proliferação celular – marcada por Ki-67 – e tamanho dos tumores, ou seja, tumores menores têm maior expressão de β -Catenina e menor expressão de Ki-67 (CHIEN *et al.*, 2009). No presente estudo, também foi constatado que melanoma em camundongos tratados com M1 possui menores tamanhos, menor marcação de Ki-67 e maior expressão de β -Catenina. Entretanto, ainda permanece indeterminado se o aumento da expressão de β -Catenina nesses camundongos é um resultado direto da ação do M1 nas células B16F10 ou se é apenas um efeito relacionado à diminuição da proliferação celular por falta de nutrientes/angiogênese.

A célula de melanoma também interage com a matriz extracelular. Uma das interações descritas é com o glicosaminoglicano Ácido Hialurônico através de seu receptor CD44, presente nas células B16F10 (SIRONEN *et al.*, 2011). Essa interação tem papel fundamental para o potencial metastático da B16F10 e o bloqueio do CD44 por um anticorpo monoclonal reduziu significativamente a quantidade de metástases pulmonares em camundongos (MUMMERT *et al.*, 2003), mostrando sua importância. Por outro lado, no presente estudo foi observada a diminuição da marcação para Ácido Hialurônico nas metástases de B16F10 pelo tratamento com M1. Entretanto, a expressão de CD44 não foi modificada pelo tratamento. Pelos experimentos realizados, não foi possível determinar se essa redução de Ácido Hialurônico é resultante da ação do M1 em células B16F10 ou de

outras células acessórias nas metástases. Isso porque Ácido Hialurônico é secretado por diversas células, como endoteliais vasculares, por exemplo (LENNON; SINGLETON, 2011). Uma das possibilidades é de que a redução da angiogênese tumoral também resulte na menor produção de Ácido Hialurônico pela menor quantidade de células endoteliais vasculares. Entretanto, ainda permanece para ser investigado se o M1 atua contra a B16F10 para reduzir a produção de Ácido Hialurônico e se isso altera de alguma maneira o potencial metastático dessas células.

Com base nos achados de que o tratamento com M1 atua contra o recrutamento de células MDSC caracterizadas pelos marcadores $CD11b^+$ $Gr-1^{baixo}$ $AT1R^+$, é atrativo propor que essas células possuem atividade angiogênica pela secreção de VEGF. O fator responsável pelo recrutamento dessas células ainda não foi identificado, mas estudos realizados em macrófagos sugerem ser Angiotensina II (CORTEZ-RETAMOZO *et al.*, 2013). O menor recrutamento dessas células pelo tratamento com M1 pode resultar em menores quantidades de VEGF no microambiente tumoral. Entretanto, isso ainda não foi completamente comprovado pela quantificação de VEGF nos pulmões dos camundongos. A menor presença de VEGF conseqüentemente leva á menores quantidades de células endoteliais vasculares e angiogênese. A falta de nutrientes por essa deficiência na rede de capilares intratumorais leva à menor formação e crescimento das metástases do melanoma (FIGURA 15). Sendo assim, é possível identificar redução na quantidade e tamanho dos nódulos tumorais nos pulmões de camundongos intravenosamente injetados com B16F10 e tratados com M1.

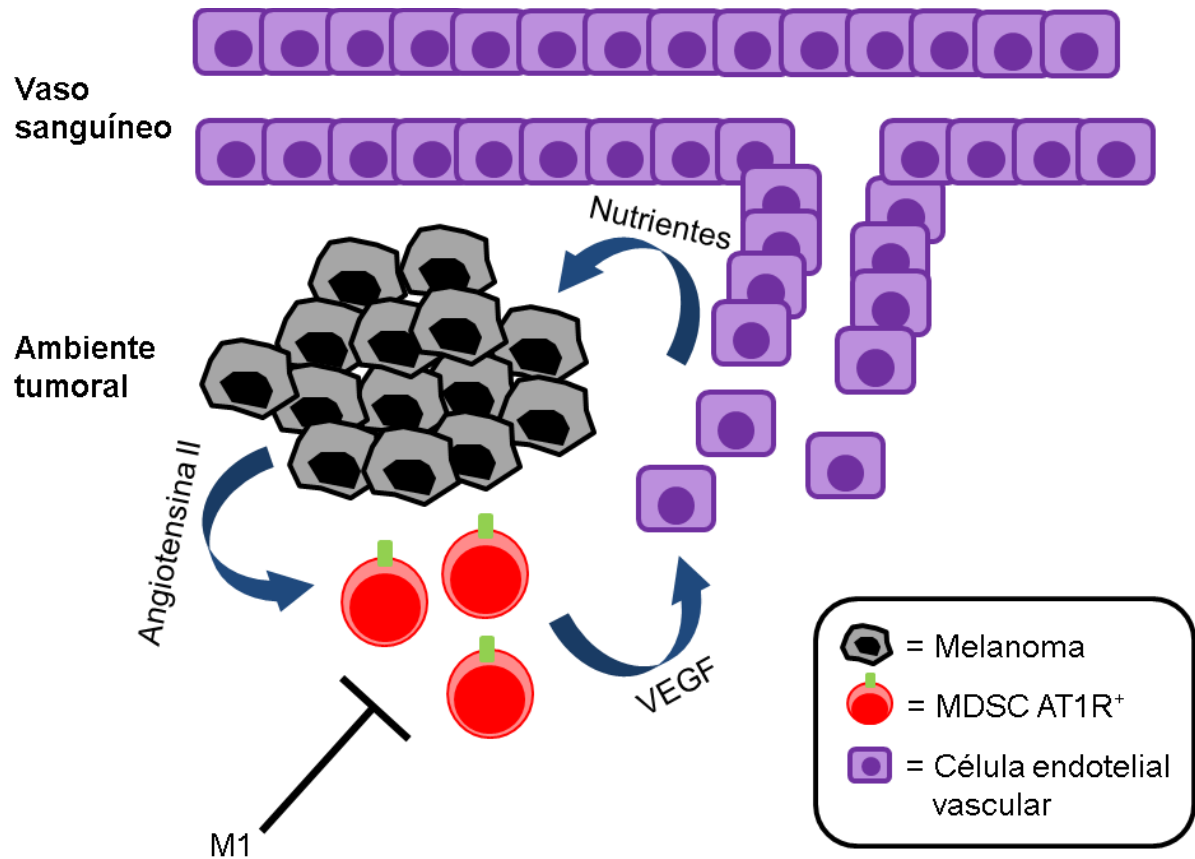


FIGURA 15 – PROPOSTA DO MECANISMO DE AÇÃO DO M1 CONTRA A FORMAÇÃO DE METÁSTASES DE MELANOMA

FONTE: o autor (2014).

Células de melanoma secretam fatores como Angiotensina II que atraem MDSC AT1R⁺. Estas por sua vez secretam VEGF que atraem e estimulam células endoteliais vasculares para a formação de capilares sanguíneos. Os capilares levam nutrientes, como oxigênio, glicose e aminoácidos, para os tumores de melanoma. O M1 reduz a quantidade de MDSC AT1R⁺, conseqüentemente levando a menor desenvolvimento dos tumores.

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, estudos futuros devem focar na ação do M1 contra o recrutamento das células MDSC AT1R⁺. Adicionalmente, melhor caracterização das funções dessas células faz-se necessária, principalmente referente à produção de VEGF. Também, uma vez que

M1 é um medicamento homeopático e homeopatia é uma forma de terapia integrativa e complementar, é importante, se não essencial, testar em camundongos o M1 em combinação com alguma outra forma de tratamento atual para o melanoma, como PLX4720 ou anti-CTLA-4. Finalmente, o tratamento com M1 e outros medicamentos homeopáticos constitui um interessante nicho para estudos de novas terapias para o melanoma devido à baixa toxicidade e reduzido custo financeiro, ambos resultantes da alta diluição em água dos medicamentos homeopáticos.

8. CONCLUSÃO

No presente trabalho foram mostrados efeitos contra a formação de metástases pulmonares de melanoma de camundongo após tratamento com um medicamento homeopático chamado 'M1'. Adicionalmente, foi identificado um provável mecanismo de ação do M1: o controle de células MDSC AT1R⁺ nos pulmões de camundongos com melanoma. Isso resultou em menor angiogênese tumoral, proliferação e tamanho das metástases. Esses dados constituem, portanto, evidências científicas de que esse medicamento homeopático possui ação contra o melanoma. O M1, por ser altamente diluído, resulta em ausência de toxicidade e baixo custo financeiro, sendo um tratamento promissor. Uma vez que homeopatia é utilizada principalmente como tratamento integrativo e complementar, estudos futuros devem investigar a ação do M1 em conjunto com atuais formas de terapias para o melanoma e, se conveniente, seguidos de estudo clínicos para comprovar em pacientes humanos a sua real eficácia.

REFERÊNCIAS

- AIHW, A. I. Australia's health 2012. **Australia's Health Series**, v. 1, p. 1-642, 2012.
- ANDRADE, L. F. DE; SMYTH, M. J.; MARTINET, L. DNAM-1 control of natural killer cells functions through nectin and nectin-like proteins. **Immunology and cell biology**, v. 92, n. 3, p. 237–244, 2014.
- ANDRADE, L. F. **Avaliação da ação do medicamento M1 sobre o melanoma murino “ in vivo”**. Dissertação (Biologia Celular), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011, 64 f.
- ARIZARENA, I.; BISCHOF, H.; GILBY, D.; BELLONI, B.; DUMMER, R.; WELLBROCK, C. Europe PMC Funders Group In melanoma , beta-catenin acts as suppressor of invasion through a cell-type specific mechanism. **Oncogene**, v. 30, n. 45, p. 4531–4543, 2012.
- ARRIETA, O.; GUEVARA P.; ESCOBAR, E.; GARCÍA-NAVARRETE R.; PINEDA B.; SOTELO J. Blockage of angiotensin II type I receptor decreases the synthesis of growth factors and induces apoptosis in C6 cultured cells and C6 rat glioma. **British Journal of Cancer**, v. 92, n. 7, p. 1247–1252, 2005.
- ATKINS, M. B.; LOTZE, M. T.; DUTCHER, J. P.; FISHER, R. I.; WEISS, G.; MARGOLIN, K.; ABRAMS, J.; SZNOL, M.; PARKINSON, D.; HAWKINS, M.; PARADISE, C.; KUNKEL, L.; ROSENBERG, S. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 7, p. 2105–2116, 1999.
- BISHOP, J.; NELSON, A. M.; MERZ, W. G.; ASKIN F. B.; RIEDEL, S. Evaluation of the detection of melanin by the Fontana-Masson silver stain in tissue with a wide range of organisms including Cryptococcus. **Human Pathology**, v. 43, n. 6, p. 898–903, 2012.
- BORDON, Y. Tumour immunology: Cracking the combination. **Nature Reviews. Immunology**, v. 13, p. 1-1, 2013.
- BRASIL. Consolidado de normas da COFID. **Agência de Vigilância Sanitária**, v. 1, p. 1–19, 2009.
- BRASIL. **Farmacopeia Homeopática Brasileira**. Comissão da Farmacopeia Brasileira, 3ª Ed., Brasília, 2011, 364 f.

BUNT, S. K.; YANG, L.; SINHA, P.; CLEMENTS, V. K.; LEIPS, J.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. **Cancer Research**, v. 67, n. 20, p. 10019–10026, 2007.

CHAN, C. J.; ANDREWS D. M.; MCLAUGHLIN, N. M.; YAGITA, H.; GILFILLAN, S.; COLONNA, M.; SMYTH M. J. DNAM-1/CD155 interactions promote cytokine and NK cell-mediated suppression of poorly immunogenic melanoma metastases. **Journal of Immunology**, v. 184, n. 2, p. 902–911, 2010.

CHAN, C.; SMYTH, M.; MARTINET, L. Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. **Cell Death & Differentiation**, v. 21, p. 5–14, 2013.

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.; 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. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2507–2516, 2011.

CHENG, Y.; ZHANG, G.; LI, G. Targeting MAPK pathway in melanoma therapy. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 32, p. 567-584, 2013.

CHIEN, A. J.; MOORE, E. C.; LONSDORF, A. S.; KULIKAUSKAS, R. M.; ROTHBERG, B. G.; BERGER, A. J.; MAJOR, M. B.; HWANG, S. T.; RIMM, D. L.; MOON, R. T. Activated Wnt/beta-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 4, p. 1193–1198, 2009.

CHOW, M. T.; SCENEAY, J.; PAGET, C.; WONG, C. S. F.; DURET, H.; TSCHOPP, J.; MÖLLER, A.; SMYTH, M. J. NLRP3 suppresses NK cell-mediated responses to carcinogen-induced tumors and metastases. **Cancer Research**, v. 72, n. 22, p. 5721–5732, 2012.

CHOW, M. T.; MÖLLER, A.; SMYTH, M. J. Inflammation and immune surveillance in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, n. 1, p. 23–32, 2012.

CLINICAL TRIALS. Disponivel em: clinicaltrials.gov. Acessado em: 29/08/2014.

COLOTTA, F.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; GARLANDA, C.; MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 7, p. 1073–1081, 2009.

CORRIE, P. G. MARSHALL, A.; DUNN, J. A.; MIDDLETON, M. R.; NATHAN, P. D.; GORE, M.; DAVIDSON, N.; NICHOLSON, S.; KELLY, C. G.; MARPLES, M.; DANSON, S. J.; MARSHALL, E.; HOUSTON, S. J.; BOARD, R. E.; WATERSTON, A. M.; NOBES, J. P.; HARRIES, M.; KUMAR, S.; YOUNG, G.; LORIGAN, P. Adjuvant bevacizumab in patients with melanoma at high risk of recurrence (AVAST-M): preplanned interim results from a multicentre, open-label, randomised controlled phase 3 study. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 6, p. 620–630, 2014.

CORTEZ-RETAMOZO, V.; ETZRODT, M.; NEWTON, A.; RYAN, R.; PUCCI, F.; SIO, S. W.; KUSWANTO, W.; RAUCH, P. J.; CHUDNOVSKIY, A.; IWAMOTO, Y.; KOHLER, R.; MARINELLI, B.; GORBATOV, R.; WOJTKIEWICZ, G.; PANIZZI, P.; MINO-KENUDDSON, M.; FORGHANI, R.; FIGUEIREDO, J. L.; CHEN, J. W.; XAVIER, R.; SWIRSKI, F. K.; NAHRENDORF, M.; WEISSLEDER, R.; PITTET, M. J. Angiotensin II drives the production of tumor-promoting macrophages. **Immunity**, v. 38, n. 2, p. 296–308, 2013.

DAMSKY, W. E.; CURLEY, D. P.; SANTHANAKRISHNAN, M.; ROSENBAUM, L. E.; PLATT, J. T.; GOULD ROTHBERG, B. E.; TAKETO, M. M.; DANKORT, D.; RIMM, D. L.; MCMAHON, M.; BOSENBERG, M. β -Catenin Signaling Controls Metastasis in Braf-Activated Pten-Deficient Melanomas. **Cancer Cell**, v. 20, n. 6, p. 741–754, 2011.

DAVIES, H.; BIGNELL, G.; COX, C.; STEPHENS, P. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, p. 949–954, 2002.

DE ANDRADE, B. A. B.; LEÓN, J. E.; CARLOS, R.; DELGADO-AZAÑERO, W.; MOSQUEDA-TAYLOR, A.; DE ALMEIDA, O. P. Expression of minichromosome maintenance 2, Ki-67, and geminin in oral nevi and melanoma. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 17, n. 1, p. 32–36, 2013.

DE OLIVEIRA, S. M. DE OLIVEIRA, C. C.; ABUD, A. P. R.; GUIMARÃES, F. S. F.; DI BERNARDI, R. P.; COLETTI, E. L. O.; BUCHI, D. F. Mercurius solubilis: actions on macrophages. **Homeopathy**, v. 100, n. 4, p. 228–236, 2011.

DESHAYES, F.; NAHMIAS, C. Angiotensin receptors: a new role in cancer? **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 7, p. 293–299, 2005.

DIERENDONCK, J. H. VAN; WIJSMAN, J. H.; CORNELISSET, C. J. Cell-cycle-Related Staining Patterns of Anti-proliferating Cell Nuclear Antigen Monoclonal Antibodies Comparison with BrdUrd Labeling and Ki-67 Staining. **American Journal of Pathology**, v. 138, n. 5, p. 1165–1172, 1991.

DOLCETTI, L.; PERANZONI, E.; UGEL, S.; MARIGO, I.; FERNANDEZ GOMEZ, A.; MESA, C.; GEILICH, M.; WINKELS, G.; TRAGGIAI, E.; CASATI, A.; GRASSI, F.; BRONTE, V. Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived

suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 1, p. 22–35, 2010.

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

ELSAS, A. V.; HURWITZ, A. A.; ALLISON, J. P. Combination Immunotherapy of B16 Melanoma Using Anti-Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4 (CTLA-4) and Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)-producing Vaccines Induces Rejection of Subcutaneous and Metastatic Tumors Accompanied. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 190, n. 3, p. 355–366, 1999.

EMMETT, M. S.; DEWING, D.; PRITCHARD-JONES, R. O. Angiogenesis and melanoma - from basic science to clinical trials. **American Journal of Cancer Research**, v. 1, n. 7, p. 852–868, 2011.

FIDLER, I. J. The relationship of embolic homogeneity, number, size and viability to the incidence of experimental metastasis. **European Journal of Cancer**, v. 9, n. 3, p. 223–227, 1973.

FIDLER, I. J. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. **Cancer Research**, v. 35, n. 1, p. 218–224, 1975.

FIDLER, I. J.; KRIPKE, M. L. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. **Science**, v. 197, n. 4306, p. 893–895, 1977.

FINN, L.; MARKOVIC, S. N.; JOSEPH, R. W. Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future. **BMC Medicine**, v. 10, n. 1, p. 23-33, 2012.

FUJIMOTO, Y.; SASAKI, T.; TSUCHIDA, A.; CHAYAMA, K. Angiotensin II type 1 receptor expression in human pancreatic cancer and growth inhibition by angiotensin II type 1 receptor antagonist. **FEBS Letters**, v. 495, p. 197-200, 2001.

GABRILOVICH, D.; NAGARAJ, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p. 162-75, 2009.

GASTEIGER, G. HEMMERS, S.; BOS, P. D.; SUN, J. C.; RUDENSKY, A. Y. IL-2-dependent adaptive control of NK cell homeostasis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 6, p. 1179-1187, 2013.

GIAVAZZI, R.; GAROFALO, A. Syngeneic murine metastasis models: b16 melanoma. **Methods in Molecular Medicine**, v. 58, p. 223–229, 2001.

GLOBOCAN. Disponível em: globocan.iarc.fr. Acesso em 29/08/2014.

GOEL, V. K.; IBRAHIM, N.; JIANG, G.; SINGHAL, M.; FEE, S.; FLOTTE, T.; WESTMORELAND, S.; HALUSKA, F. S.; HINDS, P. W.; HALUSKA, F. G. Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. **Oncogene**, v. 28, n. 23, p. 2289–2298, 2009.

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

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

GUIMARÃES, F. S. F.; ANDRADE, L. F.; MARTINS, S. T.; ABUD, A. P. R.; SENE, R. V.; WANDERER, C.; TISCORNIA, I.; BOLLATI-FOGOLÍN, M.; BUCHI, 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. 113-127, 2010.

HERVIEU, A.; RÉBÉ, C.; VÉGRAN, F.; CHALMIN, F.; BRUCHARD, M.; VABRES, P.; APETOH, L.; GHIRINGHELLI, F.; MIGNOT, G. Dacarbazine-mediated upregulation of NKG2D ligands on tumor cells activates NK and CD8 T cells and restrains melanoma growth. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 2, p. 499–508, 2013.

HODI, F.; O'DAY, S.; MCDERMOTT, D. F.; WEBER, R. W.; SOSMAN, J. A.; HAANEN, J. B.; GONZALEZ, R.; ROBERT, C.; SCHADENDORF, D.; HASSEL, J. C.; AKERLEY, W.; VAN DEN EERTWEGH, A. J. M.; LUTZKY, J.; LORIGAN, P.; VAUBEL, J. M.; LINETTE, G. P.; HOGG, D.; OTTENSMEIER, C. H.; LEBBÉ, C.; PESCHEL, C.; QUIRT, I.; CLARK, J. I.; WOLCHOK, J. D.; WEBER, J. S.; TIAN, J.; YELLIN, M. J.; NICHOL, G. M.; HOOS, A.; URBA, W. J. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 8, p.711-723, 2010.

HOOIJKAAS, A.; GADIOT, J.; MORROW, M.; STEWART, R.; SCHUMACHER, T.; BLANK, C. U. Selective BRAF inhibition decreases tumor-resident lymphocyte frequencies in a mouse model of human melanoma. **Oncoimmunology**, v. 1, n. 5, p. 609–617, 2012.

HOUGHTON, A. N.; POLSKY, D. Focus on melanoma. **Cancer Cell**, v. 2, n. 4, p. 275–278, 2002.

IGUCHI-MANAKA, A.; KAI, H.; YAMASHITA, Y.; SHIBATA, K.; TAHARA-HANAOKA, S.; HONDA, S.; YASUI, T.; KIKUTANI, H.; SHIBUYA, K.; SHIBUYA, A. Accelerated

tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 13, p. 2959–2964, 2008.

INCA, M.S. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. **Ministério da Saúde**, 2014.

JOFFRE, O. P.; SEGURA, E.; SAVINA, A.; AMIGORENA, S. Cross-presentation by dendritic cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 8, p. 557–569, 2012.

JOSEPH, E. W.; PRATILAS, C. A.; POULIKAKOS, P. I.; TADI, M.; WANG, W.; TAYLOR, B. S.; HALILOVIC, E.; PERSAUD, Y.; XING, F.; VIALE, A.; TSAI, J.; CHAPMAN, P. B.; BOLLAG, G.; SOLIT, D. B.; ROSEN, N. The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 33, p. 14903–14908, 2010.

KNIGHT, D. A.; NGIOW, S. F.; LI, M.; PARMENTER, T.; MOK, S.; CASS, A.; HAYNES, N. M.; KINROSS, K.; YAGITA, H.; KOYA, R. C.; GRAEBER, T. G.; RIBAS, A.; MCARTHUR, G. A.; SMYTH, M. J. Host immunity contributes to the anti-melanoma activity of BRAF inhibitors. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 3, p. 1371–1381, 2013.

LÄNGLER, A.; SPIX, C.; EDELHÄUSER, F.; KAMEDA, G.; KAATSCH, P.; SEIFERT, G. Use of homeopathy in pediatric oncology in Germany. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-7, 2011.

LECHNER, M. G.; LIEBERTZ, D. J.; EPSTEIN, A. L. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 4, p. 2273–2284, 2010.

LENNON, F. E.; SINGLETON, P. A. Hyaluronan regulation of vascular integrity. **American Journal of Cardiovascular Disease**, v. 1, n. 3, p. 200–13, 2011.

LONG, E. O.; KIM, H. S.; LIU, D.; PETERSON, M. E.; Rajagopalan, S. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. **Annual Review of Immunology**, v. 31, p. 227–258, 2013.

LUDWIG, R. J. Endothelial P-Selectin as a Target of Heparin Action in Experimental Melanoma Lung Metastasis. **Cancer Research**, v. 64, n. 8, p. 2743–2750, 2004.

MARNEROS, A. G. Tumor angiogenesis in melanoma. **Hematology/oncology Clinics of North America**, v. 23, n. 3, p. 431–446, 2009.

MARTÍNEZ CONESA, C.; SÁNCHEZ, N. A.; ORTEGA, V.O.; 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, n. 4, p. 305–312, 2009.

MARTINS, J.; PASSEROTTI, C. C.; MACIEL, R. M. B.; 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. **Analytical Biochemistry**, v. 319, n. 1, p. 65–72, 2003.

MAYO CLINIC. Disponível em: <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/melanoma/multimedia/melanoma/img-20008364>. Acessado em: 29/08/2014.

MERKEL, C.; SOARES, R. B. S.; DE CARVALHO, A. C. V.; ZANATTA, D. B.; BAJGELMAN, M. C.; FRATINI, P.; COSTANZI-STRAUSS, E.; STRAUSS, B. E. Activation of endogenous p53 by combined p19Arf gene transfer and nutlin-3 drug treatment modalities in the murine cell lines B16 and C6. **BMC Cancer**, v. 10, p. 316–330, 2010.

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

MIYAJIMA, A.; KOSAKA, T.; ASANO, T. Angiotensin II type I antagonist prevents pulmonary metastasis of murine renal cancer by inhibiting tumor angiogenesis. **Cancer Research**, v. 62, p. 4176–4179, 2002.

MOCELLIN, S.; BENNA, C.; PILATI, P. Coinhibitory molecules in cancer biology and therapy. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 24, n. 2, p. 147–161, 2013.

MOLASSIOTIS, A.; FERNADEZ-ORTEGA, P.; PUD, D.; OZDEN, G.; SCOTT, J.; PANTELI, V.; MARGULIES, A.; BROWALL, M.; MAGRI, M.; SELVEKEROVA, S.; MADSEN, E.; MILOVICS, L.; BRUYNS, I.; GUDMUNSDOTTIR, G.; HUMMERSTON, S.; AHMAD, A. M.; PLATIN, N.; KEARNEY, N.; PATIRAKI, E. Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey. **Annals of Oncology**, v. 16, n. 4, p. 655–663, 2005.

MORISAKI, T.; ONISHI, H.; KATANO, M. Cancer Immunotherapy Using NKG2D and DNAM-1 Systems. **Anticancer Research**, v. 32, p. 2241–2248, 2012.

MUMMERT, M. E.; MUMMERT, D. I.; ELLINGER, L.; TAKASHIMA, A. Functional roles of hyaluronan in B16-F10 melanoma growth and experimental metastasis in mice. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 2, n. 3, p. 295–300, 2003.

NAKAMURA, K.; YOSHIKAWA, N.; YAMAGUCHI, 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, n. 7, p. 791–798, 2002.

NELSON, W. J.; NUSSE, R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1483–1487, 2004.

NIESWANDT, B.; HAFNER, M.; ECHTENACHER, B.; MÄNNEL, D. N. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. **Cancer Research**, v. 59, n. 6, p. 1295–1300, 1999.

O'SULLIVAN, T.; SADDAWI-KONEFKA, R.; VERMI, W.; KOEBEL, C. M.; ARTHUR, C.; WHITE, J. M.; UPPALURI, R.; ANDREWS, D. M.; NGIOW, S. F.; TENG, M. W. L.; SMYTH, M. J.; SCHREIBER, R. D.; BUI, J. D. Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 10, p. 1869–1882, 2012.

OHSIE, S. J.; SARANTOPOULOS, G. P.; COCHRAN, A. J.; BINDER, S. W. Immunohistochemical characteristics of melanoma. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 35, n. 5, p. 433–444, 2008.

OLIVEIRA, C. C.; ABUD, A. P. R.; DE OLIVEIRA, S. M.; GUIMARÃES, F. S. F.; DE ANDRADE, L. F.; DI BERNARDI, R. P.; COLETTI, E. L. O.; KUCZERA, D.; DA LOZZO, E. J.; GONÇALVES, J. P.; TRINDADE, E. S.; BUCHI, D. F. Developments on drug discovery and on new therapeutics: highly diluted tinctures act as biological response modifiers. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 101–112, 2011.

ONG, C. C.; JUBB, A. M.; JAKUBIAK, D.; ZHOU, W.; RUDOLPH, J.; HAVERTY, P. M.; KOWANETZ, M.; YAN, Y.; TREMAYNE, J.; LISLE, R.; HARRIS, A. L.; FRIEDMAN, L. S.; BELVIN, M.; MIDDLETON, M. R.; BLACKWOOD, E. M.; KOEPPEN, H.; HOEFLICH, K. P. P21-activated kinase 1 (PAK1) as a therapeutic target in BRAF wild-type melanoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 9, p. 606–615, 2013.

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 Chemotherapy and Pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 79–87, 2010.

PACEY, S.; GORE, M.; CHAO, D.; BANERJI, U.; LARKIN, J.; SARKER, S.; OWEN, K.; ASAD, Y.; RAYNAUD, F.; WALTON, M.; JUDSON, I.; WORKMAN, P.; EISEN, T. A Phase II trial of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin (17-AAG, tanespimycin) in patients with metastatic melanoma. **Investigational New Drugs**, v. 30, n. 1, p. 341–349, 2012.

RICHTER, U.; WICKLEIN, D.; GELEFF, S.; SCHUMACHER, U. The interaction between CD44 on tumour cells and hyaluronan under physiologic flow conditions: implications for metastasis formation. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 137, n. 5, p. 687-695, 2012.

ROSENDAHL, A.; KRISTENSSON, K.; CARLSSON, M.; SKARTVED, N. J.; RIESBECK, K.; SØGAARD, M.; DOHLSTEN, M. Long-term survival and complete cures of B16 melanoma-carrying animals after therapy with tumor-targeted IL-2 and SEA. **International Journal of Cancer**, v. 81, n. 1, p. 156–163, 1999.

ROSTOCK, M.; NAUMANN, J.; GUETHLIN, C.; GUENTHER, L.; BARTSCH, H. H.; WALACH, H. Classical homeopathy in the treatment of cancer patients: a prospective observational study of two independent cohorts. **BMC Cancer**, v. 11, p. 19-27, 2011.

SANDERSON, R. D.; YANG, Y.; KELLY, T.; MACLEOD, V.; DAI, Y.; THEUS, A. Enzymatic remodeling of heparan sulfate proteoglycans within the tumor microenvironment: growth regulation and the prospect of new cancer therapies. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 96, n. 5, p. 897–905, 2005.

SATO, D.; WAL, R.; DE OLIVEIRA, C.; CATTANEO, R.; 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, n. 1, p. 26–32, 2005.

SCHAER, D. A.; LESOKHIN, A. M.; WOLCHOK, J. D. Hiding the road signs that lead to tumor immunity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 10, p. 1937–1940, 2011.

SEARS, R.; NUCKOLLS, F.; HAURA, E.; TAYA, Y.; TAMAI, K.; NEVINS, J. R. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. **Genes & Development**, v. 14, n. 19, p. 2501–2514, 2000.

SIEGEL, R.; MA, J.; ZOU, Z.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2014. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 64, n. 1, p. 9–29, 2014.

SINGH, Y. Tumor angiogenesis: clinical implications. **Nepal Journal of Neurosciences**, v. 1, n. 2, p. 61–63, 2004.

SIRONEN, R. K.; TAMMI, M.; TAMMI, R.; AUVINEN, P. K.; ANTTILA, M.; KOSMA, V. M. Hyaluronan in human malignancies. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 4, p. 383–391, 2011.

SNIGDHA, S.; SMITH, E. D.; PRIETO, G. A.; COTMAN, C. W. Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death. **Neuroscience Bulletin**, v. 28, n. 1, p. 14–24, 2012.

STEEG, P. S. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 1, p. 55–63, 2003.

STEVENS, T. Functional and molecular heterogeneity of pulmonary endothelial cells. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 8, n. 6, p. 453–457, 2011.

STREET, S. E. A.; CRETNEY, E.; SMYTH, M. J. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. **Blood**, v. 97, n. 1, p. 192–197, 2001.

TAKAHASHI, Y.; NISHIKAWA, M.; SUEHARA, T.; TAKIGUCHI, N.; TAKAKURA, Y. Gene silencing of beta-catenin in melanoma cells retards their growth but promotes the formation of pulmonary metastasis in mice. **International Journal of Cancer**, v. 123, n. 10, p. 2315–2320, 2008.

TAKAHASHI, Y.; NISHIKAWA, M.; TAKAKURA, Y. Suppression of tumor growth by intratumoral injection of short hairpin RNA-expressing plasmid DNA targeting beta-catenin or hypoxia-inducible factor 1alpha. **Journal of Controlled Release**, v. 116, n. 1, p. 90–95, 2006.

THOMPSON, E.; KASSAB, S. Homeopathy in cancer care. **Alternative Therapies in Health and Medicine**, v. 16, n. 3, p. 12–16, 2000.

TSAI, J.; LEE, J. T.; WANG, W.; ZHANG, J.; CHO, H.; MAMO, S.; BREMER, R.; GILLETTE, S.; KONG, J.; HAASS, N. K.; SPROESSER, K.; LI, L.; SMALLEY, K. S. M.; FONG, D.; ZHU, Y. L.; MARIMUTHU, A.; NGUYEN, H.; LAM, B.; LIU, J.; CHEUNG, I.; RICE, J.; SUZUKI, Y.; LUU, C.; SETTACHATGUL, C.; SHELLOOE, R.; CANTWELL, J.; KIM, S. H.; SCHLESSINGER, J.; ZHANG, K. Y. J.; WEST, B. L.; POWELL, B.; HABETS, G.; ZHANG, C.; IBRAHIM, P. N.; HIRTH, P.; ARTIS, D. R. HERLYN, M.; BOLLAG, G. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 8, p. 3041–3046, 2008.

TU, S.; BHAGAT, G.; CUI, G.; TAKAISHI, S.; KURT-JONES, E. A.; RICKMAN, B.; BETZ, K. S.; PENZ-OESTERREICHER, M.; BJORKDAHL, O.; FOX, J. G.; WANG, T. C. Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. **Cancer Cell**, v. 14, n. 5, p. 408–419, 2008.

VAN DEN BROEK, M.; KÄGI, D.; ZINKERNAGEL, R. M.; HENGARTNER, H. F. Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control in vivo. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 12, p. 3514–3516, 1995.

VASEVA, A. V.; YALLOWITZ, A. R.; MARCHENKO, N. D.; XU, S.; MOLL, U. M. Blockade of Hsp90 by 17AAG antagonizes MDMX and synergizes with Nutlin to

- induce p53-mediated apoptosis in solid tumors. **Cell Death & Disease**, v. 2, p. 1-11, 2011.
- VAUX, D. L.; FIDLER, F.; CUMMING, G. Replicates and repeats — what is the difference and is it significant? A brief discussion of statistics and experimental design. **EMBO Reports**, v. 13, n. 4, p. 291–296, 2012.
- VESELY, M. D.; KERSHAW, M. H.; SCHREIBER, R. D.; SMYTH, M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 235–271, 2011.
- VIVIER, E.; TOMASELLO, E.; BARATIN, M.; WALZER, T.; UGOLINI, S. Functions of natural killer cells. **Nature Immunology**, v. 9, n. 5, p. 503–510, 2008.
- WAGNER, M.; SUAREZ, E. R.; THEODORO, T. R.; MACHADO FILHO, C. D. S.; GAMA, M. F. M.; TARDIVO, J. P.; PASCHOAL, F. M.; PINHAL, M. A. S. Methylene blue photodynamic therapy in malignant melanoma decreases expression of proliferating cell nuclear antigen and heparanases. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 37, p. 527-533, 2012.
- WELCH, D. R. Technical considerations for studying cancer metastasis in vivo. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 15, n. 3, p. 272–306, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. **WHO-Geneva**, v. 1, p. 1–74, 2000.
- YIN, G.; YAN, C.; BERK, B. C. Angiotensin II signaling pathways mediated by tyrosine kinases. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 35, p. 780–783, 2003.
- YOUN, J. I.; NAGARAJ, S.; COLLAZO, M.; GABRILOVICH, D. I. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 8, p. 5791–5802, 2008.
- ZAKI, K. A.; BASU, B.; CORRIE, P. The role of angiogenesis inhibitors in the management of melanoma. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 32–49, 2012.
- ZHOU, P.; SHAFFER, D. R.; ALVAREZ ARIAS, D. A.; NAKAZAKI, Y.; POS, W.; TORRES, A. J.; CREMASCO, V.; DOUGAN, S. K.; COWLEY, G. S.; ELPEK, K.; BROGDON, J.; LAMB, J.; TURLEY, S. J.; PLOEGH, H. L.; ROOT, D. E.; LOVE, J. C.; DRANOFF, G.; HACOEN, N.; CANTOR, H.; WUCHERPFENNIG, K. W. In vivo discovery of immunotherapy targets in the tumour microenvironment. **Nature**, v. 506, n. 7486, p. 52–57, 2014.

ZITVOGEL, L.; GALLUZZI, L.; SMYTH, M. J.; KROEMER, G. Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance. **Immunity**, v. 39, n. 1, p. 74–88, 2013.