

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCINE BITTENCOURT POTRICH

**Complexos naturais altamente diluídos reduzem fenótipo metastático de
células de melanoma murino (B16F10)**

CURITIBA, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCINE BITTENCOURT POTRICH

Complexos naturais altamente diluídos reduzem fenótipo metastático de células de melanoma murino (B16F10)

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
Coorientadora: Prof^a. Dra. Carolina Camargo de Oliveira

CURITIBA, 2014

AGRADECIMENTOS

Primeiramente devo agradecer aos meus pais e irmãos, que durante toda a trajetória acadêmica me incentivou e apoiou. Pela disponibilidade; ajuda financeira; apoio moral, emocional e espiritual. Sem isso não é possível fazer Pós Graduação. Obrigada pela compreensão nos meus momentos de ausência como filha e irmã!

Ao meu companheiro que participou dessa trajetória e vivenciou profundamente essa jornada, que é o doutoramento. Obrigada pela paciência, pelas sábias palavras nos momentos certos e pelas distrações importantes para o manutenção de minha sanidade mental, o seu amor e compreensão foram fundamentais para o término do trabalho.

Não posso deixar de agradecer ao meu companheiro de “estudos *in home*”, Rocky, mais conhecido como Rocky Balburdia. Sem ele, com certeza os dias de doutorado não seriam tão bons.

Aos meus orientadores pela oportunidade de trabalho. A troca de aprendizado entre nós foi muito rica, não apenas no âmbito profissional mas também no pessoal.

Aos meus colegas de laboratório: Victor, Lucas, Stellee, Simone, Diogo, Aline, Gustavo, Bia, Daniel, Jê, Kátia, Flávia, Cléber e outros que passaram mas deixaram coleguismo. Muito obrigada.

À Dorly e a Célia, professoras integrantes do grupo de pesquisa, que de uma forma ou de outra contribuíram com seus conhecimentos, e também pelas risadas que demos, pois vocês são muito divertidas!!

Ao meu amigo Thiago Jacomasso, pela super colaboração e ensinamento (PCR, zimo...). Muitíssimo obrigada!

À Prof. Sheila Winnischofer, pela disponibilização do laboratório, e por ser sempre muito querida!

Aos meus amigos que transcendem o ambiente de trabalho, Maria Fernanda, Jana e Dani, muito obrigada pelos momentos de lazer, pelos desabafos, vocês são importantes em muitos momentos da minha vida!!!

Aos técnicos Israel e Alessandra, por serem sempre disponíveis e muito competentes!

Agradeço a todos os outros professores e profissionais que fizeram parte desse grande trabalho!

À CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

“Perguntaram ao Dalai Lama:

- O que mais te surpreende na Humanidade?

E ele respondeu:

- Os homens... Porque perdem a saúde para juntar dinheiro, depois perdem dinheiro para recuperar a saúde.

E por pensarem ansiosamente no futuro, esquecem do presente de tal forma que acabam por não viver nem o presente nem o futuro. E vivem como se nunca fossem morrer... e morrem como se nunca tivessem vivido”.

RESUMO

O melanoma é um tipo de câncer de pele altamente metastático. Drogas quimioterápicas convencionais usadas atualmente possuem efeitos limitados, assim, terapias mais efetivas são necessárias. Este trabalho objetivou a investigação e elucidação de possíveis mudanças nas características das células de melanoma B16F10, desencadeadas pelo tratamento *in vitro* com os complexos naturais altamente diluídos (M1 ou M8). Para tanto, as células foram tratadas por 96 horas com M1 ou com M8 e diversos parâmetros foram analisados, enfocando possíveis alterações na expressão de mRNA de proteínas envolvidas na invasão, migração e proliferação celular; bem como avaliação de moléculas envolvidas em espécies reativas; na melanogênese e mecanismo de resistência a multidrogas. Por fim, avaliação em glicoconjugados foi realizada. Os resultados mostram claramente que o tratamento com M1 ou M8 reduz características metastáticas importantes, evidenciada, pela diminuição da expressão de metaloproteases (MT1-MMP, MMP-2 e MMP-9), e de sua atividade gelatinase; bem como da migração celular. Essa última, foi, possivelmente, decorrente do aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), liberação de óxido nítrico (NO) e redução de NO intracelular. Curiosamente esse efeito foi acompanhado pela redução na síntese de melanina e atividade e expressão da tirosinase (TYR), bem como da expressão gênica da TYRP-1, TYRP-2 e do MITF. Por fim, observou-se redução do mecanismo de resistência a multidrogas (transportadores ABC). Quanto aos glicoconjugados, houve uma clara redução da secreção de ácido hialurônico e da expressão gênica de hialuronidases. Ainda, foi evidente a redução da expressão gênica de proteoglicanos e de enzimas que modificam heparam sulfato. Esses resultados em conjunto sugerem que características fenotípicas metastáticas são modificadas pelo tratamento com M1 e M8, justificando os resultados anteriores encontrados *in vitro* e *in vivo*. Assim, esses complexos podem ser considerados candidatos promissores na terapia do câncer, embora estudos mais aprofundados devam ser realizados para melhor entendimento dos seus mecanismos de ação.

Palavras chaves: complexo natural altamente diluído, melanoma, migração, metaloproteases, melanogênese, glicosaminoglicanos e proteoglicanos.

ABSTRACT

Melanoma is a highly metastatic skin cancer type. Conventional chemotherapy drugs currently in use are of limited value, thus more effective therapies are needed. This work aimed at investigation and elucidation of possible changes in tumor cell features triggered by highly diluted natural complex (M1 and M8) *in vitro* treatment using B16F10 melanoma cells. For this, cells were treated upon 96h with either M1 or M8 and several parameters were analyzed, focusing on possible changes in mRNA expression of invasion related proteins, migration and proliferation; and evaluation of reactive species; melanogenesis and multidrug resistance mechanism. Finally, glycoconjugates evaluation was performed. The results clearly demonstrated that M1 and M8 treatment accounts to reduction in metastasis related features important by decreasing metalloproteases gene expression (MT1-MMP, MMP-2 and MMP-9), and your gelatinase activity, as well as cell migration. The latter was, possibly due to increased reactive oxygen (ROS), release of nitric oxide (NO) and reduction intracellular NO. Interestingly this effect was accompanied by melanin synthesis reduction and activity and expression reduction of tyrosinase (TYR), as well as TYRP-1, TYRP-2 and MITF expression. Finally, was observed reduction of drugs resistance mechanism (ABC transporters). As for glycoconjugates, there was a clear reduction in the secretion of hyaluronic acid and the gene expression of hyaluronidases. Still, it was evident the reduction of gene expression of proteoglycans and heparan sulfate enzymes modifiers. Taken together these findings suggest that metastatic phenotypic characteristics are modified by M1 and M8 treatment, justifying previous *in vitro* and *in vivo* findings. Thus these complexes can be considered as promising cancer therapy candidates, although further studies should be conducted to better understand their way of action.

Key-words: highly diluted natural complex, melanoma, migration, metalloproteases, melanogenesis, glycosaminoglycans, proteoglycans.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Marcadores do câncer.....	16
FIGURA 2. Estimativa dos tipos de câncer mais incidentes no mundo..	18
FIGURA 3. Estimativa dos tipos de câncer mais incidentes nos estados unidos.	19
FIGURA 4. Estimativa dos tipos de cânceres mais incidentes no brasil.....	20
FIGURA 5. Figura representativa dos extratos da pele.	23
FIGURA 6. Diferentes etapas do desenvolvimento do melanoma.....	24
FIGURA 7. Etapas iniciais das mudanças fenotípicas na melanomagênese.....	26
FIGURA 8. Representação esquemática do processo de metástase.....	27
FIGURA 9. Domínio estrutural das mmmps.....	30
FIGURA 10. Estágios de desenvolvimento do melanossomo.....	34
FIGURA 11. Estrutura química dos GAGs.....	38
FIGURA 12. Mecanismo de ação do ah no câncer.....	40
FIGURA 13. Estruturas de ligação dos GAGs nos proteoglicanos.....	41
FIGURA 14. Sítios de ação de sheddases, heparanases e sulfatases.....	46
FIGURA 15. Metástase pulmonar pela interação GAG-RAGE.....	48
FIGURA 16. Retrato de Christian Friedrich Samuel Hahnemann.....	52
FIGURA 17. Expressão de mRNA de MMPs e TIMPs, e atividade gelatinase de MMPs.....	80
FIGURA 18. Imunocitoquímica para detecção de NFκB.	81
FIGURA 19. Migração celular avaliada pelo método <i>scratch</i>	83
FIGURA 20. Migração celular pelo método do transwell.....	84
FIGURA 21. Análise da concentração intracelular de ROS e de NO e extracelular de nitrito.....	85
FIGURA 22. Avaliação da atividade e permeabilidade de membrana mitocondrial... 86	86
FIGURA 23. Avaliação da viabilidade celular com Anexina-V/7-AAD.....	87
FIGURA 24. Avaliação do conteúdo de melanina, atividade da tirosinase <i>in situ</i> e expressão de mRNA de proteínas melanogênicas.....	89
FIGURA 25. Avaliação do mecanismo de resistência a multidrogas.....	91
FIGURA 26. Detecção de carboidratos pela coloração com PAS.....	93
FIGURA 27. Quantificação de carboidratos utilizando lectina WGA.....	94
FIGURA 28. Quantificação da subunidade β1 da integrina.....	95
FIGURA 29. Quantificação de ácido hialurônico.....	96
FIGURA 30. Avaliação da expressão de mRNA de enzimas que degradam ácido hialurônico.....	97
FIGURA 31. Expressão gênica do proteoglicano de condroitim sulfato 4 (PGCS-4)..	98
FIGURA 32. Expressão gênica e qualitativa de sindecam-1.....	100
FIGURA 33. Expressão gênica de sindecam-2.....	101
FIGURA 34. Expressão gênica de glipicam-3.....	102
FIGURA 35. Expressão gênica de perlecam.....	103
FIGURA 36. Expressão gênica de enzimas que modificam heparam sulfato.....	104

FIGURA 37. Esquema do mecanismo de ação pelo qual os complexos M1 e M8 podem atuar.....	117
---	-----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Composição dos complexos naturais altamente diluídos com diluição inicial e final de cada elemento.....	63
TABELA 2. Sequência e concentração dos primers utilizados nos experimentos de qRT-PCR.	66

LISTA DE ABREVIATURAS

- AH - Ácido hialurônico
- cAMP - adenosina 3'5'-monofosfato cíclico
- CAM – Moléculas de adesão celular
- CDKN2A – Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A
- CDK4 – Quinase dependente de ciclina 4
- CS – Condroitim sulfato
- DAN - 2,3-diaminonaftaleno
- DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DCT – Dopa cromo tautomerase
- DS – Dermatam sulfato
- FITC - Isotiocianato de fluoresceína
- GAGs – Glicosaminoglicanos
- GPI – Glicosil fosfatidil inositol
- HS – Heparan sulfato
- PGHS – Proteoglicano de heparan sulfato
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
- MC1-R – Receptor de melanocortina-1
- MEC – Matriz extracelular
- MDR – Mecanismo de resistência a drogas
- MDR1/P-gp - proteína multidrogas resistentes 1
- MITF – Fator tumoral de microftalmia
- MMPs – Metaloproteases
- MMP-2 – Metaloprotease-2
- MMP-9 – Metaloprotease-9
- mRNA – RNA mensageiro
- MRP-1 - Proteína 1 associada a resistência multidrogas
- MTT – brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
- MT1-MMP – Metaloprotease transmembrânica 1
- NK – Células *natural killer*
- NO – Óxido nítrico
- OMS – Organização Mundial da Saúde

O_2^- - Ânion superóxido

PAS - Ácido periódico-Schiff

PGs – Proteoglicanos

PGCS – Proteoglicano de condroitim sulfato

PTEN – Proteína homóloga a tensina fosfatase

RGP- Fase de crescimento radial

RHAMN - receptor de motilidade mediado por hialuronam

RNA – Ácido Ribonucleico

RNS - Espécies reativas de nitrogênio

ROS – Espécies reativas de oxigênio

TIMPs – Inibidor tecidual de metaloproteases

TLR – Receptor *toll-like*

TYRP-1 – proteína relacionada a tirosinase 1

TYRP-2 - proteína relacionada a tirosinase 2

UV – Ultravioleta

VGP – Fase de crescimento vertical

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Câncer: aspectos gerais	14
2.2	Câncer: incidência mundial e no Brasil.....	17
2.2.1	Câncer de pele: Estimativas.....	21
2.2.2	Melanoma.....	22
2.2.3	Metástase.....	26
2.2.4	Moléculas cruciais no processo de migração ou invasão.....	28
2.3.	Carboidratos e sua Relação com o Câncer	36
2.3.2.	Sheddases, heparanases e sulfatases	45
2.4.	Tratamento atual.....	49
2.5.	Medicina Alternativa e Complementar no tratamento do câncer	51
2.6.	Homeopatia	52
2.6.1.	Definição e História	52
2.6.2.	Origem e preparação dos produtos homeopáticos	56
2.7.	Homeopatia e Câncer	57
3.	JUSTIFICATIVA	59
4.	OBJETIVOS	60
4.1.	Objetivo Geral	60
4.2.	Objetivos Específicos	60
5.	PLANO DE TRABALHO	61
6.	MATERIAL E MÉTODOS	62
6.1.	Complexos naturais altamente diluídos.....	62
6.2.	Linhagem celular e procedimentos de cultivo	63
6.3.	Tratamento in vitro	63
6.4.	Extração de RNA e síntese de cDNA	64
6.5.	Quantificação da expressão gênica por qRT-PCR	64

6.6.	Atividade de metaloproteases por zimografia	67
6.7.	Imunocitoquímica para NF κ B p65.....	67
6.8.	Ensaio de migração celular	68
6.9.	Densidade celular	69
6.10.	Detecção de espécie reativa de oxigênio e óxido nítrico (ROS e NO)...	70
6.11.	Ensaio para detecção da concentração de nitrito	70
6.12.	Atividade mitocondrial pelo método MTT	71
6.13.	Método de avaliação do potencial de membrana mitocondrial por Rodamina 123 (Rho 123).....	72
6.14.	Viabilidade Celular com Anexina – V/7-AAD.....	72
6.15.	Análise do conteúdo de melanina	73
6.16.	Atividade da tirosinase intracelular	73
6.17.	Atividade do mecanismo de resistência a multidrogas (MDR)	74
6.18.	Coloração de carboidratos com PAS	74
6.19.	Marcação com lectina WGA	75
6.20.	Quantificação em citometria de fluxo.....	75
6.20.1.	Lectina WGA.....	75
6.20.2.	Integrina β -1	76
6.21.	Extração e dosagem de ácido hialurônico.....	76
6.22.	Imunocitoquímica para marcação de Sindecam-1	78
6.23.	Análise estatística	78
7.	RESULTADOS	79
7.1.	Parte 1 – Avaliação dos efeitos dos complexos no fenótipo da célula B16F10.....	79
7.1.1.	M1 e M8 reduzem a expressão de mRNA e a atividade de metaloproteases.....	79
7.1.2.	M1 e M8 reduzem NF κ B	81
7.1.3.	M1 e M8 reduzem a capacidade migratória das células	82
7.1.4.	A concentração de ROS, NO e de nitrito foi alterada pelo M1 e M8	85
7.1.5.	M1 e M8 não alteram a viabilidade celular	86
7.1.6.	M1 e M8 levam à diminuição de melanina e da atividade da tirosinase....	87

7.1.7. M1 altera o mecanismo de resistência à drogas	90
7.2. Parte 2 - Avaliação dos efeitos dos complexos em carboidratos e glicoconjugados	92
7.2.1. Detecção de carboidratos totais	92
7.2.2. Avaliação de glicoproteínas	95
7.2.3. Quantificação de ácido hialurônico	96
7.2.4. Alterações em proteoglicanos	97
7.2.4.1. Proteoglicano de condroitim sulfato 4	98
7.2.4.2. Proteoglicanos de heparam sulfato	98
7.2.4.3. Enzimas que modificam heparam sulfato	104
8. DISCUSSÃO	105
9. CONCLUSÕES	118
10. REFERÊNCIAS	119

1 INTRODUÇÃO

O melanoma é a forma mais agressiva de câncer de pele e destaca-se por possuir alta capacidade metastática, representando um significativo e crescente problema de saúde pública mundial. Além disso, esse câncer não é responsivo aos tratamentos convencionais (quimioterapia ou radioterapia), os quais provocam vários efeitos colaterais, reduzindo a qualidade de vida do paciente. Assim, uma estratégia interessante para o tratamento do melanoma seria a utilização de medicamentos que agissem de forma múltipla, isto é, capazes de atingir diversos alvos, resultando na redução ou inibição da capacidade metastática. Nesse sentido destaca-se o uso de complexos naturais altamente diluídos. Esses medicamentos compreendem uma combinação de compostos diferentes, derivados de diversas matrizes, as quais são conhecidas por desencadear reações ou sintomas de uma determinada doença, mas que em alta diluição podem atuar em sua cura. Estudos anteriores demonstraram que os tratamentos com esses complexos apresentaram diversos efeitos antitumorais em modelos de melanoma, dentre os quais se destacam: I) reconhecimento de células de melanoma por linfócitos; II) redução do potencial invasivo; III) redução da quantidade e do tamanho dos nódulos tumorais em modelo de metástase pulmonar e IV) diminuição da expressão de componentes da matriz extracelular capazes de gerar um microambiente favorável a neovascularização e invasão (GUIMARÃES *et al.*, 2009, 2010). Cabe destacar que não foi observada nenhuma toxicidade nas concentrações usadas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar *in vitro* os mecanismos moleculares e celulares pelos quais os complexos agem e que justifiquem a atividade antitumoral vista nos trabalhos anteriores. Para isso, a ação dos complexos em modular: a) a expressão de mRNA de proteínas envolvidas na invasão; b) a migração celular; c) a proliferação; d) a alteração em espécies reativas; e) a viabilidade; f) a melanogênese; g) carboidratos totais e h) proteoglicanos, foram objetivos do presente trabalho. Os cânceres, assim como o melanoma, possuem uma característica em comum - a capacidade de metastizar - isto é, as células do tumor primário migram através do tecido e invadem órgãos secundários, colonizando-os. Assim, esse é o ponto crítico para o desenvolvimento da doença. Terapias que consigam reduzir a capacidade migratória e invasiva são potenciais agentes terapêuticos. Os resultados obtidos mostram que

todos os parâmetros que estão alterados no melanoma, e são intimamente ligados ao fenótipo metastático, foram reduzidos após o tratamento tanto com o complexo M1, quanto com o M8, mostrando que ambos são agentes promissores para o tratamento adjuvante do melanoma devido a suas ações redutoras do potencial metastático.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer: aspectos gerais

A mais antiga descrição do câncer, inclusive com tratamento cirúrgico, data de 1600 a.C, no Egito. Em antigos papiros podem ser constatados oito casos de tumores de mama e os tratamentos realizados por cauterização (VISVADER, 2011). A palavra câncer deriva de uma observação feita por Hipócrates (460 a 377 a.C.), o pai da medicina, a qual se refere à espessura e formato dos vasos sanguíneos que nutrem as células tumorais e que se assemelham as garras de caranguejo, que no zodíaco representa o signo de câncer (Revisado por FEINBERG; OHLSSON; HENIKOFF, 2006).

Em meados do século XIX, patologistas observavam e descreviam o câncer como sendo células que adquiriam características em diferentes estágios de desenvolvimento. Foi no século passado que conceitos genéticos predominaram, começando por Theodor Heinrich Boveri (1862-1915) que primeiro sugeriu anormalidades nos cromossomos de células tumorais. Atualmente as mudanças moleculares que ocorrem dentre os mais diversos tipos de cânceres levam a idéia de que o câncer envolve uma série de doenças (Revisado por FEINBERG; OHLSSON; HENIKOFF, 2006).

Atualmente existe uma série de nomenclaturas que geralmente são usadas de forma incorreta, assim, algumas definições serão revisadas a seguir. O termo neoplasia refere-se a uma massa tumoral, composta por células que se proliferam descontroladamente. Os tumores são massas de células que podem ser classificados em benignos ou malignos. Os tumores benignos são constituídos simplesmente por uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao tecido original, raramente considerado um risco de vida. No entanto, os tumores malignos, ou neoplasias malignas, são massas de células que se proliferam rapidamente e que possuem alto potencial invasivo, podendo cair na corrente sanguínea, adentrar outros tecidos ou órgãos se proliferar lá, gerando tumores secundários (ou metástases), constituindo um câncer. Assim, o termo câncer pode ser definido como um conjunto de mais de 100 doenças, cada uma das quais com características genóticas e fenotípicas individuais, onde as

células tumorais possuem a capacidade de invadir tecidos e órgãos, gerando metástases (Instituto Nacional do Câncer – INCA).

Diversas linhas de pensamento, no ramo da investigação oncológica, indicam que a tumorigênese em humanos é um processo de múltiplas etapas, as quais refletem alterações genéticas que orientam transformações progressivas de células normais, às células altamente malignas. A transformação tumoral pode ser vista de forma análoga à evolução Darwiniana, na qual a sucessão de mudanças gênicas confere uma ou outra vantagem de crescimento levando a conversão gradativa de células normais a células tumorais (Revisado por: HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Durante os últimos 30 anos aproximadamente, o rápido avanço nos estudos do câncer têm revelado que esta patologia possui capacidade dinâmica de mudanças genômicas. Grandes esforços têm sido realizados na descoberta de mutações que produzem oncogenes, os quais adquirem de forma dominante determinada função; e também na descoberta de genes supressores tumorais, que passam ter funções recessivas ou suprimidas (Revisado por: HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Foi sugerido que, diante do vasto catálogo genotípico dos variados tipos de câncer, seis alterações essenciais na fisiologia celular ditam do desenvolvimento do tumor, até a malignidade, estas são:

- 1) auto suficiência nos sinais de crescimento;
- 2) insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento;
- 3) evasão à morte celular programada;
- 4) potencial replicativo ilimitado;
- 5) angiogênese sustentada e
- 6) invasão tecidual e metástase (Revisado por: HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Esse conjunto de alterações é denominado de marcadores tumorais, os quais estão ilustrados na Figura 1A.

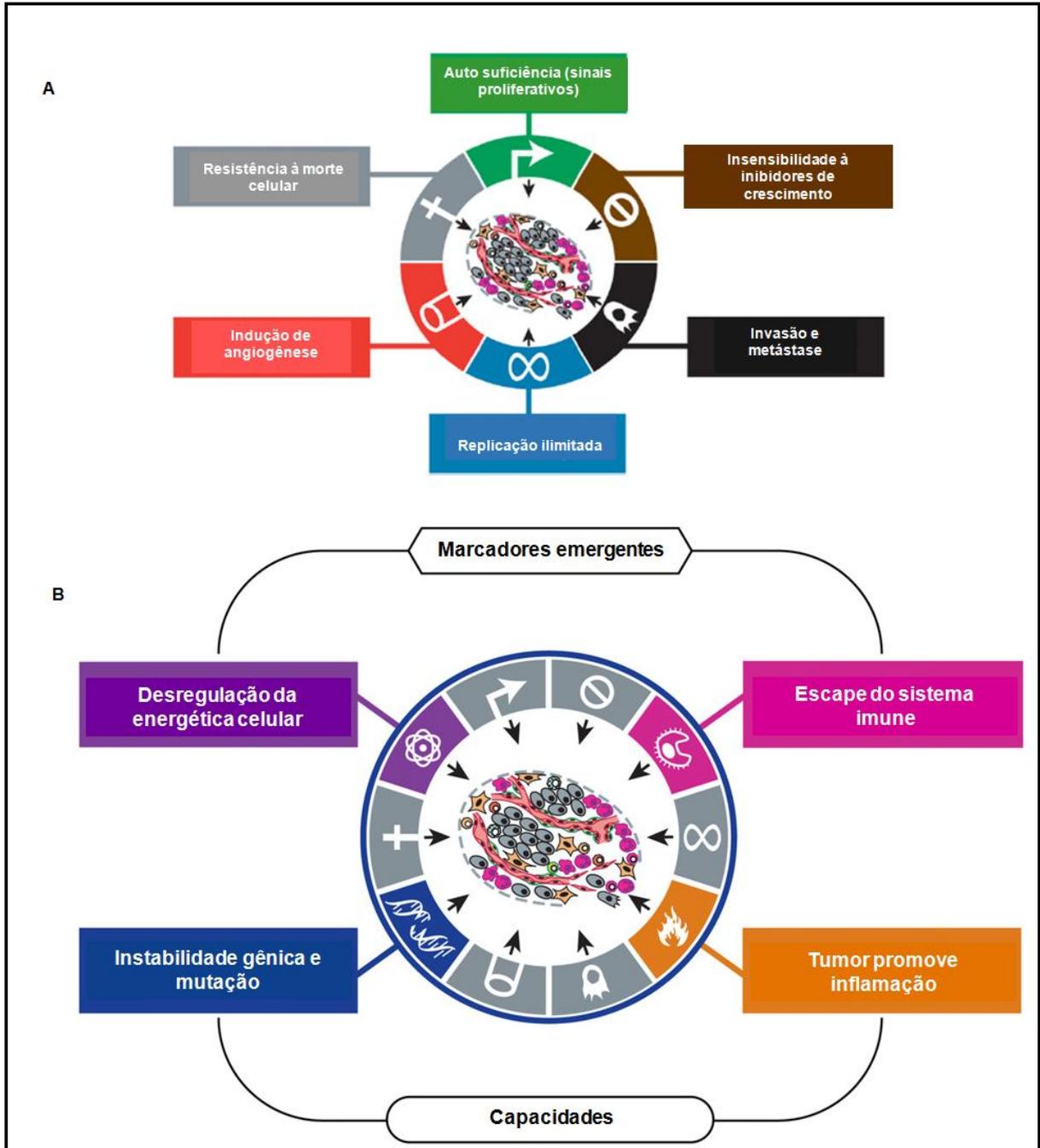


Figura 1. Marcadores do câncer. Diagrama que demonstra simplificadaamente as diferentes capacidades adquiridas durante a progressão tumoral, encontradas em muitos, senão em todos os tipos de tumores, embora através de diferentes mecanismos. O diagrama A mostra os marcadores do câncer propostos por Hanahan e Weinberg em 2000, e posteriormente foram adicionados mais dois marcadores e outras duas capacidades tumorais (B) (Fonte: adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Recentemente HANAHAN e WEINBERG (2011) introduziram mais dois novos marcadores tumorais (Figura 1B). O primeiro refere-se à capacidade de modificação ou reprogramação do metabolismo celular de maneira a tornar as células neoplásicas mais efetivas. O segundo permite que células tumorais escapem

da destruição imunológica, particularmente de linfócitos T e B, macrófagos e células *Natural Killer* (NK). Ainda foram introduzidos mais duas características adquiridas: a instabilidade gênica que contribui para o desenvolvimento de mutações, e a capacidade tumoral de gerar inflamação local (Figura 1B).

Cada uma dessas mudanças fisiológicas, que nada mais são do que capacidades adquiridas durante o desenvolvimento tumoral, representam o rompimento do sucesso dos mecanismos de defesa anticâncer nas células e tecidos (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Por fim, é proposto que todas as capacidades citadas acima, são compartilhadas por muitos e talvez por todos os tipos de tumores humanos (HANAHAN; WEINBERG, 2000; 2011).

Diante disso, é possível entender o quão difícil é a cura do câncer, já que o tratamento ideal seria baseado em um (ou mais) agente(s) terapêutico(s) que compreendesse e atingisse essa gama de fenótipos adquiridos pelas células cancerosas.

2.2 Câncer: incidência mundial e no Brasil

Informações como: “Aumento da incidência...”, ou “Aumento da mortalidade...” nos leva a interpretar que o câncer é uma doença moderna, o que não é verdade. Primeiramente, o câncer e as doenças cardíacas são as principais causas de mortes em pessoas idosas, e essa informação somente é verdadeira nas últimas décadas do século passado em que as pessoas passaram a viver 70, 80 ou 90 anos, idade em que as doenças crônicas são mais comuns. Nesse sentido, se observarmos a expectativa de vida dos Egípcios antigos, pode-se constatar que era de 40 anos, o que perdurou até a Idade Média. O aumento da expectativa de vida ocorreu quando houve o controle ou a cura de doenças fatais como a peste, cólera, diabetes, desnutrição e doenças infecciosas, como a tuberculose. Na Inglaterra, entre o período de 1850-1970, houve uma drástica redução estatística com relação a maior causa de morte da época, a tuberculose. Nesse caso, os números caíram de 2.901 casos/milhão de habitantes/ano em 1850 para 13 casos/milhão de habitantes/ano em 1970. Doenças como: febre escarlatina, difteria, coqueluche, sarampo, varíola, tifo e tuberculose não respiratória, foram eliminadas como causas

de morte. Esses progressos foram tão significativos, que esse período foi considerado como a “era ouro” para a medicina e a saúde pública. O segundo ponto é que houve melhora significativa no diagnóstico clínico (diagnóstico de imagem e outras técnicas) o que leva ao aumento de casos diagnosticados e, dessa forma, registrados.

No entanto, é fato que, embora existam razões para um aumento artefactual da incidência do câncer, existe indubitavelmente um aumento real no número de pessoas que desenvolvem câncer devido ao aumento da exposição a agentes etiológicos, provenientes do estilo de vida atual (World Cancer Report, 2008).

Hoje o câncer é uma das principais causas de morte no mundo, com o número de mortes projetado a aumentar marcadamente com o passar dos anos (VISVADER, 2011). Ainda, em países economicamente desenvolvidos o número de mortes por câncer é maior do que em países em desenvolvimento como se pode observar na Figura 2. Esse fato é resultado do envelhecimento da população e da adoção de estilo de vida propícia ao desenvolvimento do câncer, bem como: fumo, inatividade física e dieta “ocidentalizada” (JEMAL; BRAY; FERLAY, 2011).

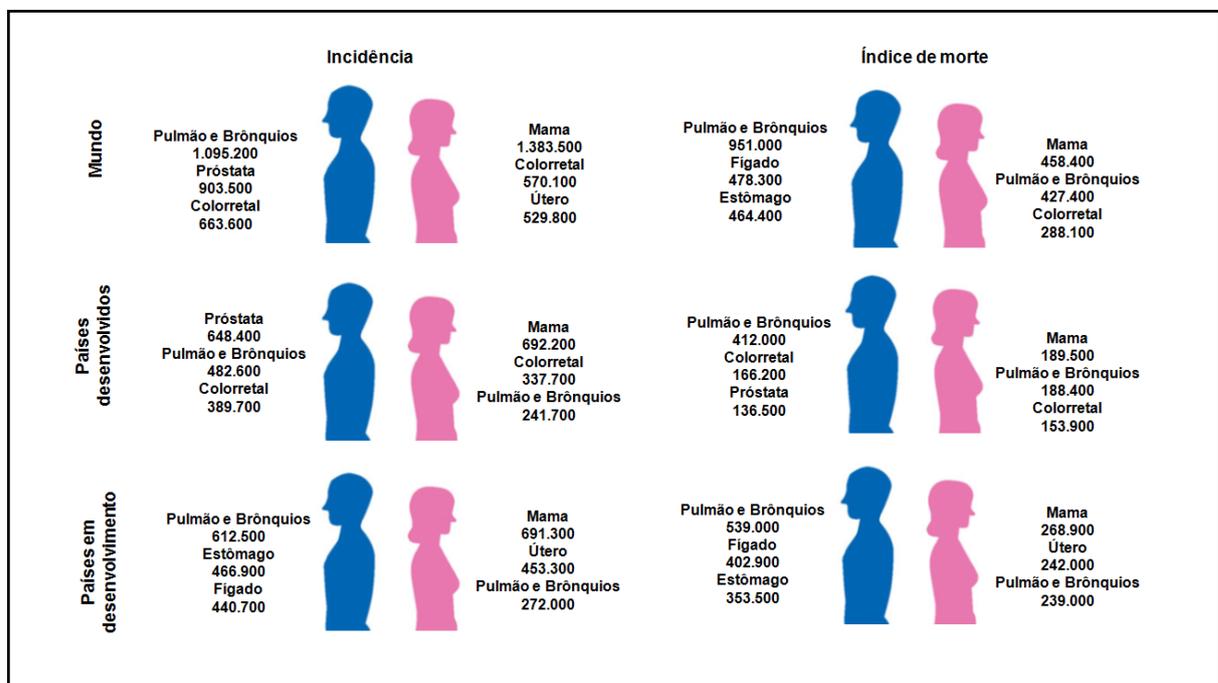


Figura 2. Estimativa dos tipos de câncer mais incidentes no mundo. A figura acima mostra os principais tipos de câncer em 2008, separados por incidência e índice de morte por sexo, que foram registrados no mundo, considerando países desenvolvidos e em desenvolvimento (Fonte: adaptado de JEMAL; BRAY; FERLAY, 2011).

Nos Estados Unidos o câncer é o maior problema de saúde pública, sendo o responsável por uma (1) em quatro (4) mortes (SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013). De todos os tipos de cânceres os mais prevalentes em homens americanos são: de próstata (28% dos casos), de pulmão e brônquios (14% dos casos) e colorretal (9% dos casos), onde o câncer de pulmão é o que causa maior número de mortes (28%). Já em mulheres americanas, os cânceres mais predominantes são: de mama (29%), de pulmão e brônquios (14%) e colorretal (9%), onde o câncer de pulmão também é o que possui maior índice de morte (26%), seguido pelo câncer de mama (14%) (Figura 3) (SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013).

A organização mundial da saúde (OMS) estimou que, no ano de 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas, anualmente, com câncer (INCA, 2011).

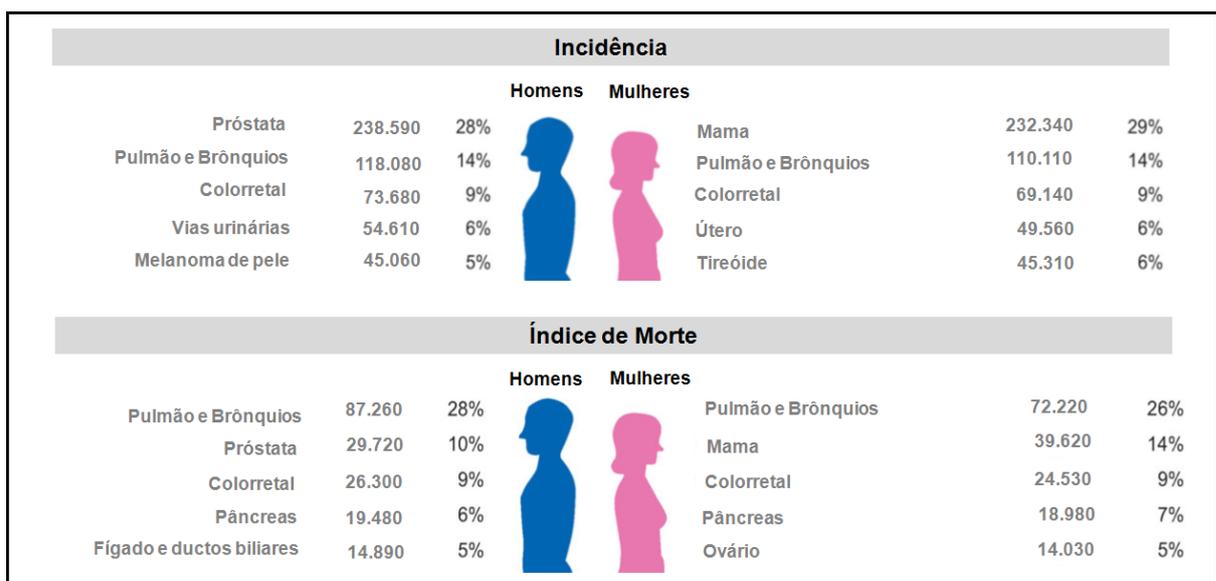


Figura 3. Estimativa dos tipos de câncer mais incidentes nos Estados Unidos. Principais tipos de cânceres incidentes e índice de morte por sexo nos Estados Unidos, uma estimativa do ano de 2013 (Fonte: adaptado de SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013).

Com relação às doenças que acometem a população brasileira, segue-se a mesma tendência mundial, com importantes mudanças no perfil de enfermidades, observando-se que a partir de 1960, aquelas doenças infecciosas e parasitárias deixaram de ser a principal causa de morte, substituída pelas doenças do aparelho circulatório e pelas neoplasias (INCA, 2011). Como já relatado anteriormente, essa transição epidemiológica tem como principal fator o aumento da expectativa de vida

da população, resultante do processo de urbanização e das ações de promoção e recuperação da saúde.

Em 2011 foi realizada uma previsão que no Brasil em 2013, haveria aproximadamente 518.510 novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma. Sem os casos não melanoma haveria 385 mil novos casos. A expectativa dos tipos mais incidentes eram os cânceres de pele não melanoma (63 mil), de próstata (60 mil), de pulmão (17 mil), de colorretal (14 mil) e de estômago (13 mil) para os homens, totalizando 257.870 casos. Já em mulheres, a expectativa dos mais incidentes eram os cânceres de pele não melanoma (71 mil), mama (53 mil), colo do útero (18 mil), colorretal (16 mil) e glândula tireóide (10 mil), totalizando 260.640 casos (Figura 4) (INCA, 2011).

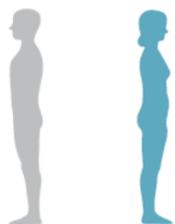
Localização primária					Localização primária		
	casos novos	percentual				casos novos	percentual
			Homens	Mulheres			
Próstata	60.180	30,8%			Mama Feminina	52.880	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.870	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%

Figura 4. Estimativa dos tipos de cânceres mais incidentes no Brasil. Distribuição por sexo dos dez tipos de cânceres mais incidentes, exceto pele não melanoma no Brasil. Da mesma forma que mostrado para os Estados Unidos, no Brasil em homens, o câncer de próstata é o mais incidente, enquanto que em mulheres a maior ocorrência está no de mama (Fonte: adaptado de INCA, 2011).

Assim, como no restante do mundo, o aumento da expectativa de vida, a melhoria e a evolução dos métodos diagnósticos podem explicar o aumento das taxas de incidências ao longo dos anos no Brasil (INCA, 2011).

Essa grande ocorrência do câncer demanda estratégias que permitam facilitar a detecção, melhorar a estratificação (classificação) dos tumores para guiar as terapias de forma mais efetiva, bem como desenvolver terapias preventivas (VISVADER, 2011).

2.2.1 Câncer de pele: Estimativas

Como o câncer de pele é muito comum, os dados mostrados anteriormente não o incluem nas estimativas. No entanto, o câncer de pele é o terceiro câncer mais comum em humanos e sua incidência global cresce a taxas alarmantes (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007; TROTTER *et al.*, 2013). Dentre os vários tipos de câncer de pele, as formas mais comuns são: o carcinoma basal, o carcinoma escamoso (ambos classificados como não melanoma) e o melanoma. É estimado que 2-3 milhões de casos surjam no mundo a cada ano, e embora o melanoma consista em aproximadamente 132.000 (cento e trinta e dois mil) desse total, essa forma é a mais agressiva e responsável pelo maior número de mortes dentre todos os tipos de câncer de pele. Quando o melanoma é diagnosticado em sua forma inicial, ele pode ser curado pela retirada cirúrgica. Entretanto quando adquire característica metastática, o prognóstico é muito ruim. A taxa média de sobrevivência nesses casos é de 6 meses, e menos de 5% dos pacientes conseguem sobreviver 5 anos (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007).

O melanoma acomete principalmente os caucasianos que moram em países com alta intensidade de radiação ultravioleta (UV), no entanto pode afetar todos os outros grupos étnicos. É na Austrália, onde a população é predominantemente branca e a radiação é muito alta, que há a maior ocorrência de melanoma (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007).

Para o melanoma os principais fatores de risco são: o histórico pessoal ou familiar, a exposição à radiação ultravioleta, doenças imunossupressoras e exposição ocupacional a substâncias cancerígenas (THOMPSON; SCOLYER; KEFFORD, 2005; IBRAHIM; HALUSKA, 2009; INCA, 2011).

Em 2013, nos Estados Unidos, foi estimado que 76.690 pessoas sejam diagnosticadas com melanoma, com uma média de idade de 59 anos. Estima-se também que a incidência de melanoma esteja aumentando 3,1% ao ano. No ano 2000 o risco de uma pessoa nascida nos Estados Unidos desenvolver melanoma foi estimado em 1 em 41 para homens e 1 em 61 para mulheres. Ainda, em mulheres entre 25 e 30 anos de idade, o melanoma é a causa mais comum de morte. Por fim, o melanoma é o quinto câncer mais comum em homens e o sétimo em mulheres (TROTTER *et al.*, 2013).

No Brasil, em 2012 foi estimada uma incidência de 3.170 casos em homens e 3.060 casos em mulheres, onde as maiores taxas estimadas para homens e mulheres encontram-se na região sul (INCA, 2011).

2.2.2 Melanoma

O primeiro caso conhecido de um paciente com melanoma foi publicado por John Hunter em 1787. Embora ele não tenha descrito a doença como melanoma, a amostra de uma parte da mandíbula de um homem de 35 anos de idade que está depositada e preservada no *Hunterian Museum of the Royal College of Surgeons* na Inglaterra, foi analisada em 1968 por Bodenham, que confirmou ser melanoma. Mas foi Rene Laennec, em 1806, o primeiro a descrever o melanoma como doença, dando o nome de “melanose negra” (IBRAHIM; HALUSKA, 2009).

O melanoma origina-se da transformação de melanócitos. Os melanócitos são células especializadas e encontradas predominantemente na pele e olhos, e são produtoras do pigmento melanina, que é responsável pela coloração da pele, dos olhos e do cabelo. Os melanócitos cutâneos originam-se de células progenitoras da crista neural que migram para a pele durante o desenvolvimento embrionário (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007). Essas células possuem propriedades similares a de células tronco associadas com sua auto renovação e diferenciação (REGAD, 2013). Na pele os melanócitos residem na camada basal da epiderme e nos folículos pilosos, e sua homeostasia é regulada por queratinócitos epidermais (Figura 5) (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007). Em resposta a radiação ultravioleta, os queratinócitos secretam fatores que regulam a sobrevivência dos melanócitos, bem como a diferenciação, proliferação, motilidade e produção de melanina. Dessa forma, os melanócitos tem papel chave na proteção da pele contra danos causados pela radiação UV e em prevenir o câncer de pele (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007).

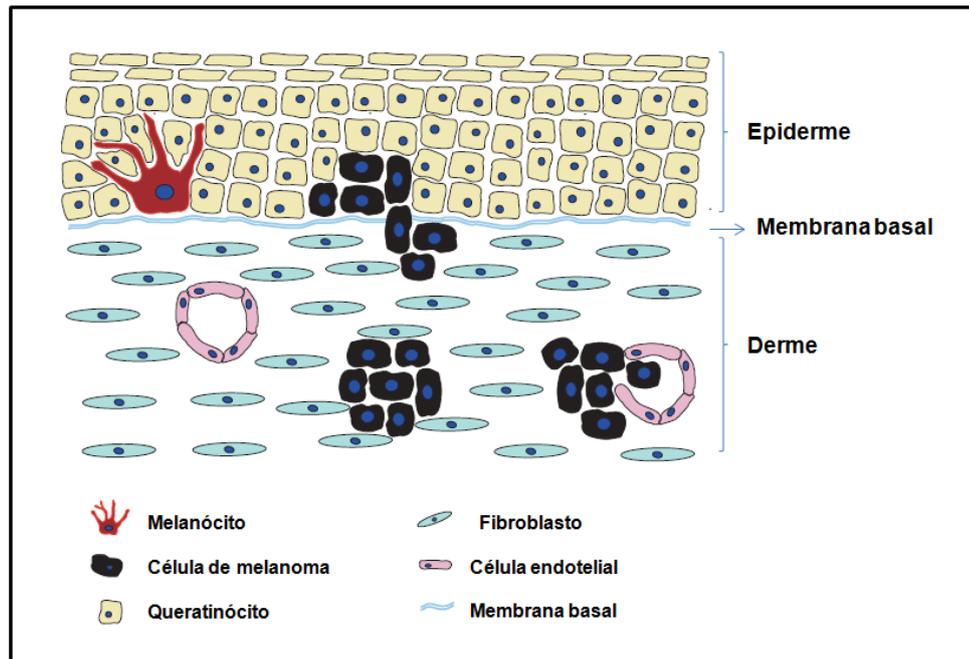


Figura 5. Figura representativa dos extratos da pele. A Figura mostra o melanócito e sua localização, bem como as células de melanoma em processo de migração e invasão. (Fonte: adaptado de HAASS, HERLYN, 2005).

Vários são os estágios da progressão melanocítica ao melanoma, cada uma das quais apresenta vantagens de crescimento sobre o tecido ao seu redor (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007). De uma maneira geral, o desenvolvimento das células ao melanoma e sua progressão são descritos em seis etapas, como segue: nevos melanocítico (1), nevos hiperplásico (2), nevos displásicos (3), melanoma primário de crescimento radial (RGP) (4), melanoma primário de crescimento vertical (VGP) (5) e melanoma metastático (6) (Figura 6) (Revisado por HAASS; HERLYN, 2005).

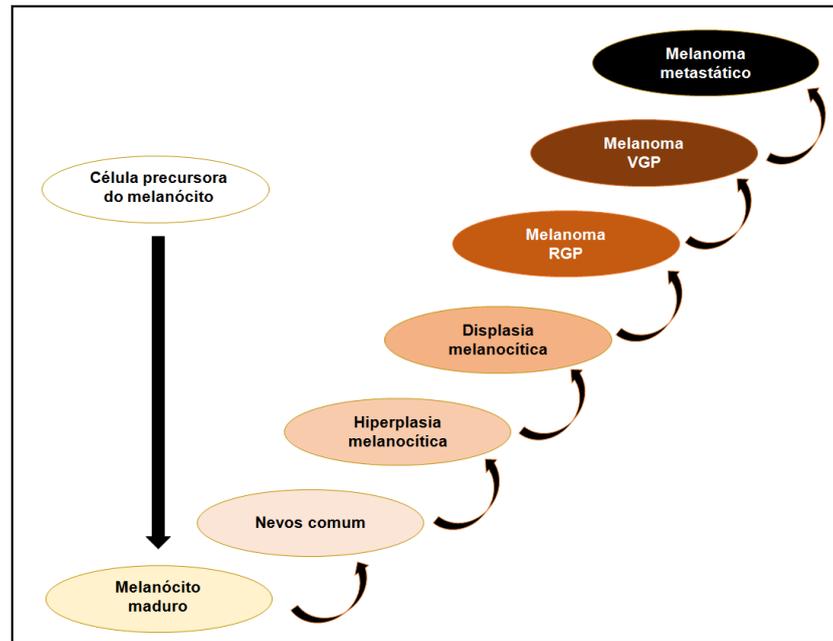


Figura 6. Diferentes etapas do desenvolvimento do melanoma. A Figura representa os diferentes estágios de desenvolvimento do melanoma, bem como sua progressão. Em cada uma das etapas as células adquirem vantagens uma sobre a outra, acumulando características que culminam com o fenótipo invasivo (Fonte: adaptado de HAASS; HERLYN, 2005).

Recentemente, a descoberta de genes envolvidos na predisposição e desenvolvimento ao melanoma seguida da identificação de novas mutações têm melhorado os mecanismos de entendimento desta doença fatal, e também, aumentado o sucesso de tratamentos geneticamente adaptados (IBRAHIM; HALUSKA, 2009).

A característica principal de células tumorais é a perda do controle da divisão celular, ocasionando proliferação descontrolada. Dentre várias vias que interferem positivamente na proliferação celular é a Ras/Raf/MEK/ERK, cuja via pode ser considerada a mais importante, onde a ERK é hiperativada em 90% dos melanomas humanos. Um dos mecanismos de ativação da via é através da mutação em NRAS, um dos três genes Ras (os outros dois são HRAS e KRAS). Este gene é mutado em 15% a 30% dos melanomas (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007), no entanto esta mutação é mais comum em nevos, atingindo 50% a 60% de incidência (IBRAHIM; HALUSKA, 2009). Outro componente comumente mutado nesta via é BRAF, um dos três genes humanos Raf (sendo os outros dois ARAF e CRAF). O BRAF é mutado em 50% a 70% dos melanomas, e a mutação mais comum é a substituição de ácido glutâmico por valina na posição 600 (V600E). BRAF_{V600E} estimula a sinalização constitutiva de ERK, estimulando a proliferação e

sobrevivência do tumor (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007). As mutações nesses dois genes (NRAS e BRAF) são consideradas importantes já que participam da inicialização da progressão à melanomagênese.

De forma geral, na Figura 7 podem ser visualizados os eventos que desencadeiam mudanças no fenótipo celular, que levam a melanomagênese. A mutação no gene BRAF_{V600E} é o evento inicial encontrado em nevos benignos, bem como mutação no gene NRAS, onde ambas as mutações estimulam ERK de forma constitutiva, favorecendo a proliferação celular. O polimorfismo do receptor de melanocortina-1 (MC1-R), encontrado especialmente na pele com danos induzidos pela exposição ao sol, aumenta o risco de desenvolvimento de melanoma com mutações em BRAF. A mutação ou perda do inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (CDKN2A) e da quinase dependente de ciclina 4 (CDK4), ocorrem em nevos displásicos, prejudicando o controle do ciclo celular, o que conseqüentemente desencadeia a proliferação celular descontrolada. A redução da expressão de E-caderina (molécula de adesão celular) com o conseqüente aumento de N-caderina é responsável pelo início da fase de crescimento vertical (VGF), na qual as células perdem adesão célula-célula; a perda ou mutação no gene homólogo a fosfatase e tensina (PTEN), um gene supressor tumoral, que também está envolvido nesse estágio. O fator de transcrição associado a microftalmia (MITF), a proteína supressora tumoral 53 (p53), o fator de ativação de apoptose 1 (APAF-1), a proteína anti-apoptótica Bcl-2, também estão envolvidos na progressão do melanoma, embora o estágio nos quais essas proteínas são mutadas ou perdidas ainda não sejam bem conhecidos (IBRAHIM; HALUSKA, 2009).

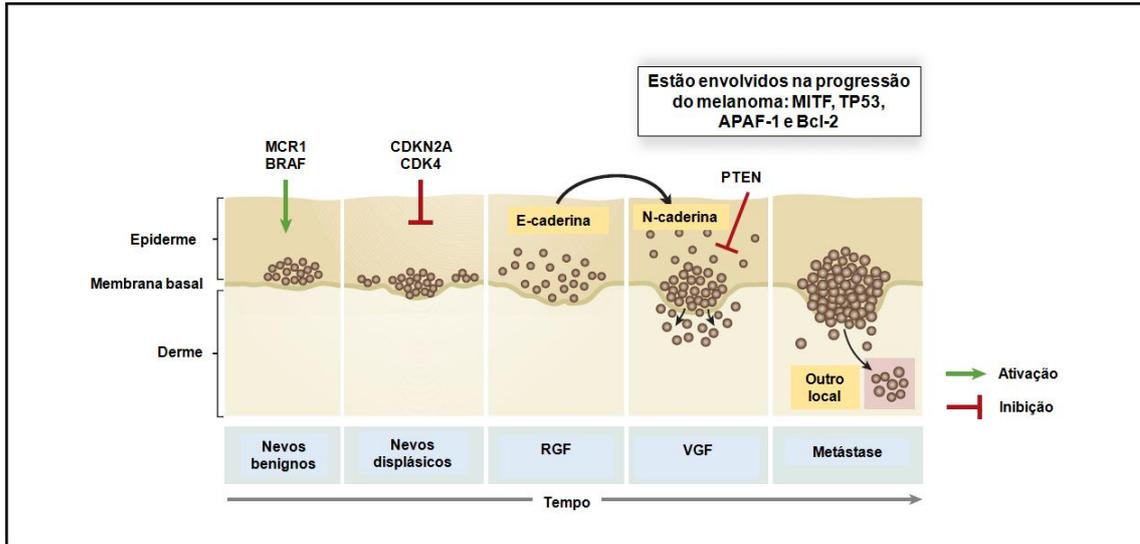


Figura 7. Etapas iniciais das mudanças fenotípicas na melanomagenese. Mutações genéticas associadas ao melanoma trazem vantagens adaptativas às células tumorais, desencadeando a progressão da doença, levando ao fenótipo metastático (Fonte: adaptado de IBRAHIM; HALUSKA, 2009).

Uma vez que o melanoma faz metástase é considerado potencialmente letal (RIGEL; CARUCCI, 2000), já que é extremamente refratário às terapias convencionais (MARTÍ; SOROLLA; YERAMIAN, 2012). Dessa forma, dentre os vários processos envolvidos na progressão do melanoma, os cruciais são aqueles que de forma direta ou indireta interferem na capacidade metastática da célula. O entendimento desses pode dar suporte ao estudo de novas estratégias terapêuticas para o melanoma.

2.2.3 Metástase

Como discutido previamente, a habilidade de invadir tecidos e estabelecer colônias em órgão distantes são definidos como uma característica de neoplasias malignas, e a esse processo dá-se o nome de metástase (CURRAN; MURRAY, 1999), responsável por 90% dos casos de morte por câncer em humanos (MEHLEN; PUISIEUX, 2006).

A metástase é um processo extremamente complexo, e acontece através de uma série de etapas sequenciais que incluem: o desprendimento das células do seu

local de origem; a invasão a tecidos adjacentes; o extravasamento dessas células na corrente circulatória; a migração; a colonização e a proliferação em tecidos ou órgãos secundários (MEHLEN; PUISIEUX, 2006; THOMPSON; SCOLYER; KEFFORD, 2005; PASCO *et al.*, 2004), como ilustrado na Figura 8.

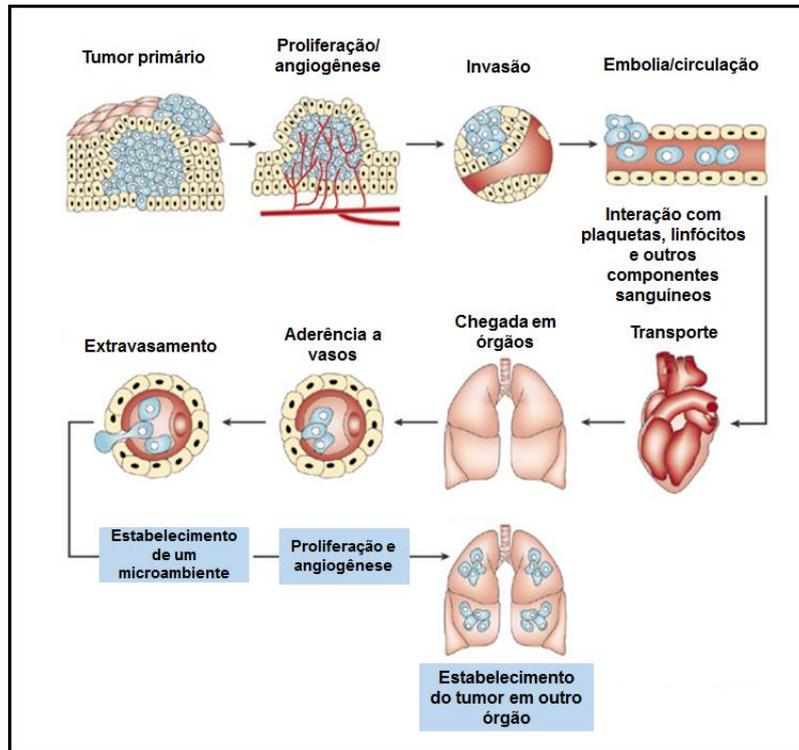


Figura 8. Representação esquemática do processo de metástase. As células do tumor primário deixam de expressar moléculas responsáveis pela adesão célula-célula e célula-matriz extracelular (MEC) e passam a expressar e secretar proteases que degradam componentes da MEC. Essa degradação facilita que as células migrem e invadam através do tecido, podendo entrar em vasos e “viajar” pela corrente circulatória. Uma vez na circulação, as células tumorais podem sair dos vasos e se estabelecerem em outros tecidos e órgãos, caracterizando assim a metástase (Fonte: adaptado de FIDLER, 2003).

Aparentemente, o processo metastático é realizado de forma fácil pelas células tumorais, mas para que haja sucesso, quando as células entram na corrente circulatória elas devem passar pela vigilância do sistema imunitário e manter-se viável até a chegada ao órgão ou tecido secundário para conseguir colonizá-lo e seguir com a proliferação (FIDLER, 2003). Isso indica o quão adaptada ou mutada a célula metastática deve ser para que consiga driblar todas as dificuldades que existem, até atingir o sucesso metastático.

Várias são as moléculas envolvidas nas etapas intermediárias que levam a metástase, contribuindo de forma direta ou indireta para a progressão tumoral. No

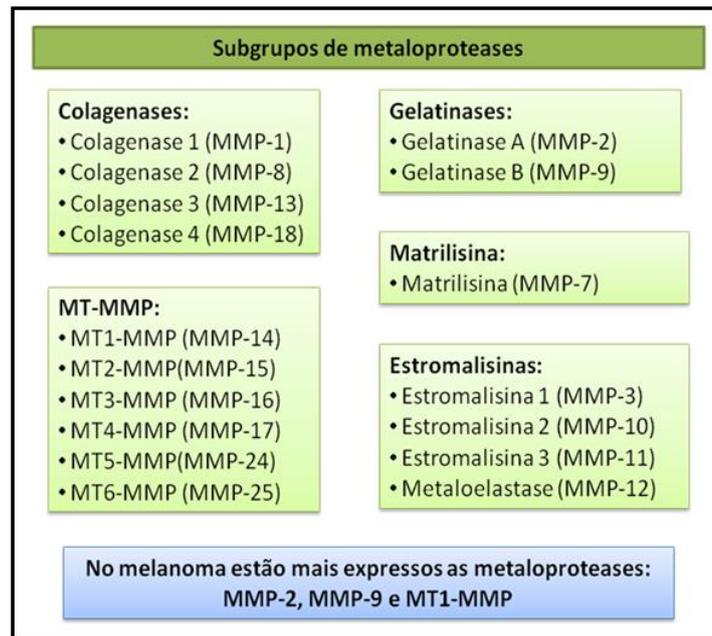
entanto, substâncias que agem em alvos específicos que prejudicam etapas iniciais que desencadeiam a metástase, mais especificamente, no processo de migração e invasão, são potenciais agentes terapêuticos para tumores metastáticos. Nesse sentido, algumas dessas moléculas serão discutidas neste trabalho de forma mais detalhada, como segue.

2.2.4 Moléculas cruciais no processo de migração ou invasão

2.2.4.1. Metaloproteases

As metaloproteases de matriz (MMPs) pertencem a uma família multigênica de endopeptidases dependentes de zinco, que são produzidas por diversos tipos celulares e possuem a função principal de degradação ou clivagem de componentes da matriz extracelular (MEC) (ZHAO *et al.*, 2001; HOFMANN *et al.*, 2005). As MMPs estão envolvidas em ambas condições: fisiológicas - para o remodelamento da MEC - e patológicas – por exemplo no caso de câncer. Sua expressão é regulada por fatores de crescimento, citocinas, hormônios, oncogenes e promotores tumorais. De acordo com sua estrutura, especificidade de substrato e localização celular, elas são classificadas dentro de subgrupos: colagenases, estromalinas, matrilisinas, gelatinases e metaloproteases transmembrana (MT-MMPs) (HOFMANN *et al.*, 2005). Cada um desses subgrupos apresenta diferentes subtipos de acordo com os substratos que elas degradam, como apresentado no Quadro 1. Nota-se que as metaloproteases mais expressas no melanoma é MT1-MMP, MMP-2 e MMP-9.

QUADRO 1 - OS DIFERENTES SUBGRUPOS DE METALOPROTEASES.



Em geral, estruturalmente as MMPs contêm um peptídeo sinal, um domínio pró peptídeo N-terminal, um domínio catalítico que inclui sítios de ligação de zinco altamente conservados, e uma região articular seguida por um domínio C-terminal hemopexina. As duas gelatinases – MMP-2 e MMP-9 – possuem um domínio adicional para fibronectina (Figura 9) (HOFMANN *et al.*, 2000).

Muitas das MMPs são sintetizadas e secretadas na forma latente – pró MMPs. A conversão da pró MMP à sua forma ativa depende da clivagem do sítio de cisteína localizado ao lado do domínio catalítico da proteína, como pode ser observado na Figura 9 (HOFMANN *et al.*, 2005).

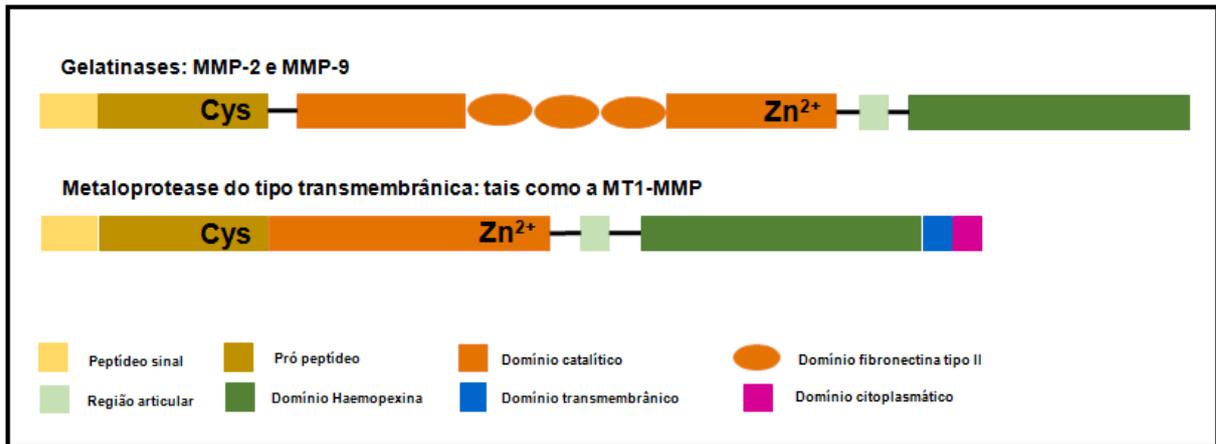


Figura 9. Domínio estrutural das MMPs. Os diferentes subgrupos de MMPs possuem características estruturais diferentes, o que determina suas diferentes funções. A figura acima ilustra a estrutura da MMP-2, MMP-9 (gelatinases) e das MT-MMPs, tais como a MT1-MMP, que são as mais expressas em melanoma (Fonte: adaptado de HOFMANN *et al.*, 2000).

A clivagem do pró domínio resulta no desligamento da interação zinco-cisteína, o qual é seguido da perda do domínio amino terminal; só assim o sítio ativo da MMP se torna acessível. Para muitas MMPs, a ativação proteolítica é iniciada no espaço extracelular por serino proteases (p.ex.: a plasmina e o ativador de plasminogênio uroquinase – uPA), ou por outros membros da família das MMPs. As MT-MMPs, podem agir de forma indireta, já que têm sido identificadas como potentes ativadoras fisiológicas de muitas MMPs. Um exemplo dessa interação é a formação do complexo MT1-MMP com TIMP-2, o qual serve como um receptor para a pró MMP-2. Esse complexo é responsável pela conversão da forma pró MMP-2 a sua forma ativa (PASCO *et al.*, 2004; HOFMANN *et al.*, 2005).

Suas atividades proteolíticas são controladas por uma família de proteínas chamadas de inibidores de metaloproteases teciduais (as TIMPs), e o desequilíbrio entre MMPs e TIMPs está envolvido em uma série de condições patológicas, incluindo o câncer (ZHAO *et al.*, 2001). Até então, quatro diferentes membros foram identificados: TIMP-1, -2, -3 e -4. As TIMPs se ligam em ambas as formas inativas e ativas das MMPs, dessa forma inibindo a ativação autocatalítica de enzimas latentes bem como a capacidade proteolítica de proteinases ativa (HOFMANN *et al.*, 2005). De forma “dual”, em alguns momentos especiais, as TIMPs podem estar envolvidas na ativação, ao invés da inativação de MMPs (HOFMANN *et al.*, 2005).

As células de melanoma podem expressar diferentes tipos de MMPs, dentre elas as principais são as MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP (Quadro 1). E, por sua vez,

expressam principalmente, as TIMP-1, -2 e -3 (PASCO *et al.*, 2004; HOFMANN *et al.*, 2005). As MMP-2 e a MMP-9 são responsáveis pela degradação de componentes da membrana basal (camada extracelular de sustentação que funciona como filtro seletivo, e separa o tecido epitelial do conjuntivo), agindo principalmente sobre o colágeno IV, que é a principal molécula desta estrutura. A MT1-MMP é a metaloprotease com maior poder de remodelamento da MEC diretamente por degradar diversos de seus componentes (SOUNNI *et al.*, 2002). Além disso, como já citado anteriormente, a MT1-MMP pode agir de forma indireta, já que, quando acumulada na célula, pode ativar a MMP-2 (PASCO *et al.*, 2004).

Diante do exposto, a investigação da expressão e atividade, tanto das MMPs, quanto de seus inibidores (TIMPs) são essenciais para o entendimento do fenótipo migratório e invasivos das células de melanoma. Além disso, tratamentos que interfiram na expressão e atividade dessas moléculas são potencialmente promissores.

2.2.4.2. Espécies Reativas

Espécies reativas podem ser classificadas dentro de quatro grupos, de acordo com o principal átomo envolvido: espécies reativas de oxigênio (ROS), espécie reativa de nitrogênio (RNS), espécies enxofre reativas (RSS) e espécies reativas de cloreto (RCS). De todos os compostos derivados do metabolismo oxidativo, as ROS são as mais abundantemente produzidas. ROS incluem o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($\cdot OH$), oxigênio singlet (1O_2), entre outros. ROS e RNS são produzidos durante o processo metabólico intracelular, bem como na cadeia transportadora de elétrons, em mitocôndrias. A RNS mais abundante é o óxido nítrico (NO), o qual é capaz de reagir com ânion superóxido, produzindo peroxinitrito ($ONOO^-$). Os danos que essas espécies reativas podem causar na célula não somente depende da concentração intracelular, mas também do equilíbrio entre as espécies reativas e aquelas antioxidantes endógenas. Quando o equilíbrio pró oxidante/anti oxidante é perdido, o estresse oxidativo é gerado, alterando e danificando muitas moléculas intracelulares, incluindo DNA, RNA, lipídios e proteínas (SOSA *et al.*, 2013).

Face a grande importância das espécies reativas, neste trabalho o papel das ROS e do NO, especificamente, serão abordados.

2.2.4.2.1. Papel das espécies reativas de oxigênio na migração e invasão celular

A metástase tumoral é atribuída não somente a anormalidades nas células cancerosas, mas também a mudanças induzidas pela interação das células tumorais com outras células e tecidos ao seu redor. Uma importante classe de moléculas envolvidas nesses eventos são as ROS, que possuem efeito duplo no que diz respeito ao desenvolvimento do melanoma. Altas concentrações de ROS desencadeiam programas antitumorais, enquanto que em menores concentrações levam ao acúmulo de mutações potencialmente oncogênicas (MEIERJOHANN, 2013).

Em concentrações subletais, ROS agem como segundos mensageiros e *up* regulam a transcrição de uma variedade de proteínas, as quais estão envolvidas no aumento da proliferação, da migração e da invasão celular (TOCHHAWNG *et al.*, 2013).

Outro ponto que deve ser levado em consideração, é que em células tumorais o sistema antioxidante é fraco. Assim, as ROS produzidas podem interferir em vários processos que facilitam a progressão tumoral. No entanto, terapias pró-oxidativas foram desenvolvidas, utilizando dessa maquinaria anti-oxidativa fraca, afim de induzir as células a apoptose. Os tratamentos que usam essa tática que são utilizados atualmente incluem: antraciclina, cisplatina e bleomicina. Porém essa estratégia não é muito eficiente visto que, o aumento da concentração de ROS pode matar as células tumorais, mas também alterar células normais. Enzimas como a glucose oxidase e a xantina oxidase, geram O_2^- e H_2O_2 , portanto aumentam ROS, e estão sendo investigadas para uso no tratamento de câncer (NISHIKAWA, 2008).

Embora diversos estudos tenham investigado o papel das ROS na migração celular e invasão, resultados variáveis têm sido publicados dependendo do tipo de ROS, da dose, do local de produção, bem como do tipo celular (LUANPITPONG *et al.*, 2010). Assim, o entendimento concreto do papel das ROS na progressão e terapia do melanoma ainda precisa ser melhor investigado.

2.2.4.2.2. Papel do óxido nítrico no melanoma

O NO é uma molécula gasosa e pequena, produzida por uma ampla variedade de células, como produto da conversão de L-arginina em L-citrulina, pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (MATTHEWS *et al.*, 2001). Como NO é um gás à temperatura ambiente e corporal, é altamente difusível pelas membranas biológicas. Por outro lado, como o NO é um radical livre, torna-se uma molécula altamente reativa dentro do sistema biológico, reagindo com outros radicais livres, oxigênio molecular e metais pesados. Existem evidências de que os efeitos biológicos do NO são mediados pelos metabólitos gerados em suas reações com outras moléculas. Esses metabólitos (peroxinitrito ou S-nitroso tiol – NO₂) medeiam muitos dos efeitos genotóxicos chave, causando dano no DNA (XU *et al.*, 2002).

Vários mecanismos diretos e indiretos têm sido sugeridos com relação as propriedades antitumorais do NO. Esses mecanismos incluem o dano direto no DNA e inibição da síntese de DNA com consequente apoptose e redução da proliferação celular (XU *et al.*, 2002; PALMIERI *et al.*, 2009). Além disso, o NO gerado pode afetar a fisiologia mitocondrial, reduzindo o consumo de O₂ e danos nos complexos I e II (cadeia transportadora de elétrons) da mitocôndria, o que leva a célula à morte (XU *et al.*, 2002).

Adicionalmente, o NO parece estar envolvido com a síntese de melanina. Quando células B16F10 foram tratadas com um agente antimelanogênico foi observado inibição da produção de NO e, subsequentemente, a síntese de melanina foi induzida por um doador de NO (sódio nitroprussiato) (CHOI *et al.*, 2012).

Ainda, de forma complementar ao envolvimento da melanogênese no mecanismo de resistência a drogas, a redução de óxido nítrico produzido endogenamente parece atenuar a sensibilidade de células de melanoma à quimioterápicos. Em resposta a cisplatina, células de melanoma aumentam os níveis de óxido nítrico, facilitando a S-nitrosilação de proteínas específicas responsáveis pelos sinais de sobrevivência (pelo acúmulo do fator indutor de hipóxia, HIF- α 1) e inibição da apoptose (pela inibição da caspase-3) (GODOY *et al.*, 2012).

Assim, o NO, bem como as ROS, são importantes alvos de investigação na progressão do melanoma.

2.3 Melanogênese

A pigmentação da pele, cabelo e olhos, depende primariamente da presença do pigmento melanina nesses tecidos. A melanina é produzida por células específicas denominadas de melanócitos (HEARING, 2011).

A síntese de melanina ocorre em organelas especializadas chamadas de melanossomos. A maturação dos melanossomos é categorizada em quatro estágios, de acordo com a produção de pigmento, como segue: pré melanossomos imaturos não melanizados em estágio I e II, e melanossomos melanizados nos estágios III e IV (Figura 10, a-f). No melanoma, esse processo ordenado é desregulado. A tirosinase (TYR) pode ser ativada no estágio I de formação do melanossomo, enquanto que a melanina pode ser depositada dentro de organelas como grânulos (SLOMINSKI *et al.*, 2004) (Figura 10, g).

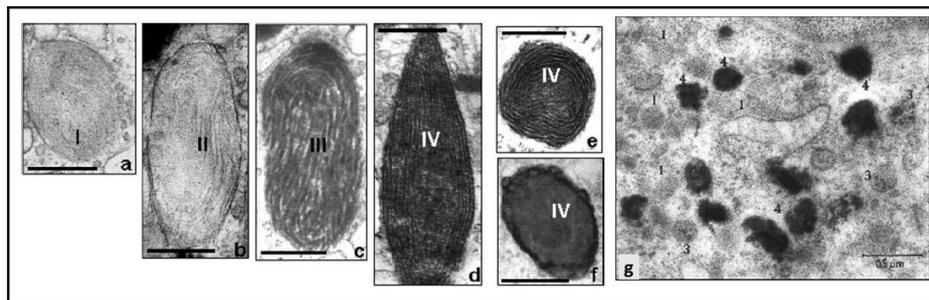


Figura 10. Estágios de desenvolvimento do melanossomo. Eletromicrografias mostrando os diferentes estágios de desenvolvimento em melanócitos normais (a-f), e o padrão de pigmentação em células de melanoma (g). I, II, III e IV ilustrados de a-f, representam os estágios de desenvolvimento do melanossomo (Fonte: adaptado de SLOMINSKI *et al.*, 2004).

Para que a síntese de melanina ocorra, a TYR, enzima chave envolvida na síntese de todos os tipos de melanina, deve estar presente. A biossíntese de melanina inicia-se através da hidroxilação da tirosina (aminoácido precursor para a síntese de melanina) formando a L-3,4-dihidroxiifenilalanina (DOPA), que é subsequentemente oxidada formando DOPAquinona (DQ). Ainda, DQ formada será espontaneamente convertida a um intermediário de coloração laranja, conhecida como DOPAcromo. A DOPAcromo perde um grupamento de ácido carboxílico formando 5,6-dihidroxiindol (DHI). Por outro lado, a DOPAcromo sofre a ação de enzimas relacionadas a tirosina, mais especificamente, a dopacromo tautomerase (DCT) ou TYRP-2 (HEARING, 2011), formando DHICA que conseqüentemente é

convertida pela TYRP-1, gerando melanina. Os melanócitos produzem dois tipos de melanina: a eumelanina, de coloração marrom escuro, e a feomelanina, de coloração amarela/laranjada. Embora existam diferenças entre elas, essas melaninas possuem a via metabólica em comum, no qual a DQ é o intermediário chave (HEARING, 2011; HIROBE, 2011). Não somente o tipo de melanina é importante, mas também sua distribuição no tecido afeta dramaticamente a coloração visível, a qual intimamente determina a função do pigmento, bem como a fotoproteção. Durante o desenvolvimento melanocítico, a especificidade, a migração e a diferenciação dos melanoblastos (precursores dos melanócitos), são essenciais para a pigmentação adequada (HEARING, 2011).

A melanina epidermal possui implicações evolucionárias e fisiológicas importantes, particularmente numa época ou cultura onde os humanos não se vestiam e/ou não se vestem. Assim, o alto conteúdo de melanina, protege a pele contra os danos gerados pela radiação ultravioleta (UV), através de propriedades químicas e óticas filtrantes (SLOMINSKI *et al.*, 2004), sendo esta, sua função primordial.

Alterações associadas com melanossomos incluem: macromelanossomos, lentigo, melanoma maligno e doenças melanolisossomal neuroectodermal que incluem síndromes de Elejalde, Chediak, Higashi e Griscelli. Essas alterações estão mais relacionadas a biogênese do melanossomo, do que a sua degradação (SLOMINSKI *et al.*, 2004).

As alterações de pigmentação mais comuns estão associadas com a produção do pigmento pela célula em si, o qual pode ser reduzido, ausente ou hiperativo e comumente em localização regional específica (SLOMINSKI *et al.*, 2004). A hipomelanose pode ser adquirida, como no caso do vitiligo, ou pode ser congênita, como o albinismo e piebaldismo (uma doença autossômica responsável por hipopigmentação no cabelo, produzindo mechas brancas). A hiperpigmentação ou hipermelanose pode estar associada com resposta inflamatória, como os quelóides, ou com função melanocítica anormal, que é o caso de nevos displásicos ou melanoma maligno (SLOMINSKI *et al.*, 2004).

As proteínas TYR e proteínas relacionadas a melanogênese (TYRP-1 e TYRP-2), são utilizadas há mais de dez anos como marcadores diagnósticos para o melanoma (SLOMINSKI *et al.*, 2004). Ou seja, a superexpressão dessas proteínas estão intimamente relacionadas ao melanoma. Outra molécula importante para a

melanogênese é o fator de transcrição associado a microftalmia (MITF). O MITF faz a transcrição de genes que codificam TYR, TYRP-1 e TYRP-2. Além disso, de forma concomitante o MITF tem papel na proliferação e sobrevivência de melanócitos normais (PALMIERI *et al.*, 2009).

Durante a melanogênese, os precursores da melanina possuem efeitos genotóxicos e mutagênicos, cujos efeitos podem ser amplificados pelos radicais livres e espécies reativas de oxigênio geradas durante a melanogênese. Esse ambiente mutagênico em célula de melanoma pode facilitar a instabilidade genética e o aparecimento de novas e mais agressivas populações celulares resistentes a terapia (SLOMINSKI *et al.*, 2004). Estudos têm demonstrado que a inibição da melanogênese com feniltiouréia (PTU) melhora a citotoxicidade de quimioterápicos contra as células de melanoma (ZBYTEK *et al.*, 2009), sugerindo que a melanogênese contribui para o mecanismo de resistência a multidrogas (MDR).

Ainda, receptores de melanocortina (MC), em especial o receptor de melanocortina-1 (MCR-1) tem importante função na regulação da melanogênese (SLOMINSKI *et al.*, 2004). Esse receptor é expresso em melanócitos normais e em células de melanoma. O MCR-1 quando estimulado, provoca acúmulo intracelular de adenosina 3'5'-monofosfato cíclico (cAMP), levando a melanogênese (SLOMINSKI *et al.*, 2004). Existem estudos que sugerem que o MCR-1 além de estar envolvido na síntese de melanina, pode estimular a superexpressão de sindecam-2 (um proteoglicano de heparam sulfato), facilitando a migração de células de melanoma (CHUNG *et al.*, 2012).

2.4 Carboidratos e sua Relação com o Câncer

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

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

Dentre os glicoconjugados de interesse em glicobiologia do câncer, destacam-se os proteoglicanos, os quais são moléculas presentes em quase todos os tecidos, localizados na matriz extracelular, bem como na própria célula (membrana plasmática ou intracelularmente). Dentre eles, os de matriz extracelular compreendem mais de 50 membros conhecidos e os de membrana são basicamente pertencentes a três famílias, conforme descrito a seguir.

2.4.1. Glicosaminoglicanos (GAGs)

Os GAGs são heteropolissacarídeos de cadeias lineares, carregados negativamente (devido aos grupamentos sulfatos e carboxílicos), compostos por unidades dissacarídicas, repetidas, constituídas de uma hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina) e um ácido urônico (D-glucurônico ou L-idurônico) ou um açúcar neutro (D-galactose) (FJELDSTAD; KOLSET, 2005; AFRATIS *et al.*, 2012). O tipo de monossacarídeo que compõem as unidades dissacarídicas, as diferenças no padrão de sulfatação, bem como o tipo de ligação inter ou intradissacarídica, são parâmetros usados para a classificação dos GAGs em: ácido hialurônico (AH), heparina, heparan sulfato (HS), condroitim sulfato (CS), queratim sulfato (KS) ou dermatim sulfato (DS), como podem ser observados na Figura 11. As cadeias de GAG são covalentemente ligadas aos resíduos de serina (ou de treonina) de um *core* proteico, formando um proteoglicano (PG) (AFRATIS *et al.*, 2012). Diferentemente de outros GAGs, o AH, é o único não sulfatado, e não se liga covalentemente a um esqueleto proteico, sendo sintetizado na superfície intracelular da membrana plasmática. Esta macromolécula é considerada por ter papel importante na homeostasia tecidual e também na progressão do câncer (AFRATIS *et al.*, 2012), como será discutido a seguir.

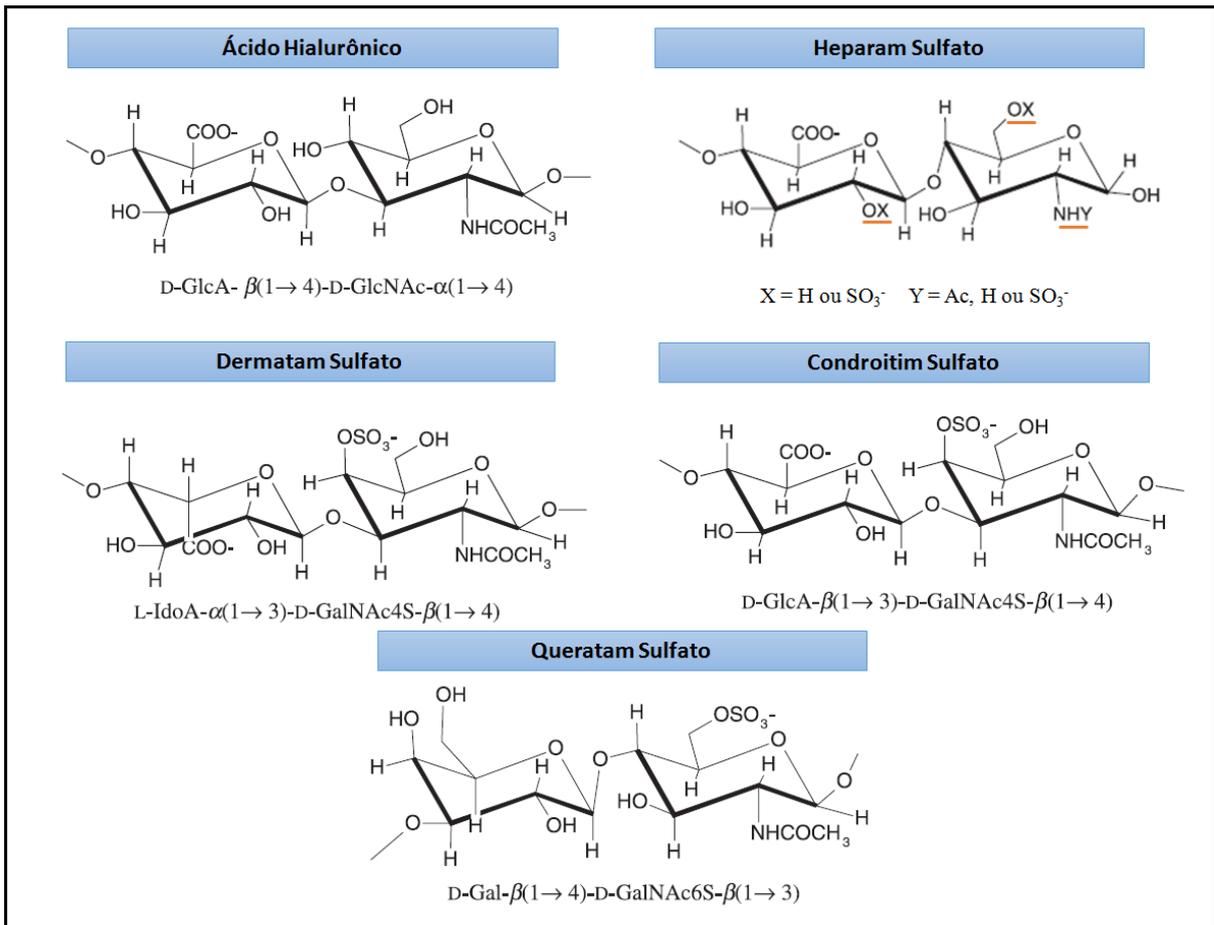


Figura 11. Estrutura química dos GAGs. A figura ilustra as diferenças químicas das unidades dissacarídicas dos diferentes GAGs: ácido hialurônico, heparam sulfato, dermatam sulfato, condroitim sulfato e queratam sulfato (Fonte: adaptado de GANDHI, MANCERA, 2008).

2.4.1.1 Ácido hialurônico e Hialuronidases

O ácido hialurônico (AH) ou hialuronam é um GAG não sulfatado constituído de repetições dos dissacarídeos ácido D-glucurônico e N-acetilglucosamina, cujo polímero tem massa molecular de 10^5 a 10^7 Da. É produzido por três isoenzimas hialuronam sintase - HAS1, HAS2 e HAS3 – as quais são proteínas integrais da membrana plasmática, no qual seus sítios ativos estão localizados na face intracelular da membrana. Cada uma dessas enzimas polimeriza cadeias de AH de diferentes tamanhos (VOELCKER *et al.*, 2008).

Quanto a sua localização, o AH é um composto tipicamente da matriz extracelular, mas pode ser encontrado na superfície das células ligado a HAS ou interagindo com receptores da superfície celular; podendo também ser encontrado

em compartimentos intracelulares. Ainda, em regiões teciduais caracterizadas por alta divisão celular e capacidade de invasão, há significativa quantidade de AH.

Quanto as suas funções, o AH pode agir como um mediador de sinalização via ligação com receptores de AH, como: o CD44; o receptor de motilidade mediado por hialuronam (RHAMM); os receptores *Toll-like* 2 e 4, entre outros. Recentemente, o CD44 e o RHAMM têm sido definidos como maiores receptores envolvidos na progressão do câncer (AFRATIS *et al.*, 2012), mostrando cada vez mais a importância do AH neste processo.

O AH pode ser degradado ou clivado pela ação enzimática de hialuronidases (HYAL-1, HYAL-2, HYAL-3 e PH-20), cujas expressões estão aumentadas ou suprimidas em alguns cânceres malignos. A HYAL-1 e HYAL-2 são as principais hialuronidases envolvidas no catabolismo do AH e agem em cooperação. Primeiramente, a HYAL-2 degrada AH de alta massa molecular na superfície da célula em fragmentos de variados tamanhos, os quais, após endocitados, são degradados intracelularmente pela HYAL-1 em resíduos tetrassacarídicos (VOELCKER *et al.*, 2008; AFRATIS *et al.*, 2012). Sabe-se que vários oligossacarídeos provenientes da ação da hialuronidase possuem diferentes efeitos no câncer, dentre elas: a progressão tumoral, a angiogênese e a metástase (AFRATIS *et al.*, 2012). Assim o AH diretamente, ou indiretamente através das enzimas que o sintetizam e o degradam, bem como seus receptores, possuem envolvimento numa gama de carcinomas (mama, pulmão, pele, cabeça e pescoço, gastrointestinal e melanoma), linfomas e tumores neuronais (glioma). A produção de AH está associada com: a invasão tumoral; interações tumor-hospedeiro; angiogênese; transição epitélio mesenquima e com a metástase local e distal. Ainda, o AH pode modular o mecanismo de resistência a multidrogas (SIRONEN *et al.*, 2011).

Células de melanoma, comparadas com outros tipos celulares, apresentam baixas quantidades de AH. Mesmo assim, estudos revelam que, a capacidade invasiva das células é aumentada pelo agrupamento de CD44 induzido pelo AH, o qual facilita a ligação da MMP-9 na superfície celular. A natureza destrutiva do câncer invasivo induz uma resposta imunológica, gerando inflamação e dano tecidual, o qual leva a formação de pequenos fragmentos de AH. Esses são capazes de induzir a expressão de MMP-2 em células de melanoma através de receptores *Toll-like* (TLR) e do fator nuclear κ B (NF κ B), como mostrado na Figura 12

(SIRONEN *et al.*, 2011). Corroboram com estes dados, os achados obtidos por WILLENBERG e colaboradores (2012), onde mostram que o melanoma produz pouco AH, mas é capaz de estimular os fibroblastos a produzirem. Ainda, secreta hialuronidases clivando-o em fragmentos (WILLENBERG *et al.*, 2012). Por outro lado, estes fragmentos são capazes de ligar em receptores TLR-4, desencadeando sinal intracelular mediado por NF κ B (fator nuclear κ B), que leva ao aumento da expressão de IL-8 e MMP-2 (VOELCKER *et al.*, 2008).

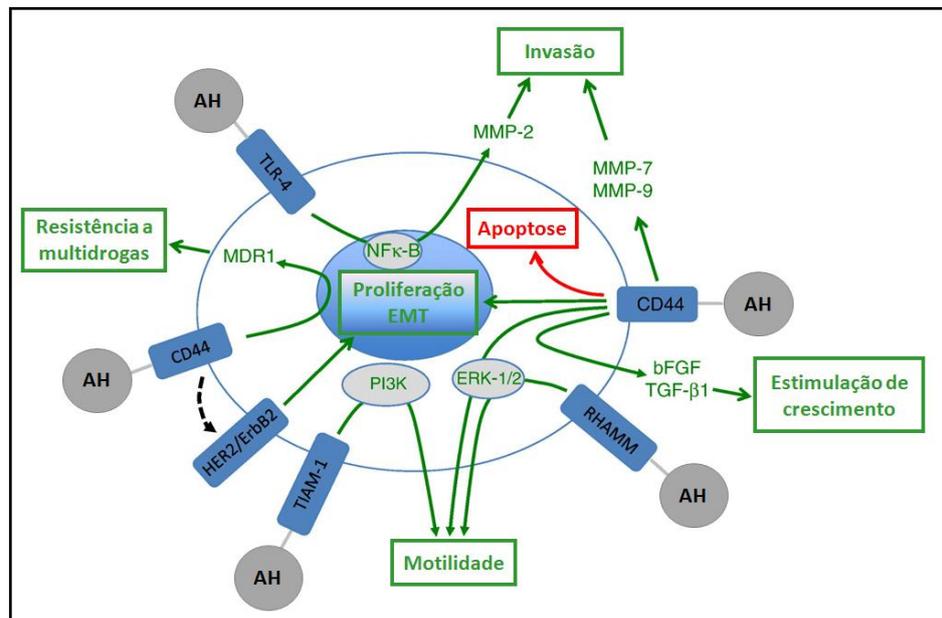


Figura 12. Mecanismo de ação do AH no câncer. O AH altera a fisiologia celular em vários tipos de tumores pela ligação em receptores da superfície celular. Isto favorece a progressão tumoral por induzir a motilidade, a invasão, a proliferação celular, a produção de fatores de crescimento, a resistência a multidrogas e inibir a apoptose, por variados mecanismos de ação (Fonte: adaptado de SIRONEN *et al.*, 2011).

2.4.2 Proteoglicanos

Uma importante classe de moléculas envolvidas no processo metastático são os proteoglicanos (PGs), que compreendem uma família de macromoléculas compostas de um esqueleto polipeptídico no qual uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs) podem estar covalentemente ligadas. Os PGs são sintetizados por quase todos os tipos de células animais, e ocorrem na MEC, na superfície das células e em grânulos intracelulares. O papel biológico do PG

dependerá das propriedades da sua cadeia proteica, do número de cadeias de GAGs ligados, das modificações biossintéticas dessas cadeias de GAGs, e da localização do PG nas células e tecidos (FJELDSTAD, KOLSET, 2005; GANDHI, MANCERA, 2008).

De acordo com as diferentes cadeias de GAGs que o compõe, os PGs podem ser classificados em proteoglicanos de: heparam sulfato (HS), condroitim sulfato (CS), queratam sulfato (KS), ou dermatam sulfato (DS) (Figura 13) (FJELDSTAD, KOLSET, 2005).

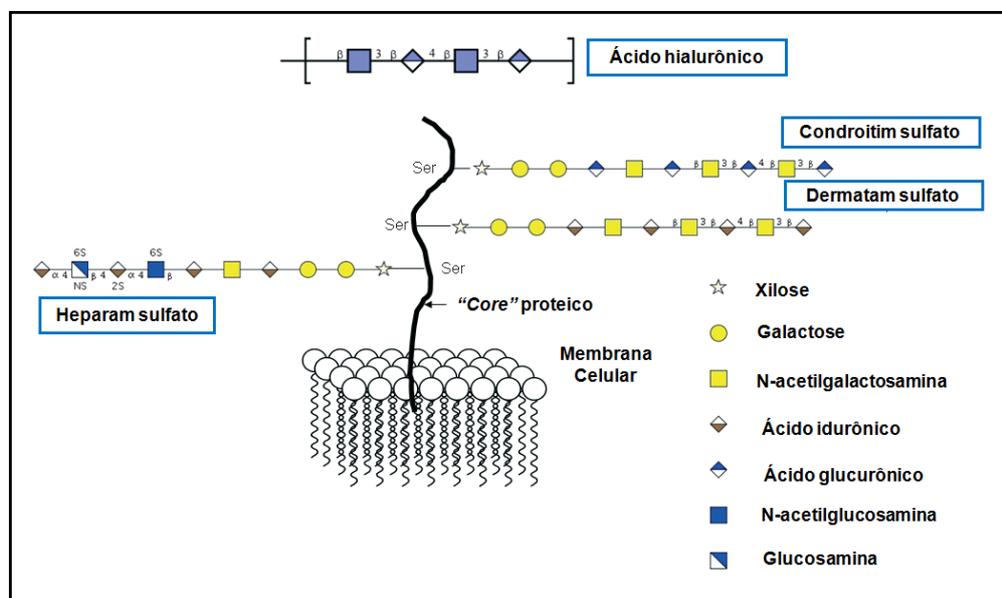


Figura 13. Estruturas de ligação dos GAGs nos proteoglicanos. HS, DS, e CS são ligados a proteína via resíduos de serina. Note que o HA não é ligado a esqueleto proteico (Fonte: adaptado de GANDHI, MANCERA, 2008).

2.4.2.1 Proteoglicano de heparam sulfato

O proteoglicano de heparam sulfato (PGHS) possui uma diversidade considerável devido aos vários tipos de cadeias polipeptídicas que o compõem, além do alto polimorfismo das cadeias de HS (FJELDSTAD, KOLSET, 2005). Há duas classes principais de PGHS: os de superfície celular e os associados à MEC. Àqueles associados à MEC incluem: perlecan, o qual ajuda a manter a barreira endotelial; agrin, o qual está envolvido na formação das junções neuromusculares; e o colágeno XVIII, que pode ser clivado, formando endostatina, um agente anti-

angiogênico. Já os PGHS de superfície celular podem ser encontrados de forma transmembrânica, denominados de sindecans, ou ancorado à membrana plasmática pela ligação ao GPI (glicosil-fosfatidil-inositol), conhecidos como glipicans. Ambos contêm, preferencialmente, cadeias de HS ligadas covalentemente (O'CONNELL, WEERARATNA, 2011).

Muitas das funções do PGHS dependem da sua habilidade em ligar e modular várias proteínas como: fatores de crescimento, enzimas, quimiocinas e proteínas estruturais da MEC (FJELDSTAD, KOLSET, 2005). É bem caracterizada a ligação de PGHS com fatores de crescimento e, com o seu respectivo receptor, sendo, em alguns casos, considerado como coreceptor, como por exemplo no caso do FGF-2 (LOPES, DIETRICH, NADER, 2006).

Nas células tumorais, os PGHSs podem ter ambos efeitos, pró-tumorigênicos e anti-tumorigênicos, dependendo da sua composição proteica, das cadeias de GAGs que o compõem, das moléculas associadas, da sua localização e do estágio tumoral (FJELDSTAD, KOLSET, 2005; IOZZO, SANDERSON, 2011).

Como discutido anteriormente, a metástase envolve a desadesão das células do tumor original primário e invasão, atravessando a membrana basal, chegando ao estroma. Uma vez no estroma, as células tumorais podem penetrar no tecido endotelial e cair na corrente circulatória. Na circulação, PGHSs presentes nas células tumorais podem mediar a adesão destas, para as células endoteliais, através da ligação com a P-selectina (FJELDSTAD; KOLSET, 2005). Ainda, o maior componente da membrana basal, subjacente às células endoteliais, é o perlecam. Assim, o extravasamento das células requer também a degradação de HS (FJELDSTAD, KOLSET, 2005).

2.4.2.1.1 Perlecam

O perlecam é um PGHS encontrado na lâmina basal e na matriz intersticial de tecidos, incluindo cartilagem (FARACH-CARSON, CARSON, 2007). O perlecam tem papel importantíssimo na angiogênese (ação pró angiogênica) e integridade estrutural (FJELDSTAD, KOLSET, 2005). Por exemplo, a falha na expressão do gene *Hspg2*, que codifica para o perlecam, causa letalidade embrionária em aproximadamente 12 dias. Isso é primariamente causado por hemorragia

intrapericardial, principalmente devido a falta de perlecan, gerando falha estrutural na membrana basal (IOZZO, SANDERSON, 2011). Assim, o perlecan está intimamente relacionado a patologias associadas a circulação cardiovascular.

Ainda, por apresentar alta afinidade de ligação com o FGF-2, um fator pró-angiogênico, suas cadeias de heparan sulfato são cruciais para a atividade angiogênica, como evidenciado nos animais transgênicos que não expressam o domínio que contém as cadeias de GAG (IOZZO, SANDERSON, 2011).

No melanoma invasivo, a expressão do perlecan é 15 vezes maior do que o normal, resultando numa abundante deposição desse proteoglicano na matriz pericelular das células tumorais. Entretanto, quando é feita a estabilização da expressão desse PG (levando a níveis similares ao dos melanócitos) há a supressão da proliferação e invasão celular (IOZZO, SANDERSON, 2011), reduzindo assim a tumorigênese do melanoma.

2.4.2.1.2 Sindecam

Os sindecans são uma família de proteoglicanos transmembrânicos que carregam predominantemente cadeias de HS. A cadeia proteica consiste de um curto domínio intracelular, um domínio transmembrânico altamente conservado e um ectodomínio, o qual estruturalmente é divergente na sequência de aminoácidos dentre os 4 membros da família (IOZZO, SANDERSON, 2011).

A ancoragem de células aos componentes da MEC é, além de outros componentes de adesão, mediado através desta família de PGHS. O sindecam possui função tanto na sinalização extracelular quanto intracelular (FJELDSTAD, KOLSET, 2005; IOZZO, SANDERSON, 2011). Na superfície da célula, o core proteico e as cadeias de HS do sindecam possuem uma série de funções, promovendo a interação célula-célula e célula-MEC, e regulando a sobrevivência celular, adesão e migração.

Ainda, os sindecans podem sofrer ação de *shedases* que clivam sítios específicos do ectodomínio, liberando-o no espaço extracelular, o que o torna uma molécula biologicamente ativa. Esses fragmentos solúveis, com cadeias de HS intactas, podem interagir com componentes da MEC, tornando-se parte dela, ou,

podem permanecer solúveis e influenciar o ambiente celular, até mesmo de forma distante ao seu local de origem (FJELDSTAD, KOLSET, 2005; IOZZO, SANDERSON, 2011). Ainda, podem regular a atividade de fatores de crescimento ou competir pelo mesmo sítio de ligação (FJELDSTAD, KOLSET, 2005; LOPES, DIETRICH, NADER, 2006).

Clinicamente, pode ser utilizado como um biomarcador de detecção inicial ou tardia do câncer (FJELDSTAD, KOLSET, 2005; IOZZO, SANDERSON, 2011). Sua expressão e função, nas células tumorais, são divergentes de acordo com o tipo de câncer. Por exemplo, o sindecam-1 é pouco expresso em muitos tipos de câncer, bem como: câncer de próstata, carcinoma escamoso de cabeça e pescoço, pulmão, câncer de laringe, mesotelioma maligno, mieloma múltiplo e carcinoma colorretal. Nesses casos, a baixa expressão de sindecam está associada ao aumento da agressividade tumoral e conseqüentemente um prognóstico ruim. De forma contrária, o aumento da expressão está associada com aumento da invasão em câncer pancreático, gástrico, de mama e de ovário (FJELDSTAD, KOLSET, 2005).

2.4.2.1.3 Glipicam

Os glipicans compartilham similaridades com os sindecans, no que diz respeito a expressão, são encontrados componentes da membrana plasmática e interagem com uma gama de proteínas da MEC, citocinas, fatores de crescimento e seus receptores, e regulam a sinalização celular durante a morfogênese, na homeostasia fisiológica e na carcinogênese. No entanto, diferem dos sindecans na maneira de interação com a membrana celular, a qual ocorre via âncora de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). Todos os membros da família dos glipicans possuem, na região C-terminal, sítios de ligação para cadeias de HS, bem como seqüência de ligação para âncora de GPI (IOZZO, SANDERSON, 2011). Assim, enquanto o sindecam apresenta vários locais de inserção para as cadeias de GAGs ao longo de toda a estrutura proteica, nos glipicans elas são restritas apenas à região próxima da membrana plasmática (SONG, FILMUS, 2002). Além das suas cadeias de HS, o *core* proteico do glipicam pode também mediar importantes funções, bem como

estimular apoptose e dar suporte a via de sinalização Wnt (IOZZO, SANDERSON, 2011), entre outras funções.

Foram identificados seis tipos de glicoproteínas (GPC1 ao GPC6). A importância do ancoramento da proteína à membrana via GPI ainda não é bem conhecida, mas sabe-se que uma das suas funções é direcionar essas proteínas (ou o proteoglicano) às balsas lipídicas (*lipid rafts*), facilitando a interação com moléculas sinalizadoras intracelulares, já que não apresentam domínios citoplasmáticos, como os sindecans. O grau de glicosilação dos glicoproteínas também influencia a sua distribuição na membrana plasmática (SONG, FILMUS, 2002).

O glicoproteína-1 é encontrado em células cancerosas do pâncreas e em fibroblastos circundantes, mas não está presente em células pancreáticas normais (KLEEFF *et al.*, 1998; NAKATSURA, NISHIMURA, 2005). Já o glicoproteína 3 é superexpresso em carcinoma hepatocelular e em melanoma (HONSOVÁ *et al.*, 2011). Ainda, o glicoproteína 3 tem sido utilizado como alvo terapêutico, utilizando anticorpos, principalmente em carcinoma hepatocelular (HCC), mas também tem sido marcador importante em diversos outros tipos de tumores, incluindo melanoma (HO, KIM, 2012). Em HCC as pesquisas com anti-glicoproteína 3 estão mais avançadas, onde já há relatos de diversos estudos fase clínica I (HO, KIM, 2012; SAWADA *et al.*, 2012) e alguns já iniciados em fase II (SAWADA, NAKATSURA, 2012).

2.4.2.2 Enzimas que podem modificar a estrutura de PGHS: *Sheddases*, heparanases e sulfatases

Modificações enzimáticas de PGHS têm emergido como um importante mecanismo de regulação da função destes PG no câncer. Essas modificações consistem basicamente em três tipos: clivagem do *core* proteico por *shedases*, as quais podem liberar domínios solúveis do PG da superfície das células; clivagem de cadeias de heparan sulfato realizadas por heparanases e a remoção de 6-O sulfatos das cadeias de heparan sulfato, por sulfatases extracelulares (Figura 14). Essas modificações na estrutura do PG podem dramaticamente impactar na função da molécula e levar a mudanças do comportamento da célula tumoral (IOZZO, SANDERSON, 2011).

O *shedding* ocorre através da atividade de várias MMPs, as quais clivam o core proteico do PG liberando o ectodomínio funcional. Esses ectodomínios podem então se difundir dentro do microambiente onde podem interagir com moléculas de outras células ou também se ligar com componentes da MEC. Além disso, podem se difundir no soro, sendo detectados, assim são usados como marcadores para o câncer (p.ex.: sindecam-1, glicam-3) (IOZZO, SANDERSON, 2011).

A heparanase é uma endo- β -D-glucuronidase rara em tecidos normais, mas em tumores malignos é superexpressa (SANDERSON *et al.*, 2005; IOZZO, SANDERSON, 2011). Age clivando cadeias de heparam sulfato em fragmentos (de 5-7 kDa), os quais, parecem ser biologicamente mais ativos do que o heparam sulfato nativo de origem (SANDERSON *et al.*, 2005). Através de ambas atividades, enzimáticas e não enzimáticas (p.ex.: fragmentos de HS que liga receptores celulares e estimula a via de sinalização ERK, resultando no aumento da expressão de MMP-9), a heparanase ajuda a progressão tumoral pela degradação da MEC, estimulando a sinalização celular e pela *upregulation* de genes que promovem o fenótipo tumoral agressivo (IOZZO, SANDERSON, 2011). Assim, a expressão da heparanase pelas células tumorais têm sido associada com o aumento do crescimento tumoral, metástase, bem como angiogênese.

O PGHS pode sofrer a ação de outras enzimas, as sulfatases. Estas sulfatases removem o 6-O sulfato das cadeias dissacarídicas trissulfatadas de heparam sulfato. Isto altera a afinidade das cadeias de HS por fatores de crescimento e por receptores de fatores de crescimento. As sulfatases possuem diferentes expressões em diferentes tipos de câncer. No melanoma há a presença elevada de sulfatase 2 (Sulf 2) (SANDERSON *et al.*, 2005).

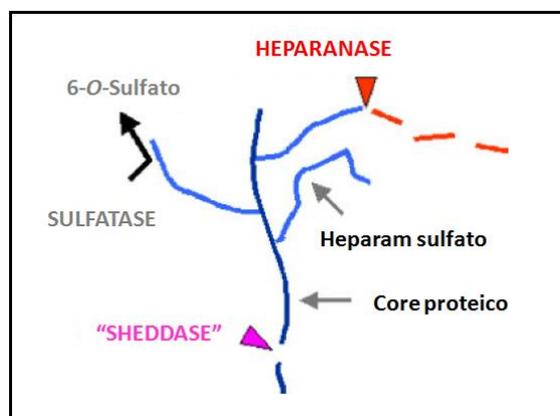


Figura 14. Sítios de ação de *sheddases*, heparanases e sulfatases. A Figura representa o local de ação nos PGHS, dessas três enzimas, resultando no remodelamento do proteoglicano (Fonte: Adaptado de SANDERSON *et al.*, 2005).

2.4.2.3 Proteoglicano de condroitim sulfato

O proteoglicano de condroitim sulfato (PGCS) é composto por unidades alternadas dissacarídicas de ácido D-glucurônico e D-N-acetilgalactosamina. A biossíntese das cadeias de condroitim sulfato (CS) na estrutura proteica resulta na formação de PGCS, como o agrecam (cartilagem), versicam (tecidos conectivos não cartilagosos), decorim e biclicam. O CS é ligado a resíduos de serina do esqueleto proteico, onde uma ligação de tetrassacarídeo é adicionada, podendo ser modificado pela inclusão de grupos sulfatos (no C-4 e/ou C-6 do N-acetil-glucosamina e/ou no C-2 do ácido glucurônico). Sua cadeia CS é capaz de interagir com fatores de crescimento, moléculas de adesão, lipoproteínas, entre outras, sendo assim necessário na organização da matriz extracelular (ASIMAKOPOULOU *et al.*, 2008).

Proteoglicano de condroitim sulfato 4 humano (PGCS4), originalmente conhecido como Antígeno de alto peso molecular associado ao melanoma (HMW-MAA) ou como Proteoglicano de Condroitim Sulfato do Melanoma (MCSP), foi identificado há 30 anos em células humanas melanocíticas. O proteoglicano correspondente em camundongos e ratos é conhecido como NG2 (Antígeno nervo-glial 2) (PRICE *et al.*, 2012).

PGCS consiste em uma proteína transmembrana, modificada covalentemente no Complexo de Golgi com cadeias de CS, sendo expresso em diversos tecidos durante o desenvolvimento. Além disso, este PGCS4 é importante na homeostase e está envolvido na manutenção das células tronco, sendo encontrado nas células tronco da epiderme. Sabe-se que ele está associado com a progressão do melanoma, sendo expresso na fase RGP, aumentando a migração, ativação de proteases e promovendo a transição epitélio-mesênquima (EMT). Assim, a EMT facilita a progressão do tumor primário da fase RGP para o VGP, e consequentemente, promove a metástase (PRICE *et al.*, 2012). Mizumoto e Sugahara (2013) descreveram como se desenvolve a metástase pulmonar pela interação das cadeias GAGs de MCSP (entre elas condroitim sulfato) nas células tumorais e o RAGE (receptor de produto final de glicosilação avançada), um membro da superfamília de imunoglobulinas que, quando ligado a cadeia GAG, aumenta a capacidade de invasão, proliferação e angiogênese das células tumorais. O mecanismo descrito é demonstrado na Figura 15.

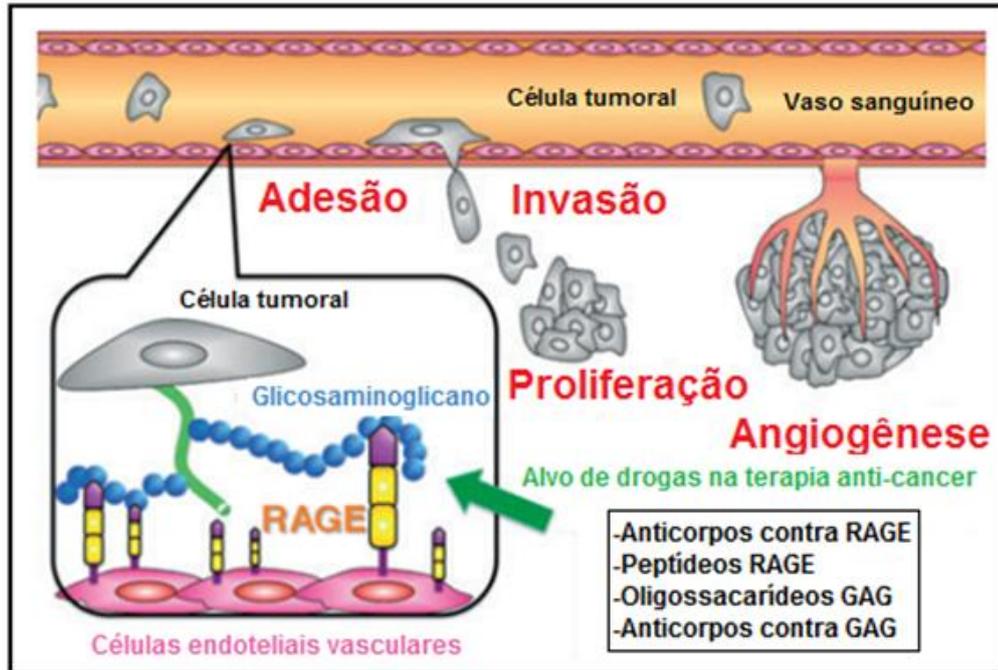


Figura 15. Metástase pulmonar pela interação GAG-RAGE. A Figura ilustra o desenvolvimento de metástase pulmonar em camundongo. As células tumorais deixam a circulação sanguínea e sua porção GAG interage com o receptor RAGE das células endoteliais vasculares. Em seguida, as células tumorais promovem a invasão, proliferação celular e angiogênese (Fonte: adaptado de MIZUMOTO, SUGAHARA, 2013).

Devido à resistência do melanoma a terapias, um estudo realizado por Bruyn e colaboradores (2010) demonstrou a eficácia do composto anti-MCSP: TRAIL, contra o melanoma. Este consiste de um anticorpo contra o proteoglicano condroitim sulfato associado ao melanoma (MCSP), sendo que um fragmento específico do anticorpo (scFv) está fusionado a um TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral) humano solúvel. Sabe-se que o TRAIL controla a apoptose em células malignas, incluindo o melanoma. O tratamento com este composto *in vitro* e *in vivo* demonstrou inibir o crescimento das células melanocíticas pela indução a apoptose. Outras abordagens têm sido realizadas utilizando anticorpo anti-PGCS como imunoterapia contra alguns tipos de cânceres, incluindo melanoma (PRICE *et al.*, 2012).

A expressão do PGCS4 influencia diretamente ou indiretamente a ativação de múltiplas vias de sinalização associadas com a transformação oncogênica. Dentre as vias que são impactadas pelo PGCS4 incluem àquelas envolvidas na sobrevivência (PI3K, AKT e NF κ B), adesão (FAK e integrinas), crescimento e motilidade (via tirosina quinase – RTK e ERK). Dessa forma não é de se surpreender que o PGCS4 têm sido investigado como alvo terapêutico contra o melanoma e

outros tipos de câncer (PRICE *et al.*, 2012). Estudos clínicos têm testado anticorpos contra PGCS4 (usando anticorpos anti-antiotípico, que quando aplicado no paciente gera anticorpos contra o PGCS4) em pacientes com melanoma, e o resultado foi um aumento significativo de sobrevivência (Revisado por PRICE *et al.*, 2012).

O potencial metastático das células tumorais é um importante determinante para a morbidade e mortalidade em pacientes com câncer (FJELDSTAD, KOLSET, 2005). Assim, tratamentos que alterem a expressão ou atividade de proteínas, ou a própria fisiologia da célula tumoral, as quais estão envolvidas na facilitação da migração, invasão e colonização, ou seja, que estão diretamente ou indiretamente vinculadas ao sucesso metastático, são de extrema importância para melhorar a qualidade de tratamento atual.

2.5 Tratamento atual

As opções de tratamento para o melanoma ainda são muito limitadas, apesar dos avanços na imunoterapia e terapias alvo. De acordo com o Comitê Americano de Câncer (*American Joint Committee on Cancer – AJCC*), o tratamento padrão recomendado para pacientes com melanoma metastático é o quimioterápico dacarbazina. No entanto, a efetividade desse medicamento e de seu análogo, temozolomida, é menor que 15% e geralmente reversível. Somente 1 a 2% dos pacientes têm uma resposta duradoura a esses quimioterápicos (Revisado por GARBE *et al.*, 2011).

Outra opção de terapia é a imunoterapia, como p.ex. com interleucina-2 (IL-2). Esta é uma glicoproteína descrita primeiramente em 1976 como fator de crescimento de células T, responsável pela regulação e proliferação dessas células. A IL-2 foi a segunda citocina exógena que demonstrou efeito contra tumores sólidos e foi aprovada pelo FDA americano (*Food and Drugs Administration*) em 1998 para o tratamento de melanoma metastático (KIRKWOOD *et al.*, 2012). O tratamento com IL-2 é realizado com altas doses, o qual apresenta efeito prolongado, sendo que foi obtido resposta completa em uma porcentagem pequena de pacientes; entretanto, nunca foi estabelecido formalmente um estudo comparativo de fase III (Revisado por GARBE *et al.*, 2011). A toxicidade associada com altas doses de IL-2 são severas,

porém reversíveis, incluindo complicações hemodinâmicas como: hipotensão, edema, ganho de peso, diminuição da função renal, alterações na tireoide, insuficiência respiratória e neurotoxicidade (GARBE *et al.*, 2011; KIRKWOOD *et al.*, 2012).

Para pacientes com nódulos iguais ou maiores a 2mm com ou sem metástase, têm sido usado como terapia, o interferon- α (IFN- α) (GARBE *et al.*, 2011).

Terapias adjuvantes à quimioterapia têm sido adotadas, mas, ainda, com benefícios limitados. Nos últimos 25 anos, as terapias adjuvantes para pacientes com melanoma de risco intermediário a alto (como a radioterapia local, imunostimulantes sistêmicos - p.ex.: BCG-, ou imunomoduladores farmacológicos como o levamizol), têm sido substituídas por agentes biológicos como o interferon- α (IFN- α), fatores que estimulam granulócitos/macrófagos, e anticorpos que funcionam como imunoreguladores, bem como aqueles que bloqueiam a citotoxicidade de antígeno 4, associados a linfócitos T (CTLA-4) (GARBE *et al.*, 2011).

A vacina contra o câncer é uma estratégia terapêutica que tem sido extensivamente perseguida na esperança de melhorar o reconhecimento imunológico e a resposta imune antitumoral efetora, através da melhora da apresentação de antígenos, e a habilidade de estimular a memória das respostas de células T de forma a torná-las mais duradouras (GARBE *et al.*, 2011; KIRKWOOD *et al.*, 2012).

Até então, os tratamentos convencionais (quimioterapia e radioterapia) são pouco efetivos no tratamento do melanoma, causam vários efeitos colaterais e reduzem a qualidade de vida dos pacientes. Assim, há claramente a necessidade de investigar novas estratégias terapêuticas, que, de maneira adjunta ao tratamento convencional, traga melhoras no quadro clínico e aumento da qualidade de vida do paciente, além de inibir o crescimento tumoral.

2.6 Medicina Alternativa e Complementar no tratamento do câncer

A medicina alternativa e complementar tem sido definida como qualquer diagnóstico, tratamento ou prevenção que complementa a medicina tradicional, contribuindo para o bem estar geral, satisfazendo uma demanda não atingida pela medicina ortodoxa (MOLASSIOTIS *et al.*, 2005).

A medicina alternativa e complementar inclui uma ampla variedade de terapias, dentre elas encontra-se a homeopatia (STONEMAN *et al.*, 2013). O termo medicina alternativa e complementar é aceito e utilizado pela Organização Mundial da Saúde. No entanto, no Brasil a homeopatia é considerada uma terapia integrativa e complementar à terapia convencional (Brasil, PNPIC, 2006).

Nos últimos anos houve um aumento no interesse em usar a medicina integrativa, ou seja a combinação da medicina alternativa e complementar, com a medicina convencional para otimizar o tratamento de vários tipos de neoplasias (MONTFORT, 2000), ganhando indubitavelmente, importância na área médica, econômica e social (MOLASSIOTIS *et al.*, 2005). Segundo Montfort, em 2000, um em cada três pacientes diagnosticados com câncer faziam também o uso de outra abordagem terapêutica. Pacientes com câncer muitas vezes optam por terapias complementares. Dentre os diversos tipos de medicina integrativa utilizada, as terapias mais procuradas pelos pacientes são a medicina nutricional e fitoterápica, bem como a homeopatia (compostos ou complexos altamente diluídos) (MONTFORT, 2000). No caso da homeopatia, os pacientes utilizam principalmente como tratamento paliativo ou de suporte, no qual há melhora do bem estar geral, bem como para aliviar a dor resultante da doença ou tratamentos convencionais (Revisado por MILAZZO; RUSSELL; ERNST (2006). Na Europa, 7 de 14 países comumente usam homeopatia como terapia complementar (VIKSVEEN; DYMITR; SIMOENS, 2013).

2.7 Homeopatia

2.7.1 Definição e História

A palavra homeopatia vem do grego, onde, “hómoios” + “páthos” = semelhante + doença. Essa forma de terapêutica foi fruto da pesquisa do médico alemão Christian Friedrich Samuel Hahnemann (1755-1843), fundada e solidificada a mais de 200 anos (ERNST, 1997; JONAS, JACOBS, 1998) (Figura 16) que baseia-se, de forma geral, no princípio da similaridade, onde o “semelhante cura o semelhante”. Em outras palavras, Hahnemann propôs que se uma substância é capaz de induzir uma série de sintomas em um sistema vivo saudável, baixas doses dessa mesma substância pode curar esses sintomas sobre certas circunstâncias (BELLAVITE *et al.*, 2005).



Figura 16. Christian Friedrich Samuel Hahnemann. Acima é representado o retrato de Samuel Hahnemann (1755-1843), nascido na Alemanha, formou-se em medicina e foi quem primeiro descreveu a homeopatia, sendo considerado o “pai” dessa terapia (Fonte: VICKERS; ZOLLMAN 1999).

Hahnemann estudou medicina numa época em que o ensino médico era muito teórico (século XVIII), a ponto de ser filosófico, e praticamente isento de qualquer contato com o paciente. Os tratamentos baseavam-se nas sangrias e purgativos, que na maioria das vezes piorava o quadro clínico do paciente ao invés de promover a cura (JONAS, JACOBS, 1998; Brasil, 2011). Era um pensador progressista, um crítico mordaz da medicina da sua época. Abandonou a prática da

medicina várias vezes especificamente porque não concordava e não considerava ético o uso de doses múltiplas e muitas vezes tóxicas dos medicamentos. Aos 24 anos dominava nove idiomas (latim, grego, hebraico, inglês, francês, italiano, espanhol, árabe e alemão), e era graças a esse conhecimento dos variados idiomas que Hahnemann se manteve financeiramente, por muito tempo (TÉTAU, 2001).

Apesar da homeopatia ter sido criada por Hahnemann, o princípio básico da da similitude, foi primeiramente enunciado por Hipócrates no século IV a.C. (BELLAVITE *et al.*, 2005), no entanto a criação da terapia homeopática aconteceu em 1796 quando Hahnemann descreveu o que seria a base do método homeopático. Durante a tradução de um livro sobre ervas de um famoso autor britânico, chamado William Cullen, no qual declarava que a razão da eficácia de uma droga de nome quinina contra a malária era seu amargor e adstringência, Hahnemann percebeu a irracionalidade dessa explicação e logo relacionou vários outros remédios que eram ainda mais amargos que a quinina e que não tinham qualquer efeito contra a malária. Em seguida, descreveu um experimento que realizou usando a si próprio como cobaia, no qual demonstrava a razão pelo qual a quinina atuava de forma eficaz contra a malária, cuja descrição é transcrita abaixo:

“Tomei, durante vários dias, a título de experiência, quatro dracmas de quina boa (cinchona, fonte de quinina) duas vezes ao dia. Meus pés e pontas dos dedos das mãos ficaram gelados, eu fiquei lânguido e sonolento; em seguida meu coração começou a palpitar, meu pulso ficou rígido e rápido; uma ansiedade e tremedeira intoleráveis; prostração em todos os membros; depois, pulsação na cabeça, rubor na face, sede; logo todos os sintomas geralmente associadas à febre intermitente apareceram de forma sucessiva, mas sem o rigor propriamente dito... Esse paroxismo durava sempre de duas a três horas e recorria quando eu repetia a dose. Descontinuí o tratamento e recobrei a saúde.” (JONAS, JACOBS, 1998)

Hahnemann sugeriu, basicamente, que a mesma droga poderia atuar de forma terapêutica quando produzia, em uma pessoa saudável, sintomas semelhantes à de uma pessoa doente. Assim Hahnemann constata a teoria dos semelhantes, “*similia similibus curentur*” – o semelhante cura o semelhante, que de fato é uma teoria Hipocrática (Brasil, 2011). A princípio, essa constatação de Hahnemann parece ser absurda e sem fundamento, mas se analisarmos com mais cuidado a terapêutica médica atual veremos que são usadas formas de abordagem dos semelhantes, assim como a que Hahnemann propôs. Um exemplo é uso da

Ritalina, cuja droga é um estimulante do sistema nervoso central, e no entanto é utilizada no tratamento de pacientes hiperativos (JONAS, JACOBS, 1998).

A partir de então, nasceu um sistema para o desenvolvimento científico da escola da semelhança, que orientaria a descoberta de outros medicamentos usados na homeopatia até hoje. Hahnemann e seus alunos testaram dezenas de medicamentos mais usados; deram-lhes a pessoas saudáveis (inclusive eles mesmos, amigos e familiares) e observaram e documentaram cuidadosamente os sintomas produzidos (JONAS, JACOBS, 1998; TÉTAU, 2001; BELLAVITE *et al.*, 2005). Essas observações e experimentações deram origem às principais obras de Hahnemann: *Organon*, *Doenças Crônicas* e *Matéria Médica*, os quais foram publicados em várias edições (BELLAVITE *et al.*, 2005).

Desde o início, Hahnemann partiu do princípio de que pessoas diferentes teriam graus diferentes de sensibilidade até aos mesmos medicamentos. Essa abordagem deu a homeopatia um foco diferente da medicina convencional. A homeopatia tornou-se a medicina do indivíduo e não da média ou do comum, sendo este, o primeiro fundamento da homeopatia, a individualização do tratamento. A homeopatia tornou-se um sistema que se concentrava de forma intensa no indivíduo e levava em consideração todos os sintomas, subjetivos e objetivos, físicos, emocionais e mentais. Esses dois aspectos, individualização e holismo, são, ao mesmo tempo, o ponto forte e fraco da homeopatia. A ciência moderna tomou uma direção diferente, agrupando os pacientes em categorias de diagnóstico e dividindo-os em vários grupos para o tratamento por diferentes especialidades (JONAS, JACOBS, 1998; TÉTAU, 2001; BELLAVITE *et al.*, 2005).

Após testar os medicamentos detalhadamente, Hahnemann passou a aplicá-los em enfermos. A princípio administrou-os em doses normais, porém se deparou com o mesmo problema que abominava na prática médica convencional, os medicamentos produziam efeitos tóxicos nocivos. A partir de então começou a diluir os medicamentos de uma forma singular, “potencializando” o medicamento (obtido pela extensiva “sucussão”, nada mais é do que agitação, seguida de diluições seriadas) (WAISSE, 2012), administrando-os em doses cada vez menores. Essa prática não somente reduziu ou aboliu seus efeitos tóxicos, como também paradoxalmente aumentou seu poder curativo (BELLAVITE *et al.*, 2005), sendo este um dos aspectos mais controversos da homeopatia até hoje. Embora, anteriormente a Hahnemann, o médico Paracelso (séc. XVIII) já havia observado e citou que “a

dose faz o veneno”, ou seja, a quantidade ingerida de uma substância é que determina quais serão os efeitos no organismo (JONAS, JACOBS, 1998; TÉTAU, 2001), sendo esta uma das afirmações mais importantes, farmacologicamente, citada por Paracelso. Posteriormente as conclusões de Hahnemann, pesquisadores da farmacologia observaram que doses baixas de medicamentos tinham efeito paradoxal em comparação a doses altas, corroborando assim com o que Hahnemann havia visto (JONAS, JACOBS, 1998; TÉTAU, 2001).

Dessa forma, a homeopatia segue quatro pressupostos e fundamentos baseados nas observações e estudos de Hahnemann: a lei da semelhança (1), a escolha do medicamento a partir dos sintomas da doença (2), a utilização de doses mínimas (3), e a utilização de medicamentos únicos (4).

Em 1840 o médico francês Benoit Jules Mure, introduziu a homeopatia no Brasil, onde as matérias primas (tinturas mãe) homeopáticas eram importadas principalmente da Europa. Atualmente, o preparo dos medicamentos homeopáticos é realizado seguindo as normas da Farmacopeia Homeopática Brasileira, mas todos os preceitos básicos foram e são mantidos de acordo com o que Hahnemann postulou (Brasil, 2011). Em 1841 Mure fundou a Escola de Homeopatia do Rio de Janeiro, em 1842 surge o Instituto Homeopático de Saí (Santa Catarina – SC) e a primeira farmácia homeopática do Rio de Janeiro. Em 1845 é criada a Escola homeopática do Brasil (direção de João Vicente Martins), a qual é posteriormente substituída pela Academia Médico-Homeopática do Brasil. Mais tarde, em 1914, Licínio Cardoso, fundou no Rio de Janeiro a Faculdade Hahnemanniana, a ela foi anexada o Hospital Homeopático do Rio de Janeiro. Em 1966, no governo de Castello Branco foi decretada obrigatória a inclusão da Farmacotécnica Homeopática em todas as faculdades de farmácia do Brasil. Após 11 anos (1977) foi publicada a primeira edição oficial da Farmacopeia Homeopática Brasileira. Por fim, em 1980, o Conselho Federal de Medicina reconheceu oficialmente a homeopatia como especialidade médica (Revisado por CORRÊA, BATISTA, QUINTAS, 1997)

Atualmente, a Homeopatia como prática de saúde, está disponível gratuitamente no Sistema Único de Saúde (SUS), já que em 2006 foi aprovada a portaria nº 971 que regulariza a Política Nacional de Prática Integrativas e Complementares (PNPIC), onde o Ministério da Saúde garante acesso gratuito às práticas integrativas. Com isso, é observado que a utilização da Homeopatia vêm crescendo no decorrer dos anos. Segundo o Ministério da Saúde, em 2000 foram

realizados 257.508 consultas em homeopatia, já em 2007 foram 312.533 consultas (disponível em portalsaude.saude.gov.br). Esses dados demonstram o crescimento da demanda por práticas integrativas, como a homeopatia, e a importância dessa terapia para saúde pública.

2.7.2 Origem e preparação dos produtos homeopáticos

A origem das substâncias usadas é variada podendo ser derivadas de: plantas, animais, minerais, substâncias química-farmacêuticas, substâncias e/ou materiais biológicos, patológicos ou não, além de outros agentes de diferente natureza (Brasil, 2011).

As substâncias solúveis são dissolvidas em uma solução hidroalcoólica. Essa mistura é armazenada em um recipiente hermeticamente fechado, por tempo determinado para cada tipo de material e agitado frequentemente. Após, esse preparado é filtrado e essa solução resultante é chamada de tintura mãe (TM), matéria prima para a preparação dos produtos homeopáticos.

O processo de preparação compreende a diluição em etapas com agitação ou succussão (dinamização) entre cada etapa. O resultado final do produto dinamizado e diluído é chamado de potência (WAISSE, 2012). Há três sistemas de dinamizações homeopáticas, o decimal (1:10), representado por DH (p.ex.: *Thuya* 30DH, é dito *Thuya* na potência 30 da escala decimal, ou seja a substância foi diluída 1:10, por 30 vezes); o centesimal, representado por CH (p.ex.: 200CH, potência 200 da escala centesimal); e o cinquenta milesimal representado por 1/LM (p. ex.: 1/LM, uma potência da escala cinquenta milesimal). Na escala decimal, centesimal e cinquenta milesimal, os medicamentos são diluídos 1:10, 1:100 e 1:50.000, respectivamente (JONAS, JACOBS, 1998).

Por fim, a homeopatia é uma ciência relativamente nova onde as pesquisas científicas estão em pleno desenvolvimento. Diversos modelos experimentais, tais como: modelos *in vitro* e *in vivo*, clínico, randomizado, duplo cego, entre outros, têm sido realizados com intuito de melhorar a compreensão dos efeitos das substâncias altamente diluídas, a fim de validar essa terapêutica que têm ótimos resultados, mas ainda sofre preconceito na área médica.

2.8 Homeopatia e Câncer

Vários estudos com a homeopatia têm sido realizados no mundo com ênfase em diferentes perguntas e modelos experimentais. Em um trabalho experimental realizado por SUNILA e colaboradores (2009), foi investigada a ação *in vitro* de compostos altamente diluídos em diferentes linhagens celulares, dentre elas: linhagem de linfoma (DLA), carcinoma de Ehrlich (ECA), fibrosarcoma murino (L929) e células de ovário (CHO). Neste trabalho foi observado que os compostos altamente diluídos testados apresentaram citotoxicidade nas linhagens tumorais, no entanto não foram citotóxicos para as células CHO.

BEN-ARYE e colaboradores (2012) fizeram um trabalho de revisão bibliográfica no qual identificaram 85 artigos de estudos clínicos relacionando diretamente a medicina alternativa e complementar (entre elas o uso de compostos altamente diluídos) na terapia adjuvante ao câncer.

Há mais de 10 anos nosso grupo de pesquisa tem testado a ação de compostos e complexos naturais altamente diluídos em células do sistema imune (PIEMONTE; BUCHI, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2011), na ativação e diferenciação de células tronco (CESAR *et al.*, 2008; ABUD *et al.*, 2006; CESAR *et al.*, 2011) e atividade antitumoral (SATO *et al.*, 2005; GUIMARÃES *et al.*, 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Recentes estudos demonstraram efeitos antitumorais dos complexos em células de melanoma. Essas células foram reconhecidas por macrófagos, que foram cultivados na presença de linfócitos pré-tratados com os complexos altamente diluídos (GUIMARÃES *et al.*, 2009). Em outro estudo, em modelo *in vitro*, o pré-tratamento reduziu a capacidade invasiva das células B16F10 e aumentou a adesão celular. Nesse mesmo trabalho, em modelo *in vivo*, foi observado que os animais tratados com complexos naturais altamente diluídos exibiram menor metástase pulmonar, quando comparados com os animais que não foram tratados (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Recentemente, ainda utilizando o melanoma murino como modelo, Andrade (2011) demonstrou que um complexo altamente diluído (o M1) é capaz de inibir o desenvolvimento de tumor sólido (subcutâneo) pela redução da angiogênese.

A partir dos resultados obtidos por Guimarães e colaboradores, surgiu a hipótese de que os complexos naturais altamente diluídos estariam alterando

mecanismos celulares e moleculares das células de melanoma, chaves para a progressão tumoral, como a capacidade de migração e invasão celular, cujo tema é o objeto desse trabalho.

3 JUSTIFICATIVA

Diante de tantas variáveis que rodeiam essa rede intrincada de mecanismos que culminam com o desenvolvimento e progressão do melanoma, e diante da ineficácia dos tratamentos atuais para essa patologia grave, fazem-se necessários estudos de novas terapias com efeitos preferencialmente múltiplos. Nesse sentido, destaca-se a ação dos complexos naturais altamente diluídos sobre células tumorais, em especial o melanoma. Desde 2008, é testado o efeito antitumoral dos complexos em modelo *in vitro* e *in vivo* usando células de melanoma (B16F10), com resultados promissores (GUIMARÃES *et al.*, 2009; 2010; ANDRADE, 2011). No entanto, são necessários estudos complementares para que se possa compreender como esses complexos agem na célula, para que ocorra efeito inibitório sobre a capacidade de invasão *in vitro*, bem como a atividade antitumoral *in vivo*, como observado anteriormente.

4 OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho foi avaliar as possíveis alterações celulares e moleculares nas células de melanoma murino (B16F10), após o tratamento com complexos naturais altamente diluídos, que justifiquem a diminuição do potencial metastático observada em estudos anteriores.

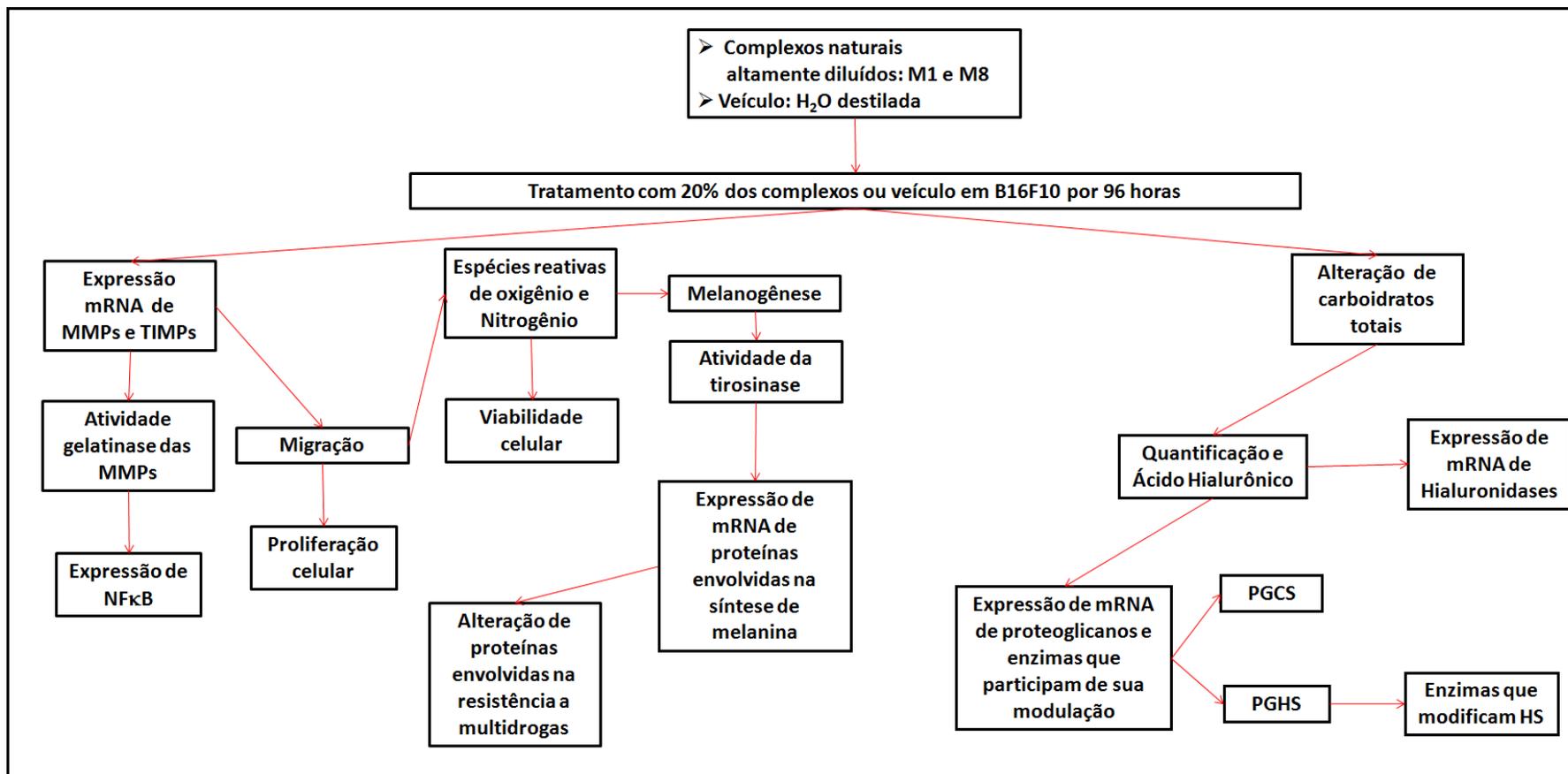
4.2. Objetivos Específicos

Para responder o objetivo geral foram determinados os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Avaliar componentes importantes para a invasão celular, em especial as MMPs;
- ✓ Observar possíveis alterações na capacidade migratória das células e de metabólitos que estão envolvidos com esse processo celular;
- ✓ Verificar se os complexos podem ocasionar alterações na viabilidade das células, bem como na capacidade de proliferação celular;
- ✓ Analisar possíveis alterações na produção de melanina e de moléculas que estão envolvidas na sua síntese;
- ✓ Avaliar alterações no funcionamento do mecanismo de resistência a multidrogas.
- ✓ Investigar alterações em carboidratos totais e glicoconjugados (glicoproteínas, glicosaminoglicanos e proteoglicanos);

PLANO DE TRABALHO

Para alcançar os objetivos do trabalho os experimentos foram realizados de acordo com o fluxograma abaixo (Quadro 2):



Quadro 2. Representação esquemática da estratégia experimental utilizada para realização dos objetivos deste trabalho. O quadro acima ilustra o fluxograma experimental adotado para alcançar os objetivos propostos. Em materiais e métodos estão descritos detalhadamente os procedimentos realizados em cada etapa.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Complexos naturais altamente diluídos

Os complexos naturais altamente diluídos foram preparados segundo as normas da Farmacopeia Homeopática Brasileira. Tinturas-mãe foram adquiridas a partir de agências autorizadas e indicadas pelo Ministério de Saúde que asseguram a qualidade (livre de endotoxinas) e a composição físico-química dos produtos. A partir destas tinturas-mães originais e padronizadas, foram realizadas diversas diluições decimais (DH) em água destilada. Os complexos naturais altamente diluídos, assim como o veículo (água destilada submetida às mesmas condições de produção dos complexos M1 e M8, sem qualquer adição de tinturas-mães) foram manipulados por Narciso da Lozzo Neto - CRF-PR 5604, na Farmácia Homeoterápica (<http://www.homeoterapica.com.br/>).

Neste trabalho foram utilizados dois complexos naturais altamente diluídos, denominados M1 e M8, os quais tem sua composição descrita na Tabela 1. Para a realização dos ensaios, os medicamentos foram esterilizados por filtração em membranas estéreis 0,22 μ m (Millipore, MA, USA) e mantidos protegidos da luz, à temperatura ambiente, por no máximo 2 meses. Os resultados obtidos foram comparados com o grupo veículo (preparado nas mesmas condições de produção que M1 e M8).

TABELA 1. Composição dos complexos naturais altamente diluídos com diluição inicial e final de cada elemento.

<i>Componentes</i>	<i>Matriz</i>	<i>Concentração final</i>		<i>Concentração final (v/v %)</i>
		M1	M8	
Aconitum napellus	TM	20DH	20DH	$0,1 \times 10^{-19}$
Arsenicum album	6DH	18DH	18DH	$0,1 \times 10^{-17}$
Asa foetida	TM	20DH	20DH	$0,1 \times 10^{-19}$
Calcareo carbonica	8DH	16DH	16DH	$0,1 \times 10^{-15}$
Chelidonium majus	TM	20DH	-	$0,1 \times 10^{-19}$
Cinnamon	TM	20DH	-	$0,1 \times 10^{-19}$
Conium maculatum	5DH	17DH	17DH	$0,1 \times 10^{-16}$
Echinacea purpurea	TM	20DH	-	$0,1 \times 10^{-19}$
Gelsemium sempervirens	TM	20DH	-	$0,1 \times 10^{-19}$
Ipecacuanha	5DH	13DH	13DH	$0,1 \times 10^{-12}$
Phosphorus	12DH	20DH	20DH	$0,1 \times 10^{-19}$
Rhus toxicodendron	6DH	17DH	17DH	$0,1 \times 10^{-16}$
Silicea	12DH	20DH	20DH	$0,1 \times 10^{-19}$
Sulphur	12DH	24DH	24DH	$0,1 \times 10^{-23}$
Thuja occidentalis	6DH	19DH	19DH	$0,1 \times 10^{-18}$

* TM: tintura mãe, DH: decimal

5.2. Linhagem celular e procedimentos de cultivo

Para a realização do trabalho foram utilizadas células de melanoma murino (B16F10), adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). Essas células foram mantidas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (livre de endotoxinas) (Lonza, Walkersville, MD, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Life Technologies Inc., Rockville, MD, EUA), 1 U/mL de penicilina e 1 µg/mL de streptomina (Life), a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

5.3. Tratamento *in vitro*

Para todos os experimentos, 24 horas após o plaqueamento celular em frascos de cultura apropriados, as células foram tratadas com os complexos (M1 ou M8) ou com veículo, utilizando 20% de diluição final, com reforço de 1% a cada 24 horas, totalizando 96 horas de tratamento. A escolha do volume de 20% e reforço de 1% foi baseada em trabalho anterior do grupo (PIEMONTE, BUCHI, 2002). Os complexos ou o veículo foram vigorosamente agitados (sucussionados), 20 vezes contra a palma da mão, imediatamente antes de cada tratamento.

5.4. Extração de RNA e síntese de cDNA

Foram plaqueadas $2,5 \times 10^4$ células em placas de cultura de 6 poços e tratadas por 96 horas. O RNA total foi isolado utilizando o Kit de extração de E.Z.N.A.® RNA Isolation Kits (Omega Bio-Tek, Georgia, EUA) conforme protocolo sugerido pelo fabricante. O RNA total obtido foi posteriormente quantificado espectrofotometricamente utilizando NanoVue (GE Healthcare Life Sciences) e processados para a obtenção de cDNA. A síntese do “cDNA poliA+” foi realizada a partir de 2 µg de RNA total, utilizando primers Oligo dT(18) (Fermentas Biotech Ltd.) e a enzima SuperScript III (Life Technologies Inc., Carisbad, CA, EUA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

5.5. Quantificação da expressão gênica por qRT-PCR

A expressão dos genes de interesse foi quantificada comparando as quantidades de mRNA de cada gene, em relação à expressão de genes constitutivos na célula (controles internos). Nesse trabalho foram utilizados 3 controles internos para normalização:

1. hGAPDH, que codifica para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, uma enzima da via glicolítica;
2. hHPRT, gene que codifica para a hipoxantina-guanina fosforibosil transferase, que é uma enzima do metabolismo de purinas e;
3. ACTB, gene que codifica a β -actina

Para isso, os cDNAs, obtidos de cada linhagem, foram diluídos 100 vezes e utilizados nas reações de qRT-PCR. Todos os experimentos foram realizados no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems) utilizando SYBr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e primers específicos para os genes de interesse. As eficiências dos primers foram determinadas de acordo com o método descrito por Schmittgen e Livak (2008). A reação seguiu a curva de temperatura padrão do equipamento, repetidos por 40 ciclos. A expressão dos genes foi apresentada como valores relativos à média geométrica entre as expressões dos três genes endógenos de expressão constitutiva e independente da progressão dos tumores: GAPDH,

HPRT e ACTB, através do programa geNorm v. 3.4, que utiliza o método descrito por Vandesompele e colaboradores (2002).

Os *primers* foram desenhados utilizando o programa Primer Express® v. 2.0 da Applied Biosystems e foram avaliados quanto à especificidade utilizando o programa BLAST, comparando com o banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information). A seguir é mostrado a tabela com os *primers* utilizados (Tabela 2).

TABELA 2. Sequência e concentração dos primers utilizados nos experimentos de qRT-PCR.

Gene	Concentração	Sentido	Sequência
MMP-2	800nM	F: R:	5'-CATCGCCCATCATCAAGTTCC-3' 5'-AGCCATAGAAAGTGTTTCAGGTATT-3'
MMP-9	800nM	F: R:	5'-GAACTCACACGACATCTTCCAGT-3' 5'-GTCCACCTTGTTTCACCTCATTT-3'
MT1-MMP	800nM	F: R:	5'-TGTCCAGATAAGCCCAAAAAC-3' 5'-ATCCATCACTTGGTTATTCCCTCAC-3'
TIMP-1	400nM	F: R:	5'-TTTCTCAAAGACCTATAGTGCTGG-3' 5'-CTCCAGTTTGCAAGGGATAGA-3'
TIMP-2	400nM	F: R:	5'-GAGCGAGAAGGAGGTGGA-3' 5'-CCGCACACTGCTGAAGA-3'
TIMP-3	400nM	F: R:	5'-GCCTCAAGCTAGAAGTCAACA-3' 5'-CCAGGTGGTAGCGGTAATTG-3'
MITF	400nM	F: R:	5'-CTAGGTACTCTGATCCCCAAGTCAA-3' 5'-CCAGCTTCTTCTGTGCGTTTTTC-3'
Tirosinase	400nM	F: R:	5'-TGGTTCCTTTCATACCGCTC-3' 5'-CTGACTCTTGGAGGTAGCTGT-3'
TYRP-1	600nM	F: R:	5'-GATGCGGTCTTTGACGAATGG-3' 5'-TCTGTGTTGGTAACTGGAGGC-3'
TYRP-2	600nM	F: R:	5'-TTTGACAGCCCTCCCTTCTTC-3' 5'-GAGAGTCCAGTGTTCGGTCTG-3'
Perlecan	400nM	F: R:	5'-CCGTCCTGGTCTCGATTACA-3' 5'-AGGAAGTCTCGATGCGGATG-3'
Glipicam-3	400nM	F: R:	5'-TCTACGACATGGAGAATGTGC-3' 5'-CAGATCTATATTGGCGTTGCTGG-3'
Sindecam-1	800nM	F: R:	5'-GGCAACTCGGATCCACGAA-3' 5'-GGAGGAACATTTACAGCCACAA-3'
Sindecam-2	400nM	F: R:	5'-TTCCCCCAAAGTGGAACCAT-3' 5'-TGTCAACTTCCTCCTTGTCAGT-3'
PGCS4	400nM	F: R:	5'-GTACCATGCTACTCCGCAAC-3' 5'-GAGATTTCCAGCCGGTGAAC-3'
Heparanase	400nM	F: R:	5'-TCTCCTTGACTACTGCTCTTCC-3' 5'-ATGCAACTCCACAAAGTCTTCTC-3'
Sulfatase	400nM	F: R:	5'-CCTTCGCCGTGTATCTCAAC-3' 5'-CACGTATGAGCCGTTGTACTC-3'
Hialuronidase-1	400nM	F: R:	5'-AAAGTTTGGAGAATGAAGCCCT-3' 5'-GGTTGGATACCACGGAACCT-3'
Hialuronidase-2	400nM	F: R:	5'-GACTCGGAAGACGCTTCAA-3' 5'-TTGACTATGTAGGGAACCAGCA-3'
ACTB	800nM	F: R:	5'-AAGATCAAGATCATTGCTCCTG-3' 5'-CGTACTCCTGCTTGCTGATC-3'
GAPDH	800nM	F: R:	5'-ATCTTCTTGTGCAGTGCCAG-3' 5'-GGCAACAATCTCCACTTTGCC-3'
HPRT	800nM	F: R:	5'-TCCCTGGTTAAGCAGTACAGCCCC-3' 5'-AGTCTGGCCTGTATCCAACACTTCG-3'

5.6. Atividade de metaloproteases por zimografia

Para avaliação da atividade de metaloproteases, 1×10^3 células foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços e tratadas com os complexos. O meio foi coletado e 20 μ l do sobrenadante contendo tampão de amostra com SDS (livre de agentes redutores) foi resolvido por SDS-PAGE 10% copolimerizado com 1 mg/mL gelatina (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, EUA). Após a eletroforese, os géis foram lavados 2 vezes com solução Triton-X 2,5% por 15 minutos a temperatura ambiente e então incubados em tampão contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM CaCl_2 e 1 μ M ZnCl_2 por 18 horas. Os géis foram fixados e corados utilizando Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, EUA) 0,5%, dissolvido em solução água:metanol:ácido acético glacial na proporção 6:3:1. A remoção do excesso de corante foi realizada utilizando solução descolorante, contendo 10% de metanol e 10% de ácido acético, diluídos em água. Um padrão de peso molecular foi utilizado “*Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder*” (Thermo Scientific, Rockford, EUA). A atividade proteolítica foi observada pelas bandas não coradas nos géis, analisadas com o programa GelQuant versão 1.7.8 da Biochem Lab Solutions.

5.7. Imunocitoquímica para NF κ B p65

Células B16F10 (5×10^3) foram plaqueadas em lamínulas circulares em placas de cultura de 24 poços. Após o tratamento, o meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS a 4°C. Em seguida, as células foram fixadas em formaldeído 2% diluído em PBS por 30 minutos a temperatura ambiente, lavadas com 2 vezes com PBS e permeabilizadas com 0,25% de Triton X-100 por 5 minutos. As células foram lavadas novamente com PBS, e incubadas com 1% de BSA diluído em PBS por uma hora a temperatura ambiente. A seguir, as células foram incubadas com 4 μ g/ml anticorpo primário anti-NF κ B p65 IgG (Santa Cruz Biotocnology Inc., #SC-8008) diluído em PBS contendo 1% de BSA por 1 hora a 4°C. Ao final da incubação, as células foram lavadas por duas vezes em PBS, e incubadas com 5 μ g/ml, diluído em PBS/BSA 1%, de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo

conjugado com FITC (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EUA) por 40 minutos, em temperatura ambiente e protegido da luz. Posteriormente, as células foram lavadas 5 vezes em PBS, e as lâminas foram montadas com meio de montagem Fluoromount G contendo DAPI (EMS). As imagens foram obtidas usando o microscópio de fluorescência motorizado Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE) equipado com escâner de lâminas automático VSlide (Metasystems, Altlussheim, DE) e analisadas no *software* MetaSystems Images.

5.8. Ensaio de migração celular

Para avaliar o processo migratório foi realizado o método de *Scratch* (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Este método é aplicável somente para células de característica aderentes, e é baseado na capacidade migratória após remoção de uma camada de células da placa de cultura. Para realização deste experimento, as células B16F10 foram plaqueadas e tratadas de modo que ao término do tempo de tratamento fosse atingido alta confluência celular. Assim, com auxílio de uma ponteira de 10µl foi realizado um risco removendo uma camada de células da placa de cultura. Em seguida, a placa foi lavada (para a remoção de células soltas) e novo meio de cultura foi adicionado. As placas foram mantidas em placa aquecida (a 37°C), sobre a platina do microscópio invertido, modelo AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). As fotos foram obtidas em diferentes tempos (0, 6 e 24 horas), no mesmo campo visual.

Com o intuito de confirmar possíveis alterações na migração celular, desencadeada pelos complexos, outra ferramenta de avaliação foi realizada. Assim a capacidade migratória das células B16F10 foi avaliada também, mediante a capacidade das células de atravessarem um filtro de polycarbonato. Para tanto, foi utilizado insertos de *transwell* com filtros de polycarbonato com poros de 8µm (Millipore) para placas de 24 poços (Corning-Costar, Cambridge, MA). Como quimioatratador foi adicionado fibronectina, pelo tratamento da superfície inferior do *transwell* com 100 µl de solução de fibronectina (0,1 µg/ml). Células B16F10 pré tratadas (2×10^5 /inserto) foram suspensas em meio DMEM sem SFB e aplicadas dentro do inserto, em um volume de 400 µl e incubadas em placas de cultura de 24

poços contendo 600 μ l de DMEM com 20% de SFB a 37°C, 5% de CO₂ por 28 horas. Posteriormente, os insertos foram fixados com metanol absoluto, por 10 minutos. A seguir, foram corados com cristal violeta 0,5%, suavemente lavados, e as células da superfície superior foram removidas com auxílio de um cotonete. As células que migraram através dos filtros foram fotografadas em microscópio de luz em objetiva de 10 vezes e eluídas com ácido acético 30%. Finalmente a absorbância do corante eluído foi mensurada a 590nm usando EpochTM Microplate Spectrophotometer (BioTek® Instruments, Inc.). Os dados foram expressos como porcentagem de migração em relação ao veículo.

5.9. Densidade celular

Para determinar se os complexos interferiam na proliferação das células a ponto de alterar a densidade celular, após o período de incubação com o tratamento, foi realizado um ensaio colorimétrico utilizando o corante cristal violeta. Após a eluição do corante, é feita a mensuração da absorbância, a qual fornece um indicativo do número relativo de células presentes, utilizando metodologia descrita por Gillies e colaboradores (1986) com modificações. As células B16F10 (1×10^4) foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços e tratadas com os complexos, com o veículo (conforme descrito no item 6.3) ou mitomicina C 0,4 μ g/ml (Sigma Aldrich #M0503), ficando em contato com as células por apenas 5 minutos (conforme orientação do fabricante). A mitomicina C é um antibiótico que inibe a síntese de DNA por reagir covalentemente com o DNA formando ligações cruzadas entre suas fitas complementares. Esta interação inibe a separação das fitas e conseqüentemente sua replicação. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 2% por 30 minutos a temperatura ambiente, coradas com uma solução de cristal violeta a 0,5% por 30 minutos sob agitação, lavadas com PBS e eluídas com ácido acético a 33%. A densidade óptica foi mensurada a 570 nm usando EpochTM Microplate Spectrophotometer (BioTek® Instruments, Inc.). Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao veículo.

5.10. Detecção de espécie reativa de oxigênio e óxido nítrico (ROS e NO)

Para a detecção de ROS foi utilizada uma sonda sensível, 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) (Life, #D-399), a qual difunde-se livremente através da membrana celular. Uma vez dentro da célula é desacetilada por esterases formando diclorofluoresceína (DCFH₂), subseqüentemente a DCFH₂ reage com ROS intracelulares para produzir um produto altamente fluorescente DCF (2'7'-diclorofluoresceína). De forma similar, para a detecção de NO, a sonda DAF-FM diacetato (Life, #D-23842) representa um importante reagente não fluorescente, utilizado para quantificação de baixas concentrações de óxido nítrico (NO). Esse reagente difunde-se através da membrana e dentro da célula é desacetilado, formando DAF-FM, o qual reage com NO gerando benzotriazol, um composto altamente fluorescente (KOJIMA *et al.*, 1998). Para a realização desse ensaio, as células B16F10 (1x10³) foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços e tratadas, como descrito anteriormente. Ao término do tempo de tratamento, as células foram incubadas com 1 µM ou 5 µM de H₂DCFDA ou de DAF-FM diacetato, respectivamente, por 30 minutos a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas com PBS por mais 30 minutos para completa de-esterificação. A emissão de fluorescência foi detectada usando o leitor de microplacas Microplate Reader Infinity® F200 PRO – TECAN com comprimento de onda de excitação e emissão de 495 e 515 nm, respectivamente. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao veículo.

5.11. Ensaio para detecção da concentração de nitrito

O NO, quando produzido pelas células, reage com outras moléculas do fluido biológico onde o produto final das reações é o nitrito (NO₂⁻) e o nitrato (NO₃⁻). Além disso, o NO por ser altamente reativo dificulta a detecção. Assim, um método interessante é a mensuração dos produtos finais das reações do NO. Para isso foi utilizado 2,3-diaminonaftaleno (DAN) (Sigma-Aldrich) que, quando em contato com nitrito reage produzindo uma substância fluorescente 1(H)-Naftotriazol (MISKO *et al.*, 1993). Então, células B16F10 foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços e

tratadas. Em placa de leitura preta 150 µl do sobrenadante foram incubados com 1,5µl DAN diluído em HCl 0,62 M por 30 minutos a 37°C. Em seguida foram adicionados 5 ml de NaOH a 2,8 N para parar a reação, e a fluorescência produzida foi detectada usando o leitor de microplacas Microplate Reader Infinity® F200 PRO – TECAN com comprimento de onda de excitação e emissão de 365 e 450 nm, respectivamente. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao veículo.

5.12. Atividade mitocondrial pelo método MTT

O método de avaliação de citotoxicidade pelo MTT (brometo de (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich) é um ensaio colorimétrico que se baseia na capacidade de redução do sal de MTT (de cor amarelada), em cristais de formazam de coloração violeta, pela atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. A eluição desses cristais em DMSO permite a leitura colorimétrica pela absorvância a 550 nm. Este método foi descrito primeiramente por MOSMANN (1983) para a avaliação da viabilidade e proliferação de células, e posteriormente sua aplicação foi estendida para a mensuração da atividade celular (GERLIER; THOMASSET, 1986). Para a realização deste ensaio, células B16F10 (1×10^3) foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços e tratadas com os complexos ou veículo. Três horas antes de completar o tempo de tratamento, as células do grupo controle positivo foram expostas a 100 µl de saponina 0,01%, e todas as células foram incubadas com 20 µl de solução de MTT (5 mg/ml). As absorvâncias foram mensuradas em leitora de microplaca Epoch™ Microplate Spectrophotometer (BioTek® Instruments, Inc.) a 540 nm. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao veículo.

5.13. Método de avaliação do potencial de membrana mitocondrial por Rodamina 123 (Rho 123)

A rodamina 123 (Sigma-Aldrich) é um reagente catiônico fluorescente o qual se mostra acumulado seletivamente à mitocôndria, já que existe um potencial transmembrânico nesta organela (interior negativo) em células vivas (RONOT *et al.*, 1986). Assim, células B16F10 (5×10^5) pretratadas foram aliqüotadas em tubos para citômetro, lavadas 2 vezes com 500 μ l de PBS e incubadas com 4 μ M de rodamina 123 por 15 minutos, a temperatura ambiente. A seguir, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, ressuspensas em 500 μ l de PBS, e os resultados adquiridos (em FL-1) e analisadas usando citômetro de fluxo FACSCalibur™ da BD (Becton Dickinson and Company, San Diego, CA, EUA). Um total de 20.000 eventos por amostra foram coletados e posteriormente analisados no Cyflogic software.

5.14. Viabilidade Celular com Anexina – V/7-AAD

Neste ensaio foi realizado uma dupla marcação com Anexina-V, conjugada com FITC e 7-AAD com um KIT da BD (Becton Dickinson Biosciences, San Diego, CA, EUA). A anexina-V é uma proteína que se liga especificamente em fosfatidilserina, um fosfolípido encontrado exclusivamente na bicamada interna de células vivas, o qual está presente na bicamada externa apenas quando a célula está inviável. Vale lembrar que esse evento é marcante no início da apoptose. Já o 7-AAD é um intercalante de DNA, que apenas consegue entrar na célula quando a mesma está com a membrana rompida (característica de apoptose tardia). Assim, esta análise permite determinar a porcentagem de células em apoptose inicial e apoptose tardia.

Células B16F10 foram plaqueadas (5×10^4) em garrafas pequenas e mantidas *overnight* em incubadora de CO₂. A seguir, as células foram tratadas com os complexos ou veículo, ou com camptotecina 5 μ M durante 5 horas, usada como controle positivo para morte celular. Ao final do tratamento, as células foram aliqüotadas em tubos de citômetro (1×10^5 por tubo), incubadas com 2,5 μ l de Anexina-V FITC e 5 μ l de 7-AAD por 15 minutos. Um total de 20.000 eventos foram

adquiridos (em FL-1 e FL-3, respectivamente) por amostra em citômetro de fluxo FACSCalibur™ da BD (Becton, Dickinson) através do software CellQuest (BD Biosciences) e analisados por Cyflogic software. As células positivas para ambos os marcadores foram quantificadas como inviáveis.

5.15. Análise do conteúdo de melanina

Uma das principais características das células B16F10 é a grande produção do pigmento melanina, que está envolvida em alguns eventos da tumorigênese. Para realização desse método o conteúdo de melanina foi estimado de acordo com a metodologia descrita por Whittaker (1963), com modificações (ZHOU *et al.*, 2012). Assim, células B16F10 (1×10^3) foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços e tratadas. A seguir, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e incubadas por 1 hora com uma solução de NaOH 1 N com 10% de DMSO a 80°C. O conteúdo de melanina solubilizado foi mensurado em leitor de microplacas e Epoch™ Microplate Spectrophotometer (BioTek® Instruments, Inc.) a 405nm. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao veículo.

5.16. Atividade da tirosinase intracelular

Células B16F10 (1×10^5), plaqueadas em placas de cultura de 6 poços, tratadas, foram lavadas com PBS, lisadas com um tampão de PBS 100 mM (pH 6,8) contendo 1% de Triton X-100 e 1 mM de PMSF e centrifugadas a 3000g por 5 minutos. Em uma placa de leitura de 96 poços, foram misturados 30 µl do sobrenadante das células, 58,6µl de L-tirosina 1 mM, 58,6 µl de PBS 50 mM (pH 6,5) e 52,4 µl de água destilada. Em seguida foi mensurada a diferença de absorbância, usando um leitor de microplacas Epoch™ Microplate Spectrophotometer (BioTek® Instruments, Inc.) a 405 nm. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao veículo.

5.17. Atividade do mecanismo de resistência a multidrogas (MDR)

Este ensaio foi realizado de acordo com método descrito por Cornwall e colaboradores (1995) com algumas modificações. O método é baseado na exclusão da rodamina b por bombas de efluxo inseridas na membrana plasmática (família de proteínas denominadas de ABC transportadores), em que o acúmulo de rodamina b no interior da célula indica funcionamento prejudicado desse tipo de transporte. Para realização desse método, células B16F10 (1×10^3) tratadas, foram incubadas com 200 μ l de PBS contendo 1 μ M de rodamina b por 30 minutos (mantidas protegidas da luz em temperatura ambiente) e lavadas 2 vezes com PBS. Em seguida, 200 μ l de PBS foram adicionados e a intensidade de fluorescência resultante do acúmulo de rodamina b foi determinada usando o leitor de microplacas Microplate Reader Infinity® F200 PRO – TECAN onde foi feita a excitação a 554 nm e a emissão a 627 nm. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao veículo.

5.18. Coloração de carboidratos com PAS

Células B16F10 (5×10^3) foram plaqueadas em lâminulas circulares em placas de cultura de 24 poços e tratadas. A seguir, as células foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos em temperatura ambiente, e lavadas novamente com PBS cinco vezes. Em seguida as células foram incubadas com 200 μ l de ácido periódico a 1% diluído em PBS por 30 minutos, lavadas três vezes com PBS e incubadas com 200 μ l de reativo de Schiff pH (7,0) por 30 minutos. Por fim, as células foram lavadas com água de torneira, duas vezes por cinco minutos e as lâminas foram montadas com Entellan (Merck). As imagens foram obtidas usando o microscópio de fluorescência motorizado Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE) equipado com escâner de lâminas automático VSlide (Metasystems, Altlußheim, DE) e analisadas no *software* MetaSystems Images.

5.19. Marcação com lectina WGA

Células B16F10 (5×10^3) foram plaqueadas em lâminas circulares em placas de cultura de 24 poços e tratadas. A seguir, as células foram lavadas 3 vezes com meio DMEM sem soro e incubadas com lectina WGA, conjugada com Alexa Fluor 488 ($5 \mu\text{g/ml}$) (Life) em PBS por 1 hora a 4°C . A seguir, as células foram lavadas 5 vezes com PBS, e fixadas com formaldeído 2% em PBS, por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas 2 vezes em PBS, 1 vez em PBS contendo glicina 0,1 M e 2 vezes em PBS. As lâminas foram montadas com meio de montagem Fluoromount G contendo DAPI (EMS, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). As imagens foram obtidas utilizando o microscópio de varredura a laser confocal, BioRad, modelo BioRadiance 2100 (Bio Rad, Hemel Hempstead, Inglaterra).

5.20. Quantificação em citometria de fluxo

5.20.1. Detecção de carboidratos por Lectina WGA

Células B16F10 foram plaqueadas (5×10^4) em garrafas médias e mantidas *overnight* em incubadora de CO_2 , e em seguida tratadas com os complexos ou veículo. A seguir, as células foram soltas com 2 mM de EDTA, contadas e aliqüotadas em tubos de citômetro (1×10^5 por tubo), lavadas duas vezes com PBS. Para a marcação com a lectina WGA conjugada com FITC as células foram incubadas com $5 \mu\text{g}$ em $50 \mu\text{l}$ por 1 hora no gelo. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas para análise imediata. Um total de 10.000 eventos foram adquiridos (em FL-1) por amostra em citômetro de fluxo FACSCalibur™ da BD (Becton Dickinson) e analisados pelo software CellQuest (BD Biosciences). A intensidade de fluorescência foi analisada.

5.20.2. Detecção de Integrina β -1

Células B16F10 foram plaqueadas (5×10^4) em garrafas médias e mantidas *overnight* em incubadora de CO_2 , e em seguida tratadas com os complexos ou veículo. A seguir, as células foram soltas com 2 mM de EDTA, contadas e aliqüotadas em tubos de citômetro (1×10^5 por tubo), lavadas duas vezes com PBS.

Para marcação com integrina β -1 as células foram incubadas com 0,01% de saponina em PBS por 10 minutos, e após, incubadas com anti-Integrina β -1 IgG (Millipore, Cat.# 04-1109) por 1 hora no gelo. Em seguida as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com 5 $\mu\text{g/ml}$ anti-IgG de coelho conjugado com FITC (Jackson ImmunoResearch, Cat.# 111-095-003) por 40 minutos no gelo, sendo posteriormente lavadas e ressuspendidas em PBS para análise em citometria de fluxo.

Um total de 10.000 eventos foram adquiridos (em FL-1) por amostra em citômetro de fluxo FACSCalibur™ da BD (Becton, Dickinson) e analisados através do software CellQuest (BD Biosciences). A intensidade de fluorescência foi analisada.

5.21. Extração e dosagem de ácido hialurônico

Para análise da produção de ácido hialurônico, foram plaqueadas 3×10^5 células em placas de 24 poços e após duas horas em cultura, tempo suficiente para que as células aderissem, foram submetidas ao tratamento com os compostos, conforme descrito acima. Ao final do tratamento, o meio foi coletado para análise da secreção de ácido hialurônico e as células foram lavadas duas vezes com PBS e mais uma vez, com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH=8, contendo 0,15 M de NaCl. A seguir, o extrato celular foi obtido, utilizando o mesmo tampão, contendo 3,5 M de uréia, como descrito a seguir. Inicialmente foram adicionados 125 μl do mesmo tampão contendo 7 M de uréia, sendo mantido por 10 minutos, a temperatura ambiente. Ao final da incubação, a placa foi raspada com o auxílio de um *scraper*, sendo a solução coletada e transferida para microtubos de 2 ml. Posteriormente, a placa foi raspada novamente com o mesmo volume de tampão, agora sem uréia.

Essa solução foi colocada no mesmo tubo, ficando portanto com a concentração final de 3,5 M de uréia.

A diálise do extrato celular foi realizada contra o tampão Tris-HCl 0,05 M, pH=8, contendo 0,15 M de NaCl, utilizando membrana de diálise com *cutoff* de 12-14 kDa. Após a diálise, o volume foi aferido e foi adicionado o mesmo volume de solução, contendo a protease Maxatase (6,0 mg/ml em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH=8, contendo 0,15 M de NaCl) e foi mantido *overnight* a 56°C. No dia seguinte, as amostras foram fervidas por 20 minutos e congeladas (após esfriar).

Para a dosagem do ácido hialurônico, foi utilizada metodologia descrita por (MARTINS *et al.*, 2003). Brevemente, alíquotas (1 µl diluído em 3000 µl de tampão Tris-HCl 50 mM, pH=7,75 contendo 1% de BSA) do meio ou do extrato celular foram aplicados em placa de multipoços previamente recoberta com proteína de ligação ao ácido hialurônico e a incubação foi mantida *overnight* a 4°C. A seguir, as placas foram lavadas 10 vezes com tampão Tris-HCl 50 mM, pH=7,75 contendo 1% de BSA. Posteriormente, as amostras foram incubadas com 100 µl/poço de proteína de ligação biotinizada (1,6 µg/ml em Tris-HCl 50 mM, pH=7,75 contendo 1% de BSA) por 2 horas, a temperatura ambiente, sob agitação branda.

Após o período de incubação, as placas foram novamente lavadas (10 vezes) e, então, incubadas com 100µl/poço de estreptavidina conjugada com Európio (1 µg/ml em Tris-HCl 50 mM, pH=7,75, contendo 1% de BSA) por 30 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação branda. Posteriormente, foi realizada nova etapa de lavagem, e as amostras foram incubadas com 200µl de Solução *Enhancement* (DELFLIA), por 5 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação branda. A leitura da placa foi realizada no leitor de microplacas Victor 2 (PerkinElmer-Wallac®). Uma curva de concentração conhecida de ácido hialurônico foi realizada, juntamente com cada leitura. Assim, os resultados obtidos foram expressos em concentração de ácido hialurônico.

Foram realizados dois experimentos distintos em triplicata do extrato celular e do meio de cultura.

5.22. Imunocitoquímica para marcação de Sindecam-1

Células B16F10 (5×10^3) foram plaqueadas em lâminas circulares em placas de cultura de 24 poços. Após o tratamento, o meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes em meio DMEM a 4°C. A seguir, foram incubadas com anticorpo primário anti-Sindecam-1 IgG (Santa Cruz Biotechnology Inc., #SC-7100) produzido em cabra, diluído em PBS contendo 1% de BSA por 1 hora a 4°C. Ao final da incubação, as células foram lavadas por duas vezes em meio DMEM sem soro, uma vez com meio DMEM contendo BSA 1% e novamente em PBS por mais 2 vezes. As células foram fixadas em formaldeído 2% diluído em PBS por 30 minutos, a temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas 2 vezes em PBS, 1 vez em PBS contendo glicina 0,1 M (para bloquear os radicais aldeídicos) e 2 vezes em PBS. Posteriormente, as células foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de cabra conjugado com Alexa Flúor 594 (Thermo Fischer Scientific, #A11058) (marcação em vermelho), diluídos (5 µg/ml) em PBS. Após 40 minutos de incubação, as células foram lavadas 5 vezes em PBS, e as lâminas foram montadas com meio de montagem Fluoromount G contendo DAPI (EMS). As imagens foram adquiridas e analisadas no microscópio de varredura a laser confocal Nikon, modelo A1 (Nikon Co, Tokyo, Japão).

5.23. Análise estatística

Os dados foram representados como as médias \pm erro padrão das médias. As diferenças entre as médias foram determinadas através da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni. As análises foram realizadas usando o Programa para Windows, *GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA). Um valor de “p” menor que 0,05 foi considerado significativo, onde $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***)).

6. RESULTADOS

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostraram que o tratamento com M1 (GUIMARÃES, 2009; ANDRADE, 2011) ou com M8 reduziram o potencial invasivo de células B16F10 (GUIMARÃES *et al.*, 2010). No entanto, ainda não estão claros os mecanismos de ação pelos quais esses complexos agem. Assim, de forma a complementar nossos dados anteriores, no presente trabalho foram investigadas possíveis alterações desencadeadas pelos complexos naturais, cruciais para a progressão tumoral. Para tanto, o trabalho foi dividido em duas partes, a primeira envolvendo o estudo sobre os efeitos dos complexos no fenótipo da célula B16F10, e segunda, enfocando a ação sobre os carboidratos e glicoconjugados chaves no processo tumoral, conforme descrito a seguir.

6.1. Parte 1 – Avaliação dos efeitos dos complexos no fenótipo da célula B16F10

6.1.1. M1 e M8 reduzem a expressão de mRNA e a atividade de metaloproteases

Metaloproteases são endopeptidases que possuem a função de degradação de proteínas presentes, principalmente, na matriz extracelular. Células tumorais normalmente superexpressam essas enzimas, que estão intimamente envolvidas na invasão tumoral. Como apresentado anteriormente, as células B16F10 expressam principalmente três tipos de metaloproteases, sendo MT1-MMP – transmembrânica-, MMP-2 e MMP-9 - secretadas (PASCO *et al.*, 2004). Dessa forma, com intuito de dar continuidade ao estudo relacionado aos efeitos dos complexos na invasão celular, foram investigadas possíveis alterações na expressão dessas proteínas, bem como em sua atividade. Os resultados mostraram que o tratamento das células com M1 ou com M8 reduziram a expressão do mRNA que codifica MT1-MMP (42% \pm 0,01 e 47% \pm 0,05, respectivamente) e MMP-9 (54% \pm 0,04 e 46% \pm 0,05, respectivamente) (Figura 17A e C). Porém, apenas o M1 foi capaz de reduzir a expressão de mRNA da MMP-2 em 40,2% (\pm 0,03) (Figura 17B). Interessantemente, quando foram avaliadas possíveis alterações na expressão das TIMPs, apenas o M8 foi capaz de

reduzir a expressão da TIMP-2 e TIMP-3 (38,2% \pm 0,01 e 40% \pm 0,02, respectivamente).

Por outro lado, quando foi analisada a atividade das metaloproteases secretadas, pela degradação da gelatina presente no gel, apenas a MMP-9 mostrou-se ativa (Figura 17G – bandas não coradas). Quando o resultado foi quantificado, observa-se redução de atividade nos grupos tratados com M1 ou com M8 (Figura 17H) em 21,13% (\pm 1,45) e 19,07% (\pm 0,88), respectivamente.

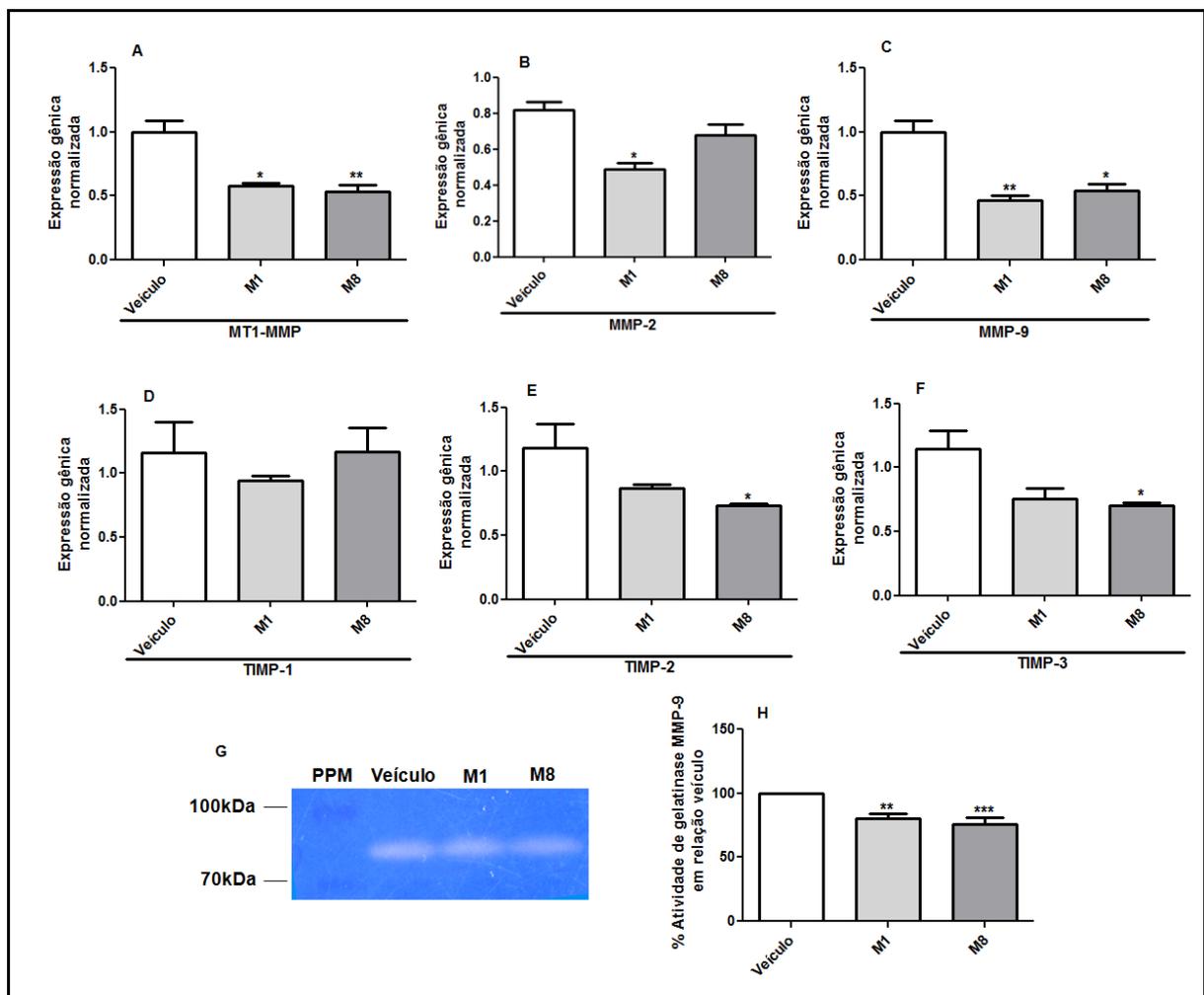


Figura 17. Expressão de mRNA de MMPs e TIMPs, e atividade gelatinase de MMPs. Células B16F10 foram pré tratadas com meio contendo 20% de complexos naturais altamente diluídos M1, M8 ou de veículo, por 96 horas, realizando reforço de 1% a cada 24 horas. Os gráficos acima representam a expressão de mRNA de genes que codificam para MT1-MMP (A), MMP-2 (B), MMP-9 (C), TIMP-1 (D), TIMP-2 (E) e TIMP-3 (F), analisados por qRT-PCR (n=3). A atividade gelatinase da MMP-9 (G) foi avaliada em zimografia (n=3). A quantificação da atividade, em relação ao veículo, está ilustrada no gráfico H. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão. A comparação estatística foi realizada utilizando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós teste de Bonferroni. Diferença comparada ao veículo: *para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ e ***para $p < 0,001$. PPM: Padrão de peso molecular.

6.1.2. M1 e M8 reduzem NF κ B

Dados da literatura têm demonstrado que a via de sinalização celular que leva a síntese e ativação da MMP-9 é dependente de NF κ B (KIM *et al.*, 2009; CHOI *et al.*, 2010). Assim, após o tratamento com os complexos, as células foram submetidas à imunomarcação para identificação desse fator de transcrição nuclear. As imagens de microscopia confocal (Figura 18) mostraram que as células tratadas, tanto com M1, quanto com M8 exibiram menor intensidade de marcação para NF κ B (Figura 18), o que sugere uma menor quantidade desta proteína. Esses dados sugerem que essa redução na intensidade de marcação pode ser indicativo de que há uma menor expressão deste fator de transcrição, o que poderia ser o responsável pela redução da expressão de MMP-9, observada na Figura 17. No entanto, faz necessário o uso de um método quantitativo, como a citometria de fluxo, para confirmar esse resultado.

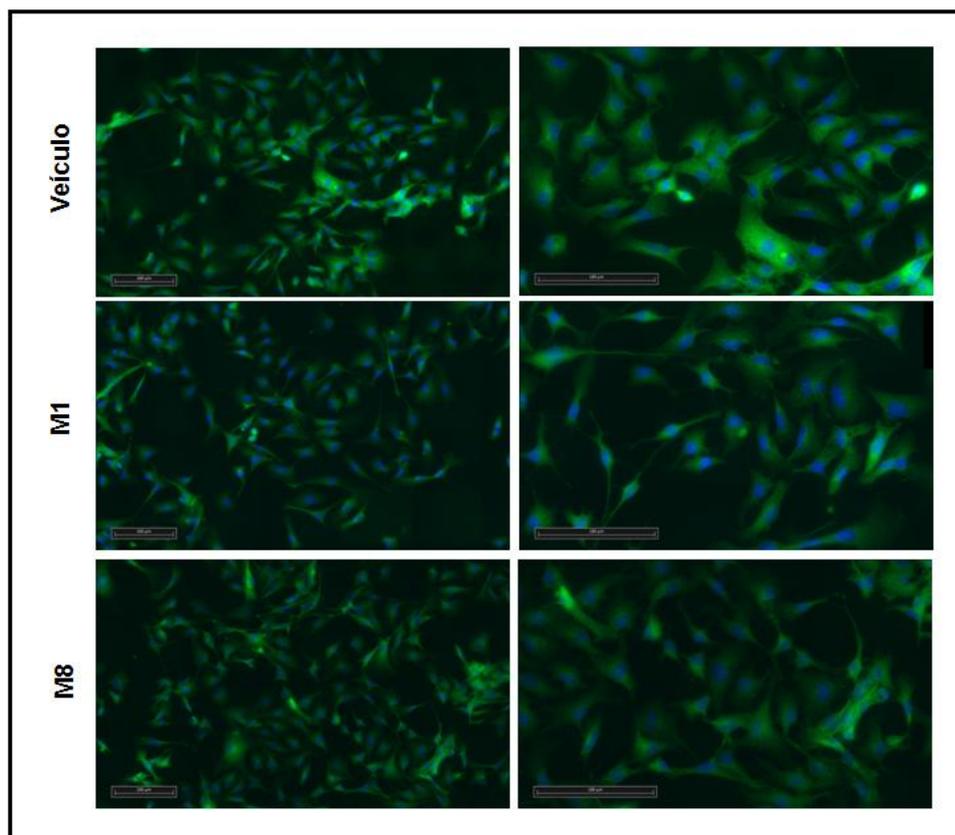


Figura 18. Imunocitoquímica para detecção de NF κ B. Células B16F10 foram pré tratadas com meio contendo 20% de complexos naturais altamente diluídos M1, M8 ou de veículo, por 96 horas, realizando reforço de 1% a cada 24 horas. As imagens representam células que foram marcadas com anti-NF κ B conjugado com FITC (em verde), e núcleos corados em azul com DAPI. Barra = 100 μ m. Note há uma diminuição da intensidade de marcação nos grupos tratados com M1 e com M8, quando comparados com o grupo veículo.

6.1.3. M1 e M8 reduzem a capacidade migratória das células

Uma das características mais importantes de células tumorais malignas é a migração celular, a qual contribui para o seu potencial invasivo (PASCO *et al.*, 2004). Assim, o próximo passo foi avaliar se o tratamento com os complexos poderia interferir na capacidade migratória das células de melanoma. Utilizando o método *scratch*, fica visível que tanto o M1, quanto o M8 foram capazes de reduzir a migração das células tumorais (Figura 19A). A quantificação desse resultado revelou que o tratamento com M1 reduziu a migração em 27,2% ($\pm 0,95$) e com o M8 em 11,93% ($\pm 1,09$) (Figura 19B).

Para descartar a possibilidade de interferência de alterações na proliferação celular, induzida pelo tratamento com os complexos, foi realizado um ensaio colorimétrico que responde a alteração na quantidade de células. Os resultados mostraram que M1 e M8 não alteram a densidade celular (Figura 19C). Entretanto, em células tratadas com mitomicina C (um controle positivo, por inibir a síntese de DNA e, conseqüentemente, a divisão celular), foi observada uma redução de densidade celular de 50,03% (Figura 19C), mostrando que a redução da migração observada pelo tratamento com M1, ou com M8, não são decorrentes de inibição de proliferação celular.

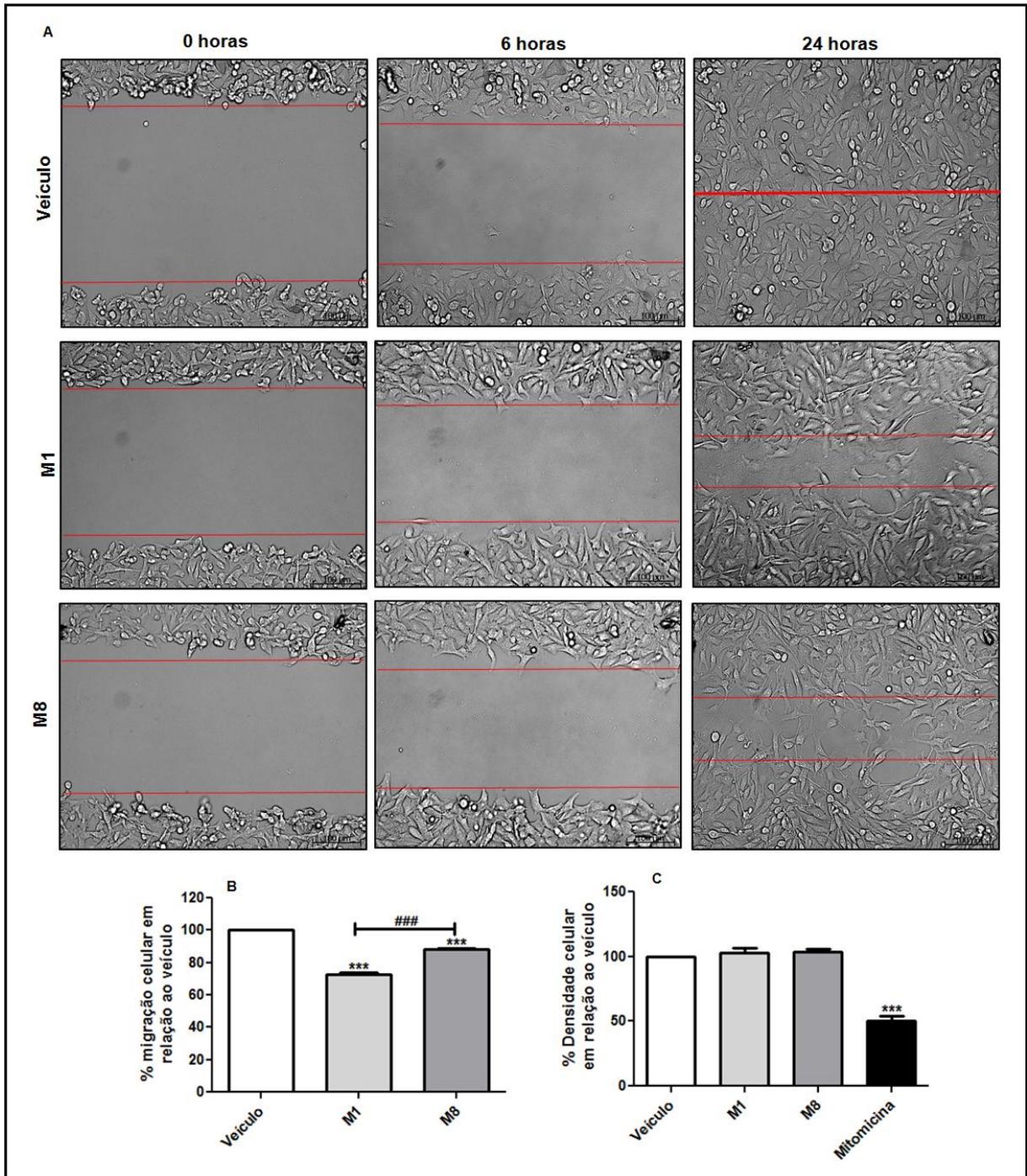


Figura 19. Migração celular avaliada pelo método *Scratch*. Células B16F10 foram tratadas com meio contendo 20% de complexos naturais altamente diluídos M1, M8 ou de veículo, por 96 horas (realizando reforço de 1% a cada 24 horas), ou mitomicina 0,4 $\mu\text{g/ml}$. As imagens acima representam migração celular após *Scratch*, fotografadas nos tempos 0, 6 e 24 horas (A), e o gráfico representa a quantificação da migração no tempo de 24 horas (B) ($n=3$). O gráfico C representa a porcentagem de avaliação da densidade celular por ensaio colorimétrico ($n=8$). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão. A comparação estatística foi realizada usando análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós teste de Bonferroni. Diferença comparada ao veículo: ***para $p<0,001$. Diferença comparada entre os grupos: ### para $p<0,001$. Três experimentos independentes foram realizados. Barra = 100 μm .

Para descartar qualquer dúvida com relação a um resultado falso positivo do ensaio de *Scratch*, foi realizado outro método de migração, utilizando o *transwell*. Resultados muito similares foram obtidos, como pode ser observado na Figura 20A, onde o M1 e o M8 reduziram a migração em 24,2% ($\pm 2,7$) e 12,9% ($\pm 1,7$), respectivamente (Figura 20B).

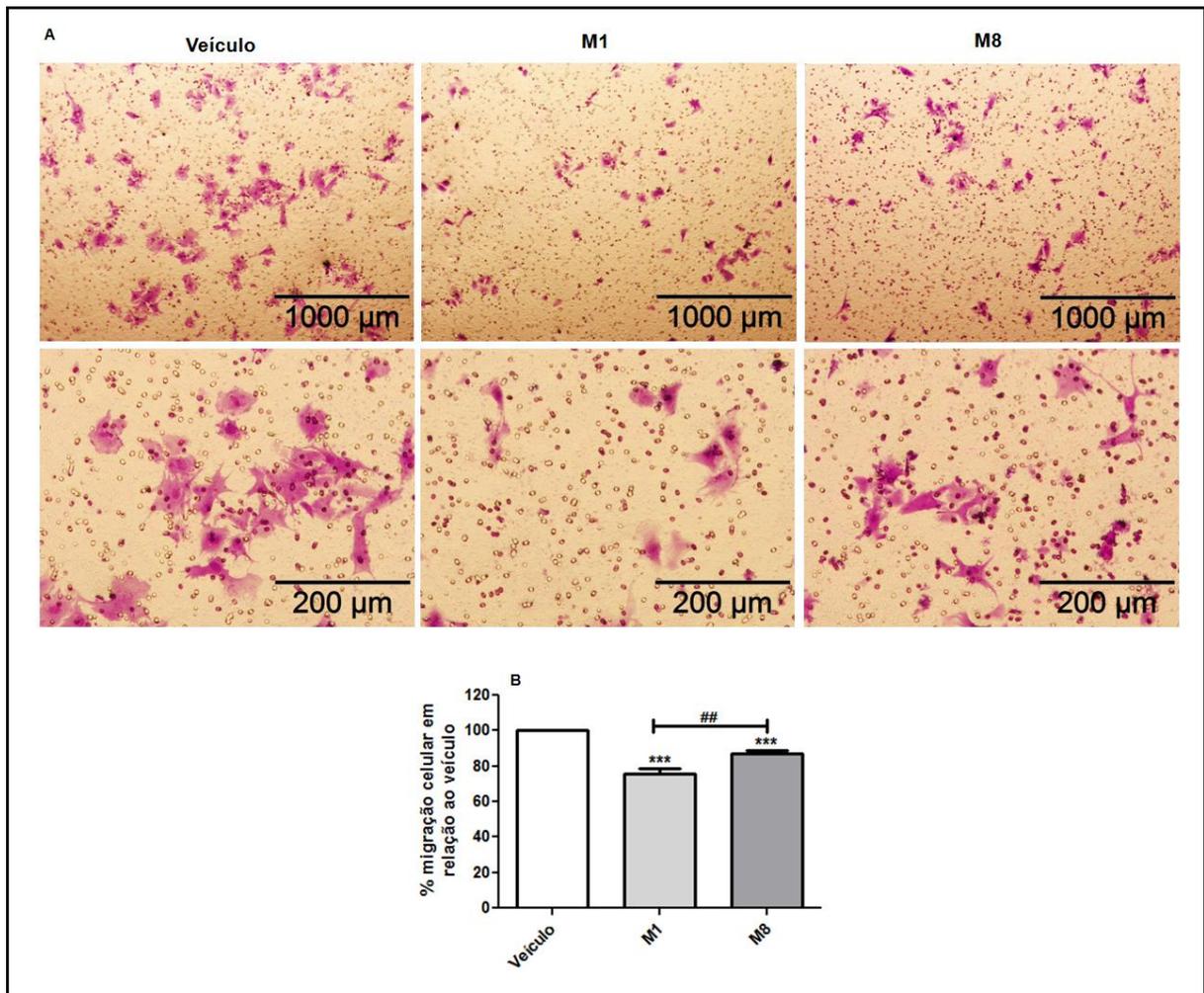


Figura 20. Migração celular pelo método do transwell. Células B16F10 foram tratadas com meio contendo 20% de complexos naturais altamente diluídos M1, M8 ou de veículo, por 96 horas, realizando reforço de 1% a cada 24 horas. A figura apresenta imagens representativas da migração celular nos diferentes grupos (A) ($n=4$), e a porcentagem de migração celular avaliada por colorimetria (B) ($n=4$). Os resultados são expressos como média \pm o erro padrão das médias. A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós teste de Bonferroni. Diferença comparada ao veículo: ***para $p<0,001$. Diferença entre os grupos: ## para $p<0,01$. Três experimentos independentes foram realizados. Barra = 200 μm .

6.1.4. A concentração de ROS, NO e de nitrito foi alterada pelo M1 e M8

Trabalhos publicados recentemente têm relacionado os efeitos de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio no processo de migração celular (LUANPITPONG *et al.*, 2010; CHUNG *et al.*, 2012). Como M1 e M8 diminuíram a capacidade migratória das células B16F10, o próximo passo foi investigar se esse evento poderia estar relacionado com alterações na concentração intracelular de ROS e NO, e extracelular de nitrito, após o tratamento com os complexos. Foi detectado que, ambos, M1 e M8, aumentaram ROS intracelular ($98,4\% \pm 14,0$ e $72,3\% \pm 17,9$, respectivamente) e reduziram o NO intracelular ($12,3\% \pm 2,4$ e $16,1\% \pm 0,8$, respectivamente) (Figura 21A e B, respectivamente). No entanto, o tratamento com M1 ou com M8 foi capaz de aumentar o nitrito extracelular ($18,6\% \pm 1,7$ e $22,5\% \pm 1,9$, respectivamente) (Figura 21C), indicando que o NO é produzido e difundido através da membrana plasmática.

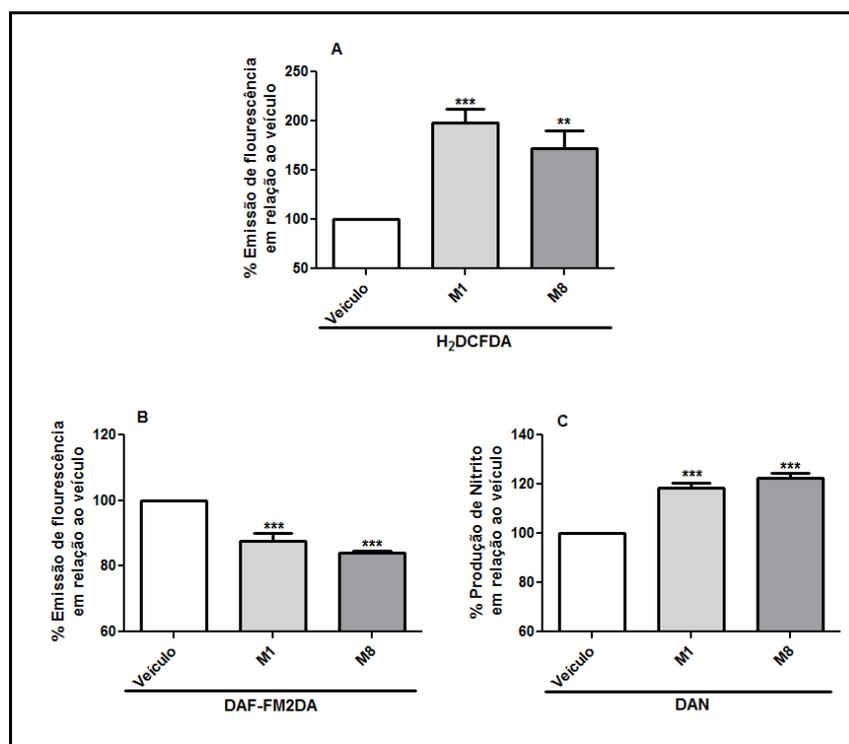


Figura 21. Análise da concentração intracelular de ROS e de NO e extracelular de nitrito. Células B16F10 foram pré tratadas com meio contendo 20% de complexos naturais altamente diluídos M1, M8 ou de veículo, por 96 horas, realizando reforço de 1% a cada 24 horas. A figura acima representa a concentração de ROS (A), de NO (B), e de nitrito extracelular (C), calculada pela emissão de fluorescência produzida pela sonda H₂DCFDA, ou pela sonda DAF-FM2DA ou, ainda pelo DAN, respectivamente. Os resultados são expressos como média \pm o erro padrão das médias ($n=8$). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós teste de Bonferroni. Diferença comparada ao veículo: ** para $p<0,01$ e *** para $p<0,001$. Três experimentos independentes foram realizados.

6.1.5. M1 e M8 não alteram a viabilidade celular

Sabe-se que o aumento de ROS e a rápida liberação local de NO, quando presente em concentrações elevadas, podem provocar a apoptose (WANG *et al.*, 2000; TOCHHAWNG *et al.*, 2013). Como houve alterações nos níveis de espécies reativas, foi então verificado se os complexos M1 e M8 estariam alterando funções mitocondriais normais, que poderiam levar a célula à apoptose. Inicialmente foram investigadas possíveis alterações no metabolismo mitocondrial, utilizando o método de MTT, com o qual foi possível verificar que o tratamento com M1 ou com M8 não foi capaz de alterar o metabolismo mitocondrial (Figura 22A). Como controle positivo, as células foram tratadas com detergente (saponina), que reduziu a atividade metabólica mitocondrial em 52,6% ($\pm 0,41$) (Figura 22A). Outro parâmetro de análise utilizado foi a investigação da integridade da membrana mitocondrial, realizada pela incorporação do marcador rodamina 123. Os resultados mostram que o tratamento com os complexos não altera a permeabilidade da membrana mitocondrial (Figura 22B).

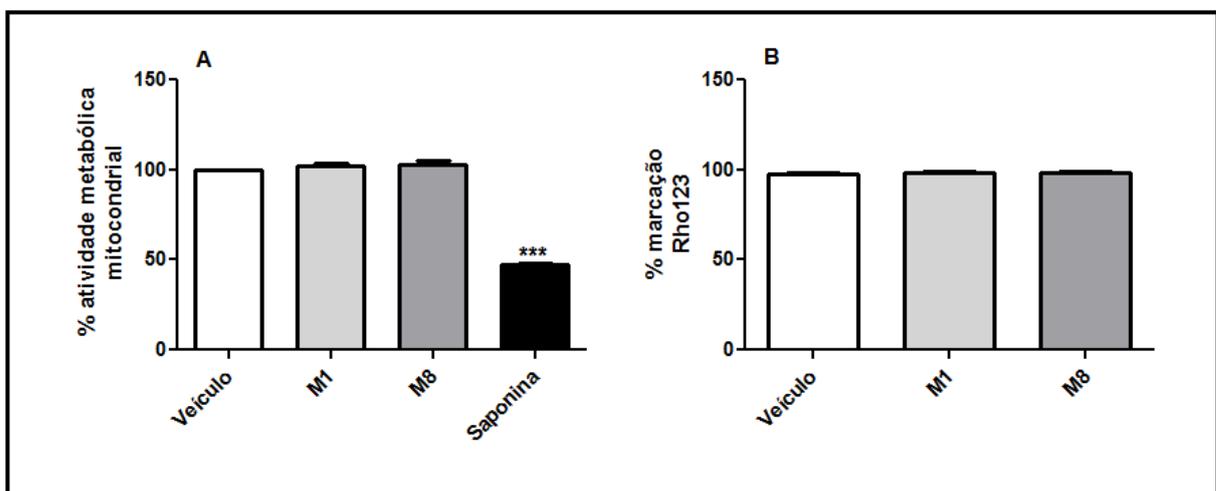


Figura 22. Avaliação da atividade e permeabilidade de membrana mitocondrial. Células B16F10 foram pré tratadas com meio contendo 20% de complexos naturais altamente diluídos M1, M8 ou de veículo, por 96 horas, realizando reforço de 1% a cada 24 horas. Os gráficos representam o efeito dos complexos no metabolismo mitocondrial pelo método colorimétrico MTT (A) (n=8), e a permeabilidade da membrana mitocondrial após incubação com Rodamina 123 (Rho 123) (B) (n=3). Os resultados são expressos como média \pm o erro padrão. A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós teste de Bonferroni. Diferença comparada ao veículo: ***para $p < 0,001$. Três experimentos independentes foram realizados.

Para confirmar se o tratamento com M1 ou com M8 realmente não induzia a morte celular, foi realizada a marcação com anexina-V e 7-AAD. Como esperado, M1 ou M8 não induziram a morte das células nesse tempo de tratamento. Como controle positivo de morte celular foi utilizado a camptotecina, cuja ação sobre as células induziu a morte celular reduzindo a viabilidade em 8,7% ($\pm 0,5$), quando analisada a apoptose inicial (Figura 23A e B) e em 15,6% ($\pm 1,7$) quando analisada a apoptose tardia (Figura 23A e C), confirmando que o sistema estava funcional e, portanto M1 e M8 não causam morte celular.

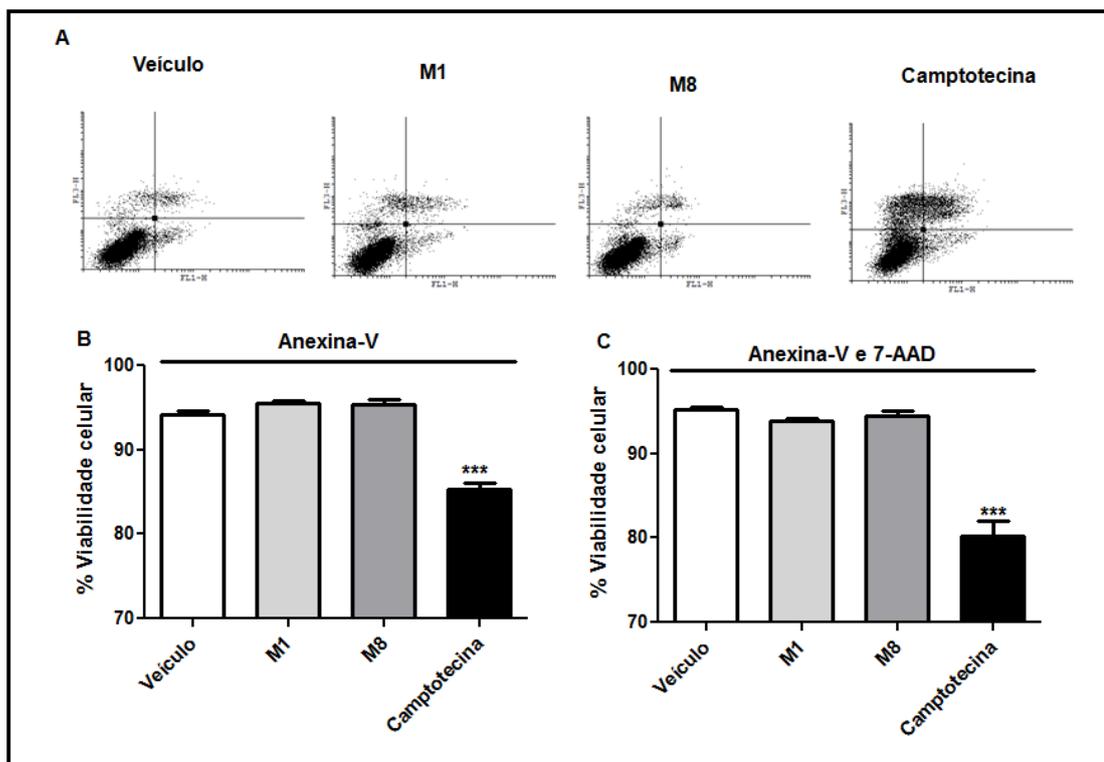


Figura 23. Avaliação da viabilidade celular com anexina-V/7-AAD. Células B16F10 foram pré tratadas com meio contendo 20% de complexos naturais altamente diluídos M1, M8 ou de veículo, por 96 horas, realizando reforço de 1% a cada 24 horas, ou com camptotecina $5\mu\text{M}$ por 5 horas. Os *dot plots* representam apoptose inicial (abaixo e a direita) e apoptose tardia (acima a direita) (A), e os gráficos representam apoptose inicial (marcado com anexina-V) e apoptose tardia (dupla marcação anexina-V/7AAD) (B e C, respectivamente). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão ($n=3$). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós teste de Bonferroni. Diferença comparada ao veículo: ***para $p<0,001$. Três experimentos independentes foram realizados.

6.1.6. M1 e M8 levam à diminuição de melanina e da atividade da tirosinase

Fisiologicamente a melanina (pigmento produzido pelos melanócitos) tem a função de sequestrar radicais livres produzidos durante a exposição à radiação ultravioleta, agindo como antioxidante. Assim, possui a função de proteção das células contra possíveis danos gerados, devido ao excesso desses radicais (PINON *et al.*, 2011). Além disso, em um trabalho publicado por Chung e colaboradores (2012), foi demonstrado que um dos receptores envolvidos na síntese de melanina (MCR1), quando ativado, está envolvido em mecanismos que levam à migração celular. Considerando que os complexos M1 e M8 diminuíram o potencial migratório e alteraram as espécies reativas em B16F10, o próximo passo foi a investigação de possíveis atividades anti melanogênicas desses complexos. Os resultados mostraram redução discreta do conteúdo de melanina, tanto pelo tratamento com M1, quanto com M8 de 7,2% ($\pm 0,1$) e 3,56% ($\pm 0,08$) respectivamente (Figura 24A). Quando foi avaliada a tirosinase – enzima chave na síntese de melanina – foi observado redução de atividade em 22,7% ($\pm 3,4$) e 24,6% ($\pm 1,7$), respectivamente (Figura 24B), e de expressão gênica em 30,6% ($\pm 0,06$) e 33,3 ($\pm 0,02$) (Figura 24C). Foi observado que apenas o M8 reduziu a expressão gênica da TYRP-1 em 38,1% ($\pm 0,03$) (Figura 24D). No entanto, tanto o M1, quanto o M8, reduziram a expressão gênica da TYRP-2 em 32,1% ($\pm 0,05$) e 36,7% ($\pm 0,03$) (Figura 24E) e do MITF em 48,7% ($\pm 0,003$) e 26,5% ($\pm 0,04$) (Figura 24F), respectivamente.

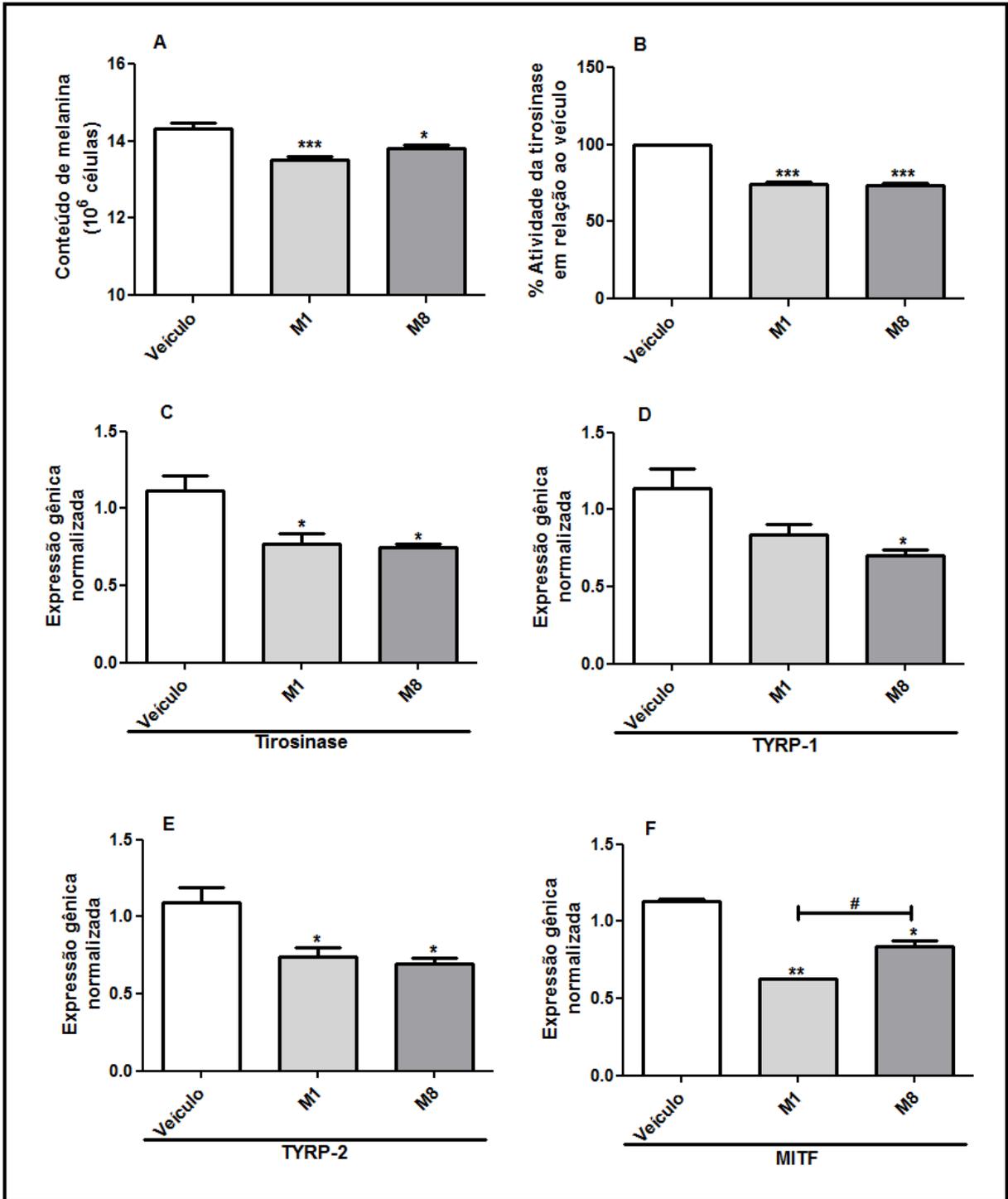


Figura 24. Avaliação do conteúdo de melanina, atividade da tirosinase *in situ* e expressão de mRNA de proteínas melanogênicas. Células B16F10 foram pré tratadas com meio contendo 20% de complexos naturais altamente diluídos M1, M8 ou de veículo, por 96 horas, realizando reforço de 1% a cada 24 horas. Os gráficos acima representam o conteúdo de melanina (A) encontrado em 10^6 células ($n=5$), a porcentagem de atividade da enzima tirosinase (B) ($n=8$), a expressão de mRNA da tirosinase (C), TYRP-1 (D), TYRP-2 (E) e MITF (F) ($n=3$). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão das médias. A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós teste de Bonferroni. Diferença comparada ao veículo: *para $p<0,05$, **para $p<0,01$, ***para $p<0,001$. Diferença entre os grupos: # para $p<0,05$. Três experimentos independentes foram realizados.

6.1.7. M1 altera o mecanismo de resistência à drogas

Um dos fatores do melanoma ser considerado tão agressivo está na sua capacidade de ser refratário ao tratamento convencional (quimioterapia). Isso é resultante de sua resistência a grupos de drogas com características estruturais e funcionais semelhantes (FUKUNAGA-KALABIS; HERLYN, 2013), que é decorrente do efluxo dessas drogas, mais conhecido como mecanismo de resistência a multidrogas (MDR). Esse processo é desempenhado por proteínas transportadoras específicas, presentes na membrana plasmática e é comumente observado em muitas células normais, funcionando como um mecanismo de proteção celular, por exemplo, em células neuronais, que age contra drogas que poderiam passar pela barreira hematoencefálica (FUKUNAGA-KALABIS; HERLYN, 2013). No entanto, MDR está superexpresso em alguns tipos de células tumorais, permitindo resistência a muitos quimioterápicos. Evidências sugerem que a expressão de genes que codificam proteínas de membrana da família dos transportadores ABC, incluindo a proteína 1 associada a resistência multidrogas (MRP-1 ou ABCC1) e a proteína multidrogas resistentes 1 (MDR1/P-gp ou ABCB1), podem estar associadas com a quimioresistência do melanoma (WALSH *et al.*, 2010). Além disso, Chen e colaboradores sugerem que os melanossomos (vesículas produtoras de melanina) estão envolvidos no mecanismo que leva ao efluxo de drogas (CHEN *et al.*, 2009). Assim, para determinar se o tratamento com os complexos poderia alterar a atividade dessas proteínas envolvidas no MDR foi utilizado o método de exclusão de rodamina b, que baseia-se no transporte deste marcador fluorescente, através dos transportadores ABC (ou proteínas MDR). Os resultados mostram que o tratamento com M1 foi capaz de reduzir a atividade MDR, causando maior acúmulo de rodamina b dentro da célula, em 23,7% ($\pm 6,0$) (Figura 25), indicando que M1 reduz a resistência à drogas. Já o M8 não foi capaz de alterar a atividade das proteínas MDR, o que sugere que sua ação antitumoral segue por outro mecanismo.

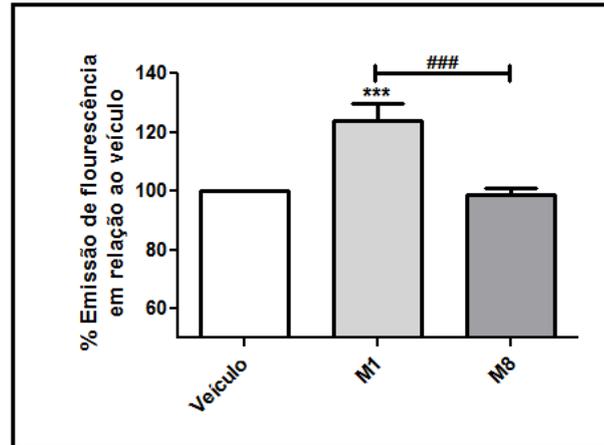


Figura 25. Avaliação do mecanismo de resistência a multidrogas. Células B16F10 foram pré tratadas com meio contendo 20% de complexos naturais altamente diluídos M1, M8 ou de veículo, por 96 horas, realizando reforço de 1% a cada 24 horas. A figura representa a porcentagem de fluorescência, em relação ao controle, que havia no interior das células, onde o aumento de fluorescência indica falha no sistema de exclusão de drogas, sugerindo redução na capacidade de transporte através da membrana e, conseqüentemente da resistência à drogas. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão ($n=8$). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós teste de Bonferroni. Diferença comparada ao veículo: ***para $p<0,001$. Diferença entre os grupos: ### para $p<0,001$. Três experimentos independentes foram realizados.

6.2. Parte 2 - Avaliação dos efeitos dos complexos em carboidratos e glicoconjugados

Como discutido anteriormente, as células tumorais exibem muitas alterações quando comparadas com as normais. Um exemplo interessante é mostrado pelo padrão de glicosilação, que é observado na superfície celular ou na matriz extracelular. Estudos correntes têm mostrado que glicosilações na superfície das células tumorais medeiam elementos chaves em processos patofisiológicos durante as várias etapas da progressão tumoral (LI; SONG; QIN, 2010), principalmente na migração celular e invasão.

Assim, nessa parte do trabalho, o primeiro passo foi avaliar se o tratamento poderia levar a alterações da expressão de carboidratos, avaliado pelo uso de coloração específica ou de lectinas, proteínas conhecidas por ligar carboidratos específicos.

6.2.1. Detecção de carboidratos totais

6.2.1.1. Coloração com PAS

A reação ácido periódico-reagente de Schiff ou coloração PAS, é um método utilizado primariamente para identificar glicogênio em tecidos. A reação do ácido periódico seletivamente oxida os resíduos de glicose (1-2 glicol), produzindo aldeídos que reagem com o reagente de Schiff e produz uma cor púrpura-magenta. Esse tipo de coloração pode ser usado para detectar estruturas com altas concentrações de carboidratos como: glicogênio (que não é o nosso caso), mas também carboidratos presentes em glicoconjugados, como glicoproteínas e proteoglicanos (MCMANUS; CASON, 1950). Assim, foi investigado se o tratamento com os complexos M1 ou M8 alteravam, de forma geral, o conteúdo de carboidratos na célula B16F10.

Os resultados mostram que M1, e de forma mais evidente, o M8 reduz a coloração, o que sugere uma menor quantidade de carboidratos, conforme pode ser

visualizado na Figura 26, embora outras técnicas devem ser realizadas para confirmar esse dado.

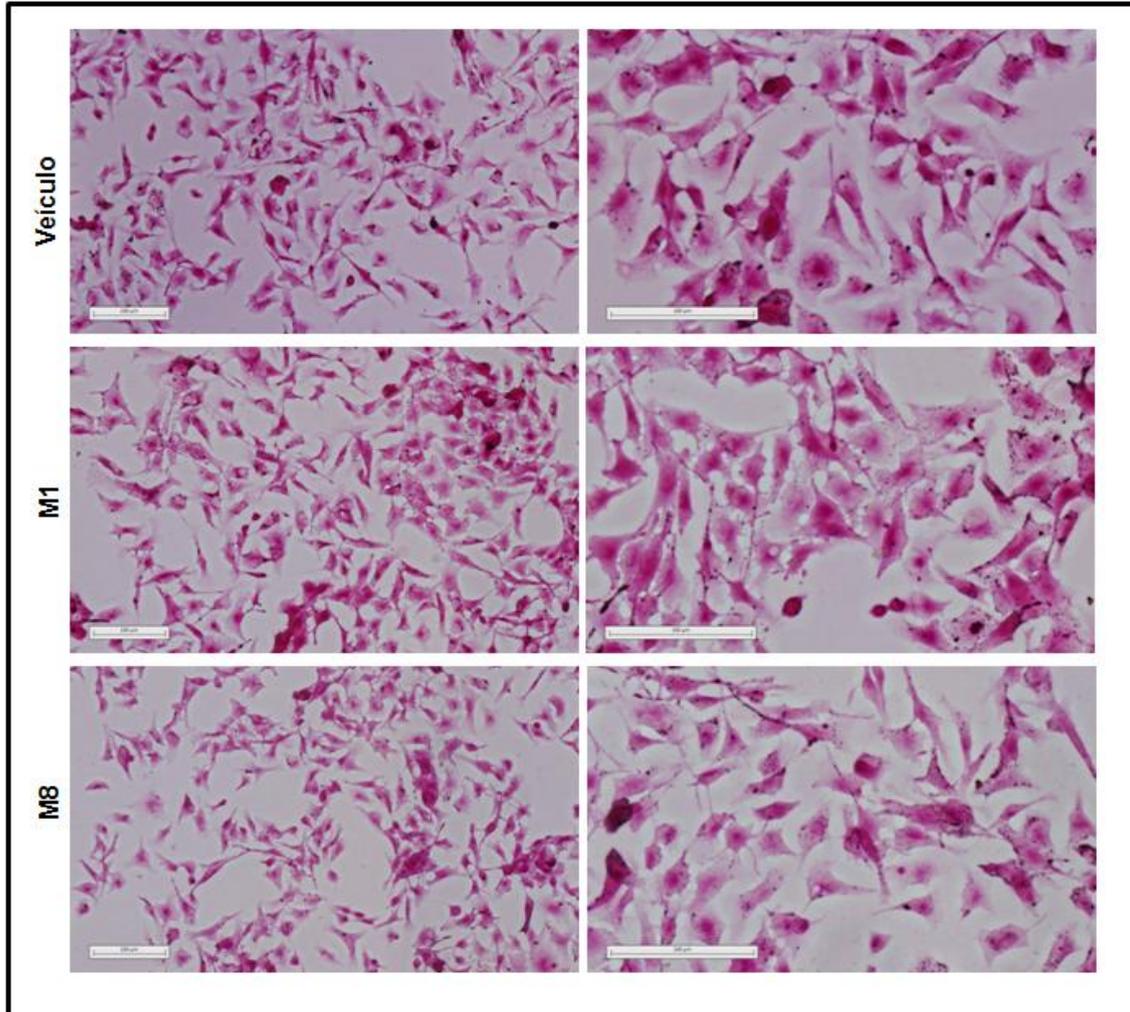


Figura 26. Detecção de carboidratos pela coloração com PAS. Células B16F10 foram tratadas com meio contendo 20% de complexos naturais altamente diluídos M1, M8 ou de veículo, por 96 horas, realizando reforço de 1% a cada 24 horas. A Figura acima mostra fotografias obtidas das células coradas com PAS, método de coloração para carboidratos. Imagens obtidas no *scanner* de lâminas histológicas, VSlide. Barras – 100 μm .

6.2.1.2. Detecção de carboidratos por lectina WGA

De forma complementar, foi utilizado a lectina WGA, utilizada também como ferramenta para detecção de carboidratos, que liga seletivamente resíduos de *N*-acetilglucosamina e ácido *N*-neuroamínico (ácido siálico) (WRIGHT, 1984). Em microscopia de fluorescência confocal foi evidenciada a marcação positiva e sugere menor quantidade de carboidratos que ligam lectina WGA (Figura 27A) nos grupos tratados com M1 ou com M8. No entanto, o método para quantificação mais adequada é a citometria de fluxo. Utilizando essa ferramenta foi possível mostrar que somente as células tratadas com o complexo M1 apresentaram menor quantidade de carboidratos que ligam a lectina WGA (redução de $10,24\% \pm 0,8$) (Figura 27B e C).

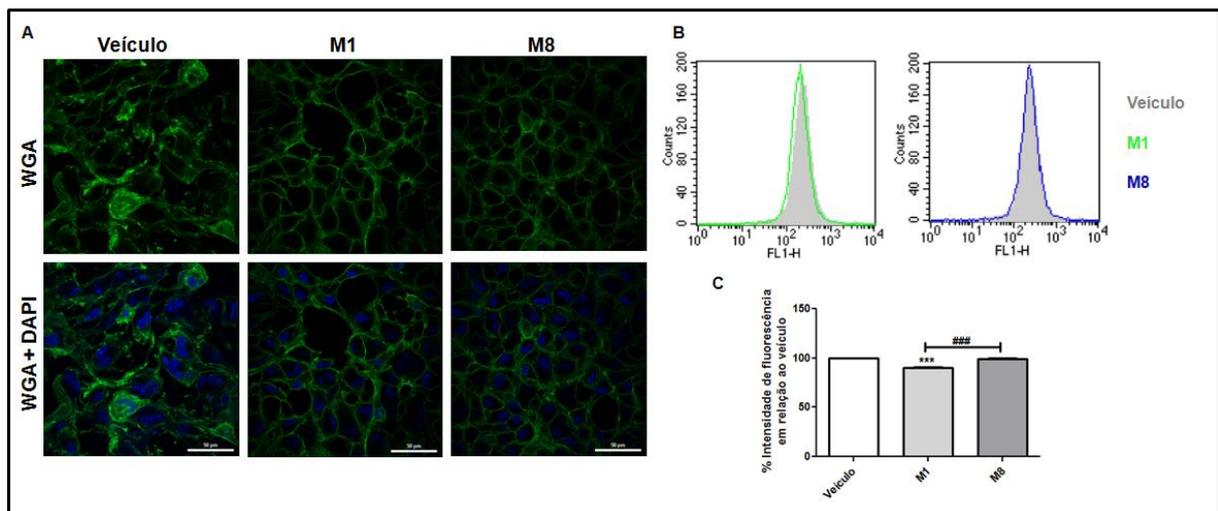


Figura 27. Quantificação de carboidratos utilizando lectina WGA. Células B16F10 foram tratadas com meio contendo 20% de complexos naturais altamente diluídos M1, M8 ou de veículo, por 96 horas, realizando reforço de 1% a cada 24 horas. Dados comparativos da quantidade de carboidratos positivo para Lectina WGA, a qual estava conjugada com Alexa Fluor 488 (verde) cuja marcação foi avaliada em microscopia de fluorescência confocal, bem como em citometria de fluxo. Marcação com Lectina WGA conjugada com Alexa Fluor 488 e núcleo corado em azul com DAPI, visualizados em microscopia confocal (A). Os histogramas mostram o deslocamento da curva de intensidade de fluorescência em relação ao veículo (grupo veículo é representado pelo pico cinza preenchido, M1 representado pela linha verde e M8 representado pela linha azul (B); e abaixo é mostrado sua quantificação (C) (n=5). No gráfico os resultados são expressos como média \pm erro padrão. A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós teste de Bonferroni. Diferença comparada ao veículo: ***para $p < 0,001$. Diferença entre os grupos: ### para $p < 0,001$. Barra = 50 μm .

6.2.2. Avaliação de glicoproteínas

Como o tratamento levou a alterações em carboidratos, esses resultados nos motivaram a investigar se essas mudanças seriam acompanhadas também em glicoproteínas importantes. Considerando a gama de moléculas presentes na membrana plasmática, que atuam em mecanismos de adesão celular, resolvemos focar em integrinas, dada sua importância nos mecanismos de contato célula-célula e célula-matriz extracelular, bem como seu envolvimento em vias de sinalização celular. Ainda, considerando que essa família de moléculas são expressas em heterodímeros, sempre uma cadeia β liga-se a uma α e, a subunidade $\beta 1$ é encontrada em muitos tipos de integrinas expressas nas células que são alterados em processos tumorais, razão pela qual resolveu-se investigar se o tratamento com os complexos naturais poderiam levar a alteração nessa molécula.

Os resultados mostram claramente que o tratamento, tanto com M1, quanto com M8, leva a diminuição da expressão da subunidade $\beta 1$ da integrina em 14,3% ($\pm 2,0$) e 7,9% ($\pm 2,3$), como observado na Figura 28.

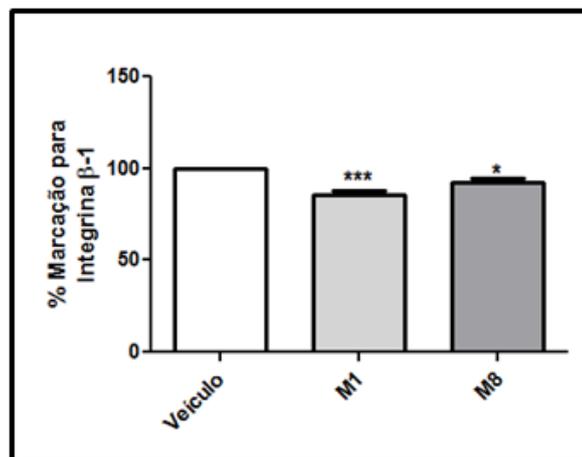


Figura 28. Quantificação da subunidade $\beta 1$ da integrina. Células B16F10 foram pré tratadas com meio contendo 20% de complexos naturais altamente diluídos M1, M8 ou de veículo, por 96 horas, realizando reforço de 1% a cada 24 horas. O gráfico acima representa a porcentagem de marcação por citometria de fluxo após incubação com anti-Integrina $\beta 1$. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão das médias ($n=4$). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós teste de Bonferroni. Diferença comparada ao veículo: *para $p < 0,05$ e **para $p < 0,01$. Os dados representam três experimentos independentes realizados em duplicata.

6.2.3. Quantificação de ácido hialurônico

Voltando para os carboidratos, tendo observado alteração da composição desses importantes componentes celulares, o próximo passo foi analisar se o tratamento poderia levar a alterações na produção e secreção de AH, um polissacarídeo rico em *N*-acetilglucosamina (um dos açúcares detectado pela Lectina WGA) e membro da família dos GAGs, moléculas chaves na biologia e progressão do tumor.

A análise do extrato celular não mostrou quantidade suficiente detectável pelo método utilizado (dados não mostrados). Entretanto, quando foi analisada a quantidade de AH, que é produzido e secretada para o meio de cultura, foi observado que M1 e M8 foram capazes de reduzi-lo em 43,7 e 25,7%, respectivamente, como pode ser observado na Figura 29.

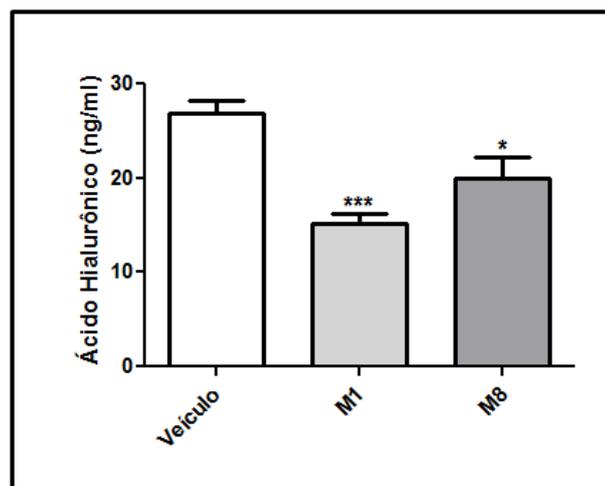


Figura 29. Quantificação de ácido hialurônico. Células B16F10 foram pré tratadas com meio contendo 20% de complexos naturais altamente diluídos M1, M8 ou de veículo, por 96 horas, realizando reforço de 1% a cada 24 horas. Os gráficos acima representam a quantidade de ácido hialurônico no meio de cultura após o tempo de tratamento. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão das médias (n=6-8). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós teste de Bonferroni. Diferença comparada ao veículo: *para $p < 0,05$ e ***para $p < 0,001$.

6.2.3.1. Alterações na expressão gênica de hialuronidases-1 e -2

Como houve redução da produção e secreção de AH, esse resultado nos levou a investigar se o tratamento poderia promover também alterações em hialuronidases, enzimas capazes de clivar o AH em pequenos fragmentos. A grande importância desses fragmentos está no fato de que, uma vez livres, podem ligar e ativar receptores desencadeando sinalização intracelular, levando à progressão tumoral.

Os resultados mostram que o tratamento com o complexo M1 ou com M8 altera a expressão gênica dessas enzimas, reduzindo tanto a hialuronidase-1 ($43,6\% \pm 0,07$ e $50,4\% \pm 0,07$, respectivamente) (Figura 30 A) quanto a hialuronidase-2 ($40,2\% \pm 0,04$ e $48,2\% \pm 0,07$, respectivamente) (Figura 30 B).

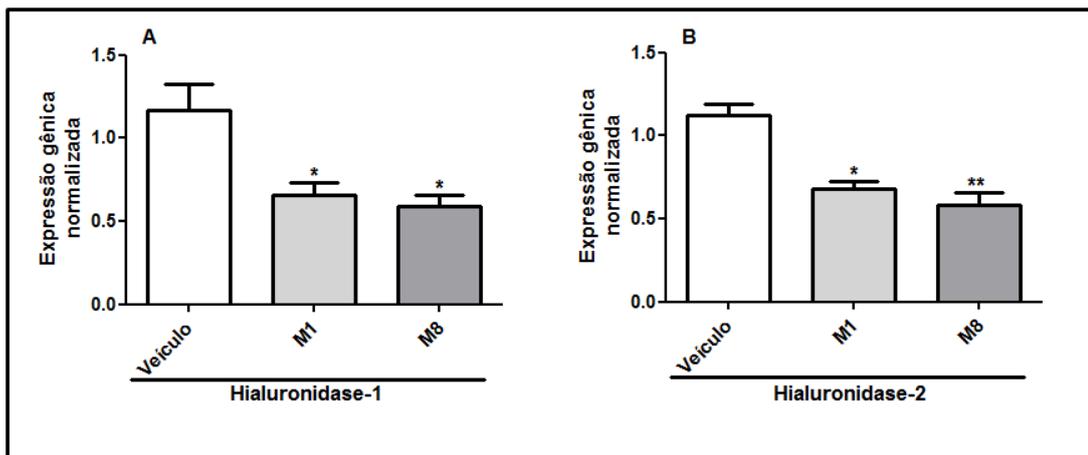


Figura 30. Avaliação da expressão de mRNA de enzimas que degradam ácido hialurônico. Células B16F10 foram pré tratadas com meio contendo 20% de complexos naturais altamente diluídos M1, M8 ou de veículo, por 96 horas, realizando reforço de 1% a cada 24 horas. Os gráficos acima representam a expressão de mRNA da hialuronidase-1 (A) e hialuronidase-2 (B). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão das médias ($n=3$). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós teste de Bonferroni. Diferença comparada ao veículo: *para $p<0,05$ e **para $p<0,01$. Os dados representam três experimentos independentes realizados em duplicata.

6.2.4. Alterações em proteoglicanos

Como foi verificada uma série de alterações em carboidratos e, dentre eles em ácido hialurônico, carboidrato da família dos glicosaminoglicanos, nos levou a investigar se os glicoconjugados que carregam GAG em sua estrutura (os proteoglicanos) pudessem estar alterados pelo tratamento com os complexos. Vale lembrar que proteoglicanos de heparam sulfato e de condroitim sulfato são alvos de alteração no processo tumoral.

6.2.4.1. Proteoglicano de condroitim sulfato 4

Conforme discutido anteriormente, o PGCS é superexpresso no melanoma, sendo um importante sinal de tumorigênese (BRUYN *et al.*, 2010). Assim, nosso próximo passo foi investigar se os complexos também alteravam a expressão do PGCS.

Os resultados mostraram que apenas o tratamento com o complexo M8 reduziu a expressão gênica que codifica o PGCS-4 em 40,2% ($\pm 0,06$) (Figura 31).

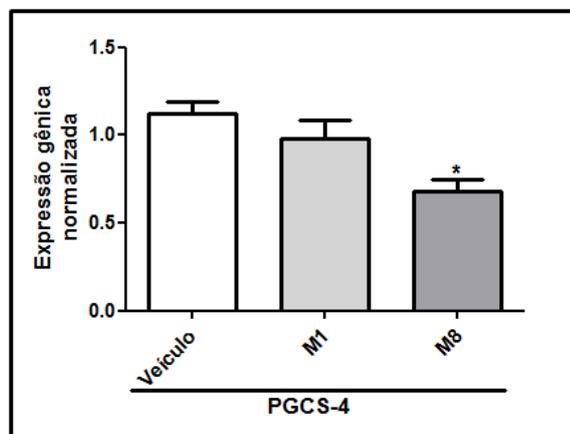


Figura 31. Expressão gênica do proteoglicano de condroitim sulfato 4 (PGCS-4). Células B16F10 foram tratadas com meio contendo 20% de complexos naturais altamente diluídos M1, M8 ou de veículo, por 96 horas, realizando reforço de 1% a cada 24 horas. O gráfico representa a expressão de mRNA que codifica para PGCS-4. O resultado é expresso como média \pm erro padrão ($n=3$). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós teste de Bonferroni. Diferença comparada ao veículo: *para $p < 0,05$. Os dados representam três experimentos independentes realizados em duplicata.

6.2.4.2. Proteoglicanos de heparam sulfato

Além do PGCS, o melanoma também expressa outra classe de proteoglicanos, os de heparan sulfato, os quais também são alterados e importantes para o perfil metastático. Assim, foi verificado se o tratamento com os complexos poderiam levar a alterações nestas moléculas.

6.2.4.2.1. Sindecam-1

Normalmente a expressão do sindecam-1 na superfície celular é *down* regulada em fenótipos metastáticos. Por outro lado, após sofrer a liberação da membrana, pela ação de *shedases*, esse proteoglicano, uma vez solúvel, tem sido diretamente associado com aumento da invasividade e com a progressão do câncer (REILAND *et al.*, 2004).

A análise inicial foi realizada pela informação gênica e foi verificado que o tratamento com M1 ou com M8 reduziu a expressão gênica que codifica o sindecam-1 em 34,2% ($\pm 0,05$) e 36,9% ($\pm 0,002$), respectivamente (Figura 32A). Por outro lado, a avaliação qualitativa da expressão de Sindecam-1 não representa tais alterações (Figura 32 B). Visualmente, a marcação obtida tanto para M1, quanto para M8 parece não evidenciar se há, de fato, diminuição da expressão proteica desse proteoglicano. No entanto, uma análise quantitativa, como a citometria de fluxo, deve ser realizada para complementar esses dados.

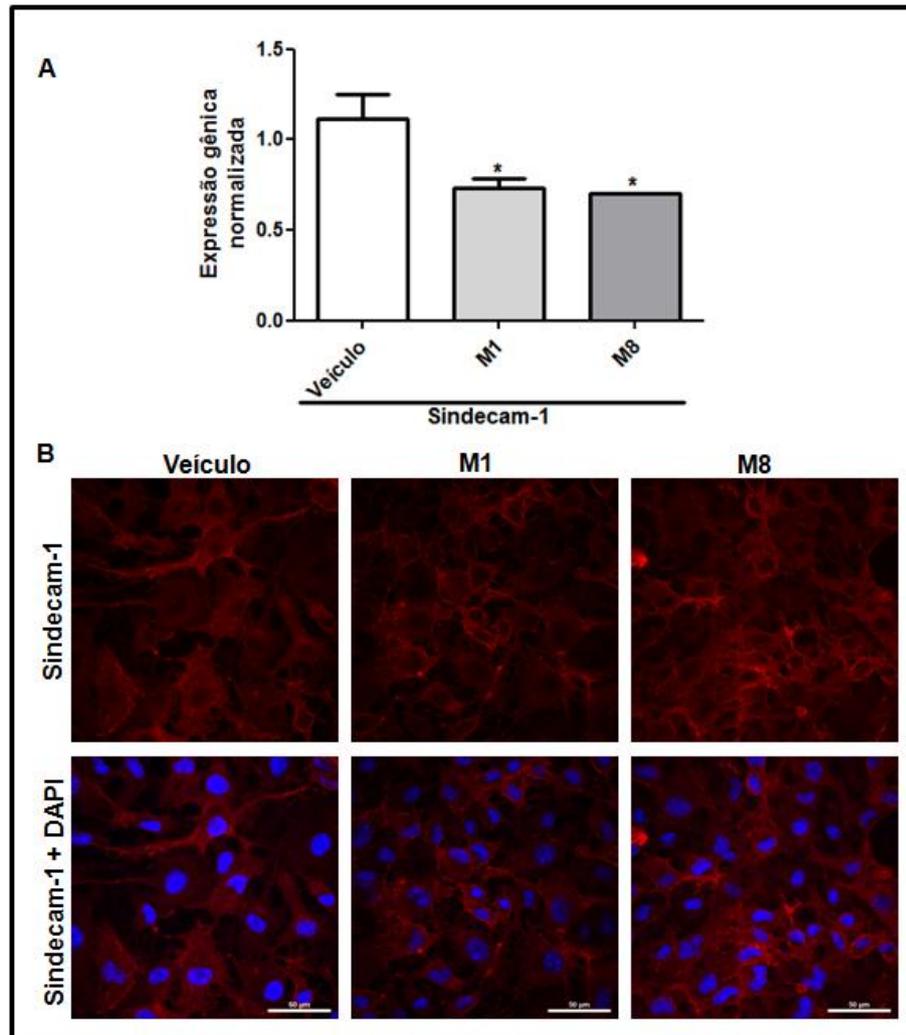


Figura 32. Expressão gênica e qualitativa de syndecam-1. Células B16F10 foram tratadas com meio contendo 20% de complexos naturais altamente diluídos M1, M8 ou de veículo, por 96 horas, realizando reforço de 1% a cada 24 horas. O gráfico representa a expressão de mRNA que codifica para syndecam-1 (A) ($n=3$), e imagens qualitativas da marcação com anticorpo anti-syndecam-1, identificadas pelo anticorpo secundário conjugado com Alexa Flúor 594 (vermelho) e núcleo corado em azul com DAPI (B). No gráfico os resultados são expressos como média \pm erro padrão. A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós teste de Bonferroni. Diferença comparada ao veículo: *para $p<0,05$. Os dados representam três experimentos independentes realizados em duplicata. Barra = 50 μm .

6.2.4.2.2. Sindecam-2

É mostrado que em melanoma a expressão de sindecam-2 é elevada quando comparada com células de melanócitos normais, e dessa forma, facilita a migração e invasão celular (LEE *et al.*, 2009). Assim, quando investigada possíveis alterações nesse proteoglicano, foi verificado que o tratamento com os complexos M1 e M8 reduziu a expressão gênica que codifica o sindecam-2 em 46,9% ($\pm 0,06$) e 55,7% ($\pm 0,005$) respectivamente (Figura 33).

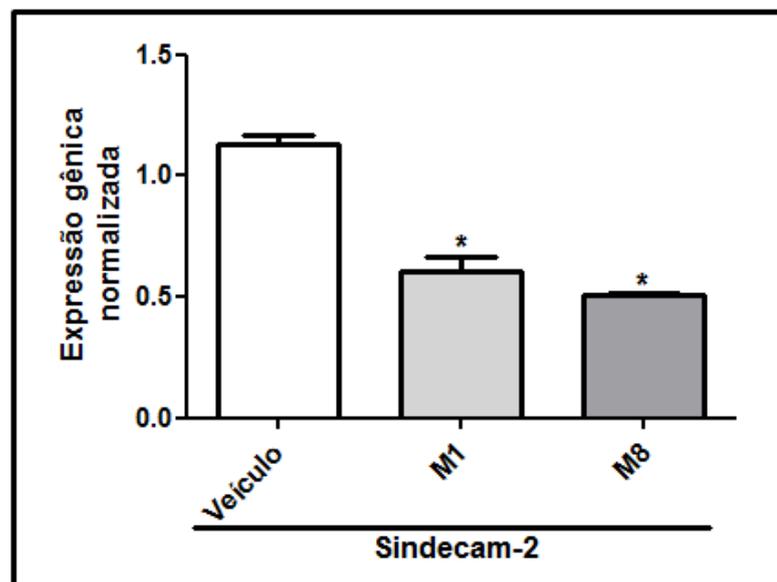


Figura 33. Expressão gênica de Sindecam-2. Células B16F10 foram tratadas com meio contendo 20% de complexos naturais altamente diluídos M1, M8 ou de veículo, por 96 horas, realizando reforço de 1% a cada 24 horas. O gráfico representa a expressão de mRNA que codifica para Sindecam-2. O resultado é expresso como média \pm erro padrão ($n=3$). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós teste de Bonferroni. Diferença comparada ao veículo: *para $p<0,05$. Os dados representam três experimentos independentes realizados em duplicata.

6.2.4.2.3. Glipicam-3

Outro proteoglicano importante para a progressão tumoral é o glipicam-3. Assim, foi investigado se os complexos alteram a expressão gênica desse proteoglicano. Os resultados mostraram que o tratamento com os complexos M1 e M8 reduziu a expressão gênica que codifica o glipicam-3 em 41,1% ($\pm 0,01$) e 37,8% ($\pm 0,02$) respectivamente (Figura 34).

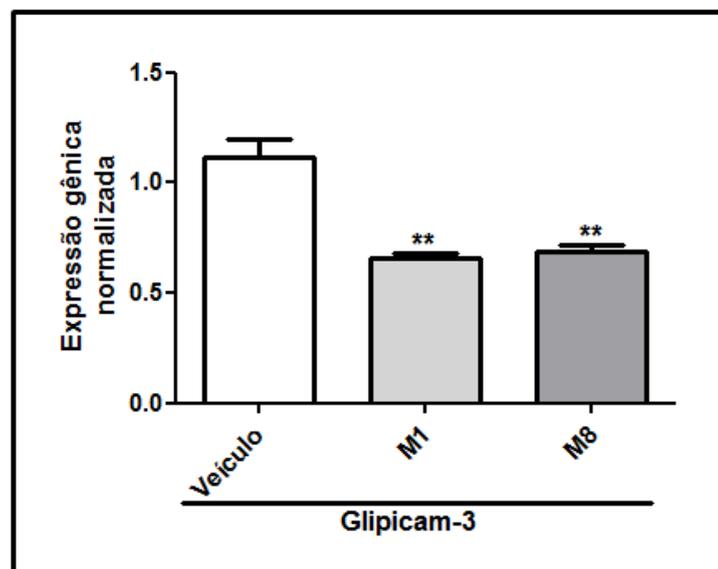


Figura 34. Expressão gênica de glipicam-3. Células B16F10 foram tratadas com meio contendo 20% de complexos naturais altamente diluídos M1, M8 ou de veículo, por 96 horas, realizando reforço de 1% a cada 24 horas. O gráfico representa a expressão de mRNA que codifica para glipicam-3. O resultado é expresso como média \pm erro padrão ($n=3$). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós teste de Bonferroni. Diferença comparada ao veículo: **para $p<0,01$. Os dados representam três experimentos independentes realizados em duplicata.

6.2.4.2.4. Perlecam

No estudo realizado pelo nosso grupo, Guimarães (2009) verificou que em modelo *in vivo* de metástase pulmonar, havia redução de perlecam após o tratamento com os complexos (tanto com M1, quanto com M8). Vale destacar que o perlecam *in vivo* age como um fator angiogênico. No presente trabalho foi verificado que o tratamento com os complexos M1 e M8 reduziu a expressão gênica que codifica o perlecam em 47,8% ($\pm 0,10$) e 55,5% ($\pm 0,07$) respectivamente (Figura 35).

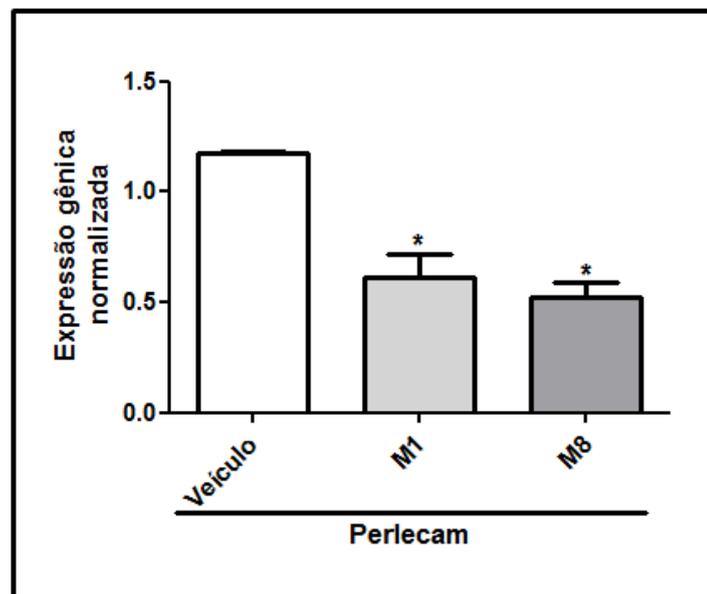


Figura 35. Expressão gênica de perlecam. Células B16F10 foram tratadas com meio contendo 20% de complexos naturais altamente diluídos M1, M8 ou de veículo, por 96 horas, realizando reforço de 1% a cada 24 horas. O gráfico representa a expressão de mRNA que codifica para Perlecam. O resultado é expresso como média \pm erro padrão ($n=3$). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós teste de Bonferroni. Diferença comparada ao veículo: *para $p<0,05$. Os dados representam três experimentos independentes realizados em duplicata.

6.2.4.3. Enzimas que modificam heparam sulfato

De forma até mais importante que a expressão gênica dos PGHS é verificar a expressão das enzimas que modificam estruturalmente as cadeias de proteoglicanos, que no caso dos que carregam heparam sulfato, essas modificações envolvem a clivagem parcial do ectodomínio do esqueleto proteico ou da parte sacarídica ou ainda de grupamentos sulfato em locais específicos.

Os resultados mostraram que o tratamento com os complexos M1 e M8 reduziu a expressão gênica que codifica a heparanase em 42,1% ($\pm 0,08$) e 43,8% ($\pm 0,04$), respectivamente (Figura 36 A), enquanto que apenas o M8 reduziu a expressão da sulfatase em 58,8% ($\pm 0,02$) (Figura 36B).

Vale lembrar que outra enzima que modifica heparam sulfato é a MMP-2, agindo como uma *shedase*, apresentou redução na expressão gênica em 40,2% ($\pm 0,03$) (Figura 17B).

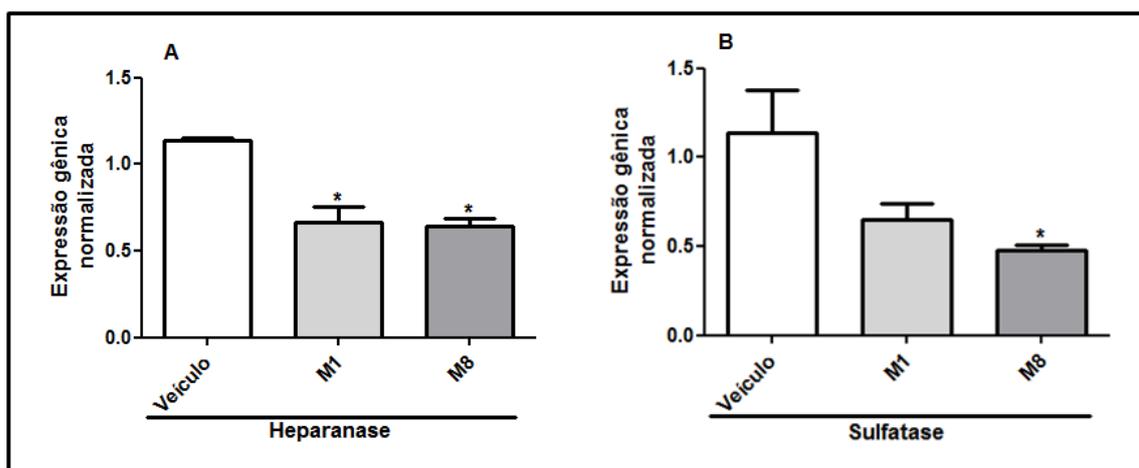


Figura 36. Expressão gênica de enzimas que modificam heparam sulfato. Células B16F10 foram tratadas com meio contendo 20% de complexos naturais altamente diluídos M1, M8 ou de veículo, por 96 horas, realizando reforço de 1% a cada 24 horas. O gráfico representa a expressão de mRNA que codifica para heparanase (A) e sulfatase (B). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão ($n=3$). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós teste de Bonferroni. Diferença comparada ao veículo: *para $p<0,05$. Os dados representam três experimentos independentes realizados em duplicata.

7. DISCUSSÃO

O melanoma é o tipo de câncer de pele mais grave devido ao alto potencial metastático e pouca responsividade aos tratamentos convencionais atuais (IBRAHIM, HALUSKA, 2009; MADONNA *et al.*, 2012; MARTÍ, SOROLLA, YERAMIAN, 2012). Assim, pesquisas experimentais que envolvam o desenvolvimento de formas adjuvantes ou complementares de tratamento fazem-se importantes. Nesse viés destacam-se os estudos com complexos naturais altamente diluídos, os quais são utilizados há muitos anos pela humanidade, principalmente na Europa (VIKSVEEN, DYMTR, SIMOENS, 2013). Recentemente trabalhos científicos, de pesquisa básica, têm sido publicados com o intuito de avaliar os efeitos da homeopatia no tratamento do câncer, com resultados promissores (GUIMARÃES *et al.*, 2010; PREETHI *et al.*, 2012; ARORA *et al.*, 2013; GHOSH *et al.*, 2013; SAHA *et al.*, 2013; SAMADDER *et al.*, 2013). Dentre esses trabalhos referenciados, destaca-se o trabalho realizado por Saha e colaboradores (2013), no qual é demonstrado os efeitos antitumorais da *Calcarea carbonica*, composto presente na formulação dos complexos utilizados no presente trabalho. Saha demonstra que o tratamento com a *Calcarea carbonica* na potência 6C, reduz o tumor Sarcoma-180 em camundongos, pela ativação de vias apoptóticas e pela ativação do sistema imune do hospedeiro. Entretanto, em condições *in vitro*, a *Calcarea carbonica* não é capaz de induzir a apoptose. Esse resultado vai de encontro aos resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa, onde os complexos em condições *in vivo* ativam o sistema imune de forma a reduzir os nódulos tumorais (GUIMARÃES *et al.*, 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2010), mas em contra partida, em condição *in vitro* não ativam vias apoptóticas (Figura 22 e 23).

Em especial, no trabalho de Guimarães e colaboradores (2010), destacam-se dois modelos experimentais importantes no momento: o modelo de metástase *in vivo*, utilizando células B16F10 injetadas pela veia caudal em camundongos C57BL6, no qual os animais foram tratados por via inalatória com o complexo M8 duas vezes ao dia por 14 dias, e um modelo de invasão *in vitro* com matrigel, no qual pôde-se avaliar a capacidade invasiva das células após o tratamento com o complexo M8. Neste trabalho foi observada a redução dos nódulos tumorais pulmonares quando comparado com o tratamento com o veículo, mostrando efeito

antitumoral, e redução da capacidade invasiva. Resultados similares foram obtidos após o tratamento com M1 (GUIMARÃES, 2009; ANDRADE, 2011). A partir desses resultados surgiu a hipótese do presente trabalho: “Quais seriam as mudanças celulares e moleculares, desencadeadas pelos complexos M1 e M8, em células de melanoma murino (B16F10), que justifiquem os resultados antitumorais obtidos anteriormente?”. A vertente mais importante do trabalho é buscar entender o efeito dos complexos na etapa mais crucial no tumor maligno, que é a metástase e todos os eventos que a margeia.

A metástase é um processo que envolve etapas sucessivas que podem ser citadas resumidamente iniciando com: a desadesão das células do tumor primário, migração para a membrana basal, seguido pela invasão nesta camada, com consequente entrada na corrente circulatória, extravazamento e migração em órgão secundário, colonização e proliferação (CURRAN; MURRAY, 1999). Assim, o entendimento dos eventos que desencadeiam a metástase, que inclui a migração celular e invasão, é essencial para facilitar a identificação de novos alvos terapêuticos. Diante disso, primeiramente foi investigado se o tratamento com os complexos eram capazes de interferir na expressão e atividade de metaloproteases (MMPs). Células tumorais apresentam normalmente expressão alterada de MMPs e de seus inibidores, as TIMPs (HOFMANN *et al.*, 2005). Várias são as metaloproteases expressas no melanoma, dentre elas as que se encontram mais abundantes são a MT1-MMP, MMP-2 e MMP-9. Especificamente, a alteração do mRNA que codifica três tipos de metaloproteases (MT1-MMP, MMP-2 e MMP-9), bem como dos inibidores de MMPs (TIMPs) foi analisada neste trabalho. Foi verificado que o tratamento das células com M1 ou com M8 foi capaz de reduzir a expressão gênica da MT1-MMP e MMP-9, entretanto apenas o M1 reduziu a expressão gênica da MMP-2 (Figura 17). É demonstrado que a superexpressão de MT1-MMP aumenta o crescimento e a vascularização do tumor *in vivo* (SOUNNI *et al.*, 2002) e é responsável pelo remodelamento da matriz extracelular diretamente pela degradação de diversos de seus componentes, e indiretamente por agir na ativação da MMP-2, processo esse que requer a TIMP-2 que age como molécula mediadora da ligação pro-MMP-2/MT1-MMP (HOFMANN *et al.*, 2005). A MMP-2 ativa, diretamente modula a adesão da célula e seu espraiamento nos componentes da matriz extracelular, facilitando a migração e a invasão do melanoma (HOFMANN *et al.*, 2005). Interessantemente, o complexo M8 reduz a expressão gênica tanto da

TIMP-2 quanto da TIMP-3, inibidores de metaloproteases conhecidos justamente para essa função, onde a redução de sua expressão e atividade seria um indicativo de um prognóstico ruim. Entretanto as TIMPs possuem outras atividades biológicas importantes no câncer (SUN, 2010). Como citado anteriormente, a TIMP-2 juntamente com a MT1-MMP, formam um complexo proteico que clivam o domínio de cisteína da proMMP-2, ativando-a (PASCO *et al.*, 2004; HOFMANN *et al.*, 2005). A superexpressão da TIMP-2 protege as células de melanoma humano contra apoptose (SUN, 2010), assim como em células de melanoma murino B16F10 (VALENTE *et al.*, 1998). Além disso, as TIMPs podem modular a via de NF κ B, aumentando a sua atividade transcricional, o que conseqüentemente pode levar ao aumento da expressão de MMPs (SUN, 2010). Assim os efeitos biológicos das TIMPs são controversos e precisam ser melhor entendidos.

Quando foi analisada a atividade gelatinolítica das MMPs, somente a MMP-9 apresentou-se ativa, e o tratamento com os complexos (M1 ou M8) reduziram sua atividade (Figura 17). É conhecido que dentre as diversas linhagens de melanoma as células de B16F10 possuem alta invasividade, com alta atividade gelatinase, derivadas das atividades de MMP-2 e MMP-9 (ZHAO *et al.*, 2001).

A transcrição da expressão das MMPs é controlada por uma série de citocinas e fatores de crescimento. Já em nível pós transcricional a atividade das MMPs é controlada pela ativação proteolítica de enzimas latentes e pela interação com seus inibidores específicos, as TIMPs. Na MMP-9 o promotor têm sítios de ativação para fatores de transcrição incluindo o NF κ B. Já foi demonstrado que a ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), como a ERK1/2, p38, JNK(1/2) e PI-3 quinase, são importantíssimas para o aumento da expressão da MMP-9 em resposta a diferentes agonistas. A MAPK ativada é translocada ao núcleo e ativa fatores de transcrição que interagem com elementos responsivos no promotor de MMP. Dessa forma fatores de transcrição, como o NF κ B, podem regular a expressão de MMP-9 (CHOI *et al.*, 2010). Além disso, Choi e colaboradores (2010) mostraram que quando usado um inibidor de NF κ B, havia menor expressão proteica de MMP-9, bem como menor atividade gelatinase. Já que a expressão da MMP-9 foi reduzida pelos complexos e houve uma redução discreta na atividade gelatinase (Figura 17), um ensaio de imunocitoquímica para marcação de NF κ B foi realizado, e observou-se redução na intensidade de fluorescência (Figura 18). Esse resultado é

um indicativo de que a redução da expressão e atividade da MMP-9 pode ser decorrente de uma possível redução da expressão de NF κ B. No entanto, outros estudos e técnicas devem ser realizados para responder melhor esse possível mecanismo de ação.

De forma a continuar a investigação do efeito dos complexos sobre eventos metastáticos, a próxima etapa do trabalho foi avaliar se o tratamento alterava a migração celular. E como resultado foi observado que o tratamento com M1 ou com M8, foi capaz de reduzir a capacidade migratória das células B16F10 em dois modelos de migração distintos analisados (*scratch* e *transwell*) (Figura 19 e 20, respectivamente). Ainda, foi observado que o tratamento com M1 reduz mais o potencial migratório das células quando comparado com o tratamento com o complexo M8. Várias são as vias que regulam a migração celular, dessa forma um estudo aprofundado sobre migração celular deve ser realizado para sugerir um possível mecanismo de ação e verificar as diferenças de atividades entre M1 e M8.

Vale lembrar que a migração celular é um processo chave para uma série de funções celulares e fisiológicas, incluindo quimiotaxia, angiogênese e cicatrização de feridas. No entanto, a migração em células tumorais, faz parte do processo de metástase. Sendo assim, células que possuem potencial migratório alto fornecem pobre prognóstico em pacientes com câncer (YANG *et al.*, 2007). Estudos sugerem que moléculas presentes intracelularmente, na membrana das células ou mesmo no microambiente do tumor têm significativo impacto nas propriedades migratórias das células (CHUNG *et al.*, 2012). Embora diversos estudos têm investigado os efeitos de ROS na migração e invasão celular, os resultados são pouco conclusivos e muito variáveis, devido ao tipo de ROS, concentração, local de produção, bem como o tipo celular ou tecidual. No estudo realizado por Chung e colaboradores (2012), quando as células B16F10 foram tratadas com H₂O₂ foi observada uma redução do potencial migratório. Outro trabalho publicado, em células de carcinoma de pulmão (linhagem H460), utilizando uma série de inibidores e doadores de ROS, foi demonstrado que diferentes tipos de ROS apresentam diferentes efeitos na migração e invasão celular. Além disto, o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio inibem a migração e invasão celular. De forma contrária, o radical hidroxila promove migração e invasão celular (LUANPITPONG *et al.*, 2010).

A partir dessas informações, foi investigado se o tratamento com os complexos também alteravam ROS, NO e a concentração de nitrito. Foi verificado

que o tratamento das células com M1 ou com M8 aumentou quantitativamente ROS (Figura 21A), o qual pode estar ajudando na redução do potencial migratório desencadeado após o tratamento. Ainda, o tratamento com M1 ou com M8, diminuiu o NO intracelular (Figura 21B), e aumentou a concentração de nitrito no meio extracelular, indicando que o NO produzido se difunde através da membrana (Figura 21C). O NO possui efeitos diferentes no tumor, agindo como pró tumoral ou anti tumoral. Em condição pró tumoral, o NO pode estimular o crescimento tumoral e metástase por promover a migração e invasão celular, e por suas habilidades angiogênicas, pela ativação da ciclooxygenase 2 (COX-2). Em linhagem celular de melanoma humano (C32TG) foi observado que a produção endógena de NO facilita a transcrição gênica de MMPs, facilitando a invasão celular (ISHII *et al.*, 2003).

Altas concentrações de NO podem desencadear morte celular e redução da proliferação celular; e contrariamente, baixas concentrações podem promover a proliferação celular e angiogênese (XU *et al.*, 2002). Dados semelhantes foram encontrados por Duh e colaboradores (2012), onde analisaram o efeito antitumoral e apoptótico de resinas extraídas de *Eucalyptus citriodora*. Estes autores encontraram que, de forma concentração dependente, o tratamento com as resinas reduziram a viabilidade celular. Além disso verificaram aumento na concentração de NO e ROS em células B16F10, de forma concentração dependente. Duh e colaboradores (2012) relacionaram que a redução da viabilidade celular era decorrente do aumento de ROS e NO extracelular.

A transfecção do gene que codifica a iNOS (uma das enzimas responsáveis pela produção do óxido nítrico) em células de melanoma murino é responsável pela indução da apoptose, suprime a tumorigenicidade, e retarda ou anula a metástase. De forma geral o NO induz a apoptose pela alteração da expressão e função de múltiplas proteínas relacionadas a apoptose (p.ex.: *downregulation* de Bcl-2, acúmulo da p53 e clivagem da PARP) (PALMIERI *et al.*, 2009).

Além disso, ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) são geradas normalmente pela célula durante a detoxificação, o qual pode levar ao estresse oxidativo, induzindo a apoptose. O NO reage com superóxido e gera RNS, os quais, subsequentemente podem alterar biomoléculas. Assim, a geração de ROS e RNS podem causar peroxidação lipídica em membranas celulares, dano no DNA, reduzir o potencial transmembrânico mitocondrial, podendo desencadear morte celular.

É bem estabelecido que ROS tem papel central na regulação da apoptose, na qual a mitocôndria é tanto fonte, como alvo de ROS (OTT *et al.*, 2007). Assim, foi investigado se os complexos M1 ou M8 alteravam o metabolismo e a permeabilidade da membrana mitocondrial, e a viabilidade celular em si. Foi observado que M1 bem como o M8 não são capazes de alterar nenhum dos parâmetros acima (Figura 22 e 23). Em partes, esse era um resultado esperado, visto que em trabalhos realizados anteriormente, o tratamento com os complexos M1 e M8 não apresentou citotoxicidade em células de melanoma, tampouco em células de linfócitos (GUIMARÃES *et al.*, 2009) ou macrófagos extraídos de camundongos (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Outro processo fisiológico no qual as espécies reativas podem interferir é na pigmentação das células de melanócitos (ROMÉRO-GRAILLET *et al.*, 1996; CHOI *et al.*, 2012). Assim, já que os complexos M1 e M8 alteraram ROS, NO e seu metabólito, o nitrito, foi investigado se esses efeitos refletiriam na produção do pigmento melanina nas células de melanoma. Os resultados revelaram que M1 e M8 reduziram a produção de melanina bem como a atividade e expressão gênica da tirosinase, enzima chave para a melanogênese, bem como a expressão gênica de proteínas relacionadas a melanogênese (TYRP-1 e TYRP-2) e o fator de transcrição (MITF), que conhecidamente regula a expressão dessas proteínas (Figura 24).

Células de melanoma são originadas de melanócitos, os quais são células especializadas na produção do pigmento melanina, responsáveis pela coloração da pele, olhos e cabelo (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007). No processo fisiológico normal, durante a exposição crônica ao sol, a radiação ultravioleta (UV) gera grandes quantidades de radicais livres, os quais podem causar dano ao DNA. A pigmentação cutânea é descrita como a maior defesa fisiológica contra a radiação ultravioleta já que a melanina possui capacidade fotoprotetora por absorver esses radicais livres (PINON *et al.*, 2011), agindo como um antioxidante ou sequestradora de radicais. Um desses radicais é o NO. Roméro-Graillet e colaboradores, (1996) foram os primeiros a descrever o papel do NO na indução da melanogênese. Eles demonstraram que o NO estimula a síntese de cGMP, que é um potente estimulador da melanogênese. Após quatro dias de estimulação com NO exógeno, a expressão proteica e a atividade da tirosinase foram induzidas em melanócitos humanos. Em outro trabalho, publicado recentemente, o tratamento das células de melanoma B16F10 com MHY966 (composto sintetizado com ação anti

melanogênica) reduz a síntese de NO e subsequentemente a síntese de melanina induzida pelo nitroprussiato de sódio (doador de óxido nítrico) (CHOI *et al.*, 2012). Os resultados encontrados no presente trabalho mostram que intracelularmente há redução da síntese de melanina e atividade da tirosinase, mas quando analisado o metabólito do NO (nitrito) extracelular, observa-se um aumento desse metabólito. O NO é um radical livre gasoso facilmente difusível na célula, e é considerado a molécula mensageira intracelular mais abundante e com muitos efeitos biológicos. Possui múltiplas funções fisiológicas, dentre as quais age como mensageiro de citotoxicidade celular mediada por macrófagos, que foi primeiramente descrito por Hibbs, Taintor, e Vavrin, (1987), e desde então muitos estudos surgiram mostrando que o NO, que são gerados por esse processo, era capaz de matar uma série de células tumorais (revisado por XU *et al.*, 2002). Diversos laboratórios já demonstraram que agentes que promovem a liberação de NO, pode induzir a morte das células tumorais, e como consequência houve uma atenção na viabilização dessa disponibilização de NO às células. Drogas que sintetizam e liberam NO estão em desenvolvimento. Outra estratégia interessante é a transfecção de sequencias de cDNA que codificam para NOS (óxido nítrico sintase, enzima responsável pela síntese de óxido nítrico) dentro de células tumorais, como forma de terapia gênica (XU *et al.*, 2002). Apesar de não ter sido observado redução de viabilidade celular após o tratamento com os complexos no tempo de tratamento utilizado, a produção de NO induzida pelo tratamento poderia ter efeito positivo na eliminação das próprias células tumorais a longo prazo. Mas ainda muitos estudos devem ser realizados para o melhor entendimento dos efeitos dos complexos em espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

Atualmente diversos trabalhos tem relacionado a melanogênese com a redução da tumorigenicidade (KANG *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2012) e outros estudos mostrando diferentes compostos com ação anti melanogênica, como um potencial tratamento para o clareamento de pele, mas não como tratamento antitumoral (HUANG *et al.*, 2012; CHEUNG *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2013). Assim, este trabalho traz informações com enfoque diferente dos dados encontrados em grande parte da literatura. Recentemente, CHUNG e colaboradores (2012), relacionou que o aumento da expressão do receptor de melanocortina (MCR1), importante na regulação da pigmentação, melhoravam a migração de células de melanoma humano e murino, o que corrobora com os resultados obtidos neste

trabalho, em que o tratamento com os complexos reduzem a migração celular e síntese de melanina estava prejudicada.

Em outro trabalho, utilizando uma linhagem de melanoma humano (WM35), cuja linhagem foi transfectada com o gene que codifica a proteína TYRP-2 (proteína que quando expressa aumenta a síntese de melanina), foi observado aumento da resistência ao quimioterápico cisplatina (CHU *et al.*, 2000), indicando que a síntese de melanina e de proteínas envolvidas na melanogênese, podem estar relacionadas ao mecanismo de resistência a drogas. Dessa forma, foi investigado o efeito dos complexos neste mecanismo, e foi encontrado que o M1 foi capaz de reduzir a capacidade de resistência a multidrogas, mostrando maior acúmulo de rodamina b dentro das células (Figura 25), entretanto o tratamento com M8 não foi capaz de induzir alguma atividade nesse sistema, o que demonstra que o complexo M8 possui atividade antitumoral que utiliza mecanismo distinto ao do M1.

A resposta do melanoma a terapia convencional é limitada, em parte, pela extrema complexidade do mecanismo de resistência a drogas nesse tipo de câncer. A resistência as terapias é devido a uma série de fatores, bem como: alterações no ciclo celular e metabolismo, aumento na reparação do DNA, inibição de vias apoptóticas e por fim, melhora do efluxo de drogas, cujo mecanismo afeta diretamente a sensibilidade a drogas. A redução tumoral induzida pelas drogas atuais é temporária e muitos tumores progridem após curtos períodos de tempo. Ambos mecanismos intrínsecos e adquiridos têm papel na quimioresistência do melanoma. Uma das propriedades fundamentais para a resistência intrínseca é a expressão de proteínas pertencentes a uma superfamília denominada transportadores ABC ou no inglês *ATP-Binding Cassette* (ABC), as quais funcionam como transportadores dependentes de ATP (FUKUNAGA-KALABIS; HERLYN, 2013). Os transportadores ABC são importantes na passagem de substâncias através das barreiras teciduais e celulares, e em células tumorais com fenótipos de quimioresistência (ROTHWEILER *et al.*, 2010). Substâncias que interferem com a função dos transportadores ABC podem sensibilizar as células que expressam essas proteínas à citotoxicidade das drogas (ROTHWEILER *et al.*, 2010). No trabalho publicado por CHEN e colaboradores (2009), foi analisado o papel dos transportadores ABC na melanogênese, onde agem na detoxificação endógena de produtos melanogênicos citotóxicos, que conferem a essas células resistência a drogas.

A atividade anticâncer de substâncias é frequentemente limitada por mecanismos de quimioresistência das células cancerosas. Assim, uma estratégia importante para o tratamento de tumores malignos seria amenizar ou inibir esse mecanismo.

Como descrito anteriormente, vários são os mecanismos que levam a progressão das células tumorais. Desta forma, importantes alterações em carboidratos e glicoconjugados são fundamentais no processo de migração e invasão celular. Assim, a segunda parte deste trabalho foi investigar se os complexos naturais altamente diluídos alteravam os carboidratos nas células. Para tanto, primeiramente foi verificado se o tratamento com os complexos alteram carboidratos totais, bem como as glicosilações específicas que servem de ligação para determinadas lectinas. Foi observado que de forma menos acentuada o M1, mas principalmente o M8, reduz a quantidade de carboidratos totais (Figura 26).

Em seguida foi analisado possíveis alterações em uma glicoproteína específica, a integrina (subunidade $\beta 1$), e os resultados mostraram que o tratamento com M1 ou M8 reduziram expressão dessa glicoproteína analisada por citometria de fluxo (Figura 28). As integrinas são uma família diversa de glicoproteínas que formam receptores heterodiméricos para moléculas de MEC. Cada integrina geralmente consiste de subunidades α e β ligadas de forma não covalente, onde cada subunidade possui um domínio extracelular grande, um único domínio que atravessa a membrana e uma pequena cauda citoplasmática não catalítica. Além da regulação da adesão aos componentes da MEC, as integrinas transmitem os sinais extracelulares às células, que influenciam a proliferação celular, transcrição gênica, migração e fazem a regulação da atividade de enzimas proteolíticas que degradam os componentes da MEC. Além disso, a cauda citoplasmática faz o recrutamento de proteínas sinalizadoras que modulam a adesividade das células na MEC (HOOD; CHERESH, 2002). A redução da expressão dessa subunidade indica menor quantidade de integrinas que contem essa subunidade, e esse resultado é importante, visto que, a integrina $\alpha 4\beta 1$ se liga em CSPG4, o qual age como um coreceptor para a integrina, modulando a adesão celular, mecanismo dependente da família RhoGTPase (YANG *et al.*, 2004). Ainda, quando o CSPG4 interage com a integrina ele regula a ativação da proMMP-2 (IIDA *et al.*, 2007; PRICE *et al.*, 2012), favorecendo a migração e invasão.

Já o tratamento com M1 reduz a intensidade de marcação para lectina WGA (Figura 28), que liga-se especificamente em *N*-acetilglucosamina e ácido siálico. Um dos GAGs ricos em *N*-acetilglucosamina é o AH e foi observado que o tratamento com os complexos alteravam a síntese e secreção de AH (Figura 29).

O AH é o maior componente da MEC e é sintetizado por uma variedade enorme de células. As células de melanoma expressam pouco AH, quando comparado com outros tipos celulares, mas mesmo assim este composto têm implicações importantes na progressão tumoral, principalmente quando clivado em pequenos fragmentos. Foi observado que fragmentos de AH, são capazes de se ligar nas células de melanoma e induzir a *upregulation* de IL-8 e da MMP-2. Outra observação importante é que os fragmentos de ácido hialurônico melhoram a motilidade dessas células, cujo mecanismo é dependente de *toll-like receptor 4* (TLR-4) (VOELCKER *et al.*, 2008). Ainda, os fragmentos, um vez solúveis, são fatores angiogênicos (WILLENBERG *et al.*, 2014). Esses dados sugerem que os fragmentos, provenientes do AH, ativam as células de melanoma contribuindo com a progressão tumoral. Quando observado a expressão gênica de hialuronidases (enzimas que clivam AH), observou-se que o tratamento com os complexos reduziram sua expressão.

Considerando que AH é um dos membros da família dos GAGs e esses compostos são sintetizados na forma de proteoglicano (com exceção do próprio AH), a investigação das possíveis alterações em proteoglicanos mostrou que o tratamento com os complexos M1 e M8 reduzem a expressão gênica do sindecam-1, sindecam-2, glipicam-3 e perlecan, proteoglicanos de heparan sulfato (Figuras 31, 32, 33 e 34, respectivamente), bem como de PGCS.

Quanto aos PGHS, há poucos estudos sobre o sindecam-1 no melanoma, mas tem sido sugerido que a expressão dessa molécula na superfície das células e sua degradação por heparanases são importantes determinantes no controle da invasão e metástase celular. Além disso, a expressão de sindecam-1 é correlacionada com aumento do potencial metastático em células de melanoma (O'CONNELL *et al.*, 2009; ORECCHIA *et al.*, 2013). Quando foi realizado um *knockdown* de sindecam-1 houve redução da invasão (O'CONNELL *et al.*, 2009).

Já o sindecam-2 é altamente expresso em células de melanoma, diferentemente de células de melanócitos normais. Da mesma forma que o sindecam-1, o sindecam-2 melhora a invasão e migração celular do melanoma. Em

estudo realizado por Lee e colaboradores (2009), quando as células de melanoma foram tratadas com fator de crescimento de fibroblasto-2, conhecido por estimular a migração de células de melanoma, a expressão de sindecam-2 aumentou. Além disso, foi demonstrado que a ativação do receptor de melanocortina-1 (MCR-1), aumenta a expressão de sindecam-2, melhorando a migração celular (CHUNG *et al.*, 2012). Vale lembrar que o receptor MCR-1 está relacionado com a síntese de melanina nas células, e no presente trabalho foi observado redução da síntese de melanina, bem como da expressão gênica de sindecam-2.

Outro PGHS de superfície celular, também é importante no melanoma, é o glipicam-3, sendo também superexpresso. Atualmente é utilizado na clínica como um marcador para o melanoma. Em pacientes que tiveram o melanoma removido cirurgicamente, a detecção de glipicam-3 no soro é de 0%, enquanto que 40% dos pacientes com melanoma metastático apresentam marcação positiva de glipicam-3 no soro (HO, KIM, 2012). Novamente, nossos dados mostram que esse PGHS também é reduzido após o tratamento com os complexos.

Por outro lado, o perlecam é um PGHS da MEC, e possui como função primordial na angiogênese, sendo mais expresso em tecidos vascularizados. É conhecido que em uma condição tumoral o perlecam acumula-se na MEC e cria um microambiente favorável a angiogênese, crescimento e invasão celular (FJELDSTAD, KOLSET, 2005). No trabalho realizado por Guimarães (2009), foi observado que em modelo *in vivo* de metástase pulmonar, o tratamento com os complexos M1 e M8 por 14 dias (por via inalatória) reduz a quantidade de perlecam na MEC. De forma complementar, no presente trabalho, em modelo *in vitro*, foi mostrado que os complexos reduzem a expressão gênica desse PGHS.

Muitas das propriedades funcionais do heparam sulfato dependem da interação entre o GAG e proteínas (p.ex. fatores de crescimento, citocinas, e moléculas da MEC, entre outras) (BERNFELD *et al.*, 1999). Essa interação é geralmente de natureza eletrostática (LINDAHL *et al.*, 1994; HUHTALA PENTIKÄINEN, JOHNSON, 1999). Vale lembrar que a porção negativa do proteoglicano está diretamente relacionada à parte sacarídica, que é rica em grupamentos carboxílicos e sulfatos. Assim, se considerarmos que no processo tumoral há expressão de sulfatase (enzimas que removem grupamentos sulfato da porção sacarídica do proteoglicano de heparam sulfato), e que o tratamento com os complexos reduziu a expressão dessa enzima, a capacidade de ligação do

proteoglicano expresso nas células tratadas é melhorada, se comparado ao heparam sulfato das células tumorais (não tratadas). Neste mesmo sentido estão os dados obtidos para a heparanase, enzima que cliva a cadeia sacarídica. Assim, com menos heparanase e menos sulfatase, a menor quantidade de proteoglicano de heparam sulfato expressa nas células tratadas com os complexos (observados para os sindecans-1 e -2, glipicam 3 e perlecam), poderia explicar o porquê a adesão nas células não foi reduzida. Corroboram com esta hipótese, os dados obtidos por Franco e colaboradores (2009) que mostram que uma célula mutante, deficiente da biossíntese de proteoglicanos (CHO-745), produz 95% menos GAGs totais, comparada com a célula selvagem (CHO-K1). No entanto, para manter a adesão celular, quando observada a integrina $\alpha 5\beta 1$, esta redução é de apenas 50%, mostrando que a célula direciona a síntese de GAG, conforme sua necessidade (FRANCO *et al.*, 2009).

Por outro lado, quanto ao PGCS, foi observado menor expressão deste PG em células tratadas com o complexo M8 (Figura 31). Especificamente o PGCS4 foi identificado na superfície de células de melanoma, e sua expressão está relacionada com a formação de tumores e com prognóstico ruim. Além disso, sua expressão está correlacionada com a resistência do melanoma a quimioterapia convencional (PRICE *et al.*, 2012).

Os dados mostram que M1 e M8 reduzem a expressão de PGCS, de PGHS, bem como a expressão de enzimas que fazem o remodelamento desse PG, que estão essencialmente envolvidos na progressão tumoral.

Interessantemente, o tratamento tanto com M1 quanto com M8 modificam características nas células, que reduzem a migração celular e o potencial tumorigênico. Esses efeitos foram observados também em estudo *in vivo* no trabalho de Guimarães (2009) e também no trabalho de Andrade (2011). Assim, os principais parâmetros de característica tumoral que estão aumentados nas células de melanoma, foram avaliados *in vitro* no presente trabalho, e após o tratamento com os complexos esses parâmetros foram reduzidos. Um esquema compilado dos efeitos dos complexos está proposto na figura 37.

8. CONCLUSÕES

Os resultados mostram que os complexos M1 ou M8 reduzem características fenotípicas metastáticas em células de melanoma murino. Assim, no presente trabalho concluí-se que o tratamento com os complexos:

- Diminuem a expressão gênica de metaloproteases, e atividade da MMP-9, justificando a redução do potencial invasivo das células, observado em trabalho anterior;
- Reduzem a expressão proteica de NF κ B subunidade p65, embora haja a necessidade de confirmação desse dado em citometria de fluxo;
- Reduzem a migração celular, possivelmente por alterações em espécies reativas e por reduzir a expressão de ácido hialurônico, hialuronidases e de proteoglicanos importantes nesse processo;
- O tratamento com M1 é capaz de reduzir o mecanismo de resistência a drogas, o que as tornaria mais susceptíveis às terapias convencionais;
- Reduzem claramente os proteoglicanos de heparan sulfato e de condroitim sulfato, que são moléculas importantes para o perfil metastático;
- Enzimas responsáveis por modificações em proteoglicanos de heparan sulfato também foram reduzidas pelos tratamentos com os complexos.

Diante disso, pesquisas com esses complexos devem ser continuadas a fim de complementar os dados obtidos nesse trabalho, já que os resultados sugerem redução de características metastáticas que podem justificar os resultados obtidos em modelo *in vivo* no qual já foi mostrado o efeito antitumoral.

9. REFERÊNCIAS

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

AFRATIS, N.; GIALELI, C.; NIKITOVIC, D.; TSEGENIDIS, T.; KAROUSOU, E.; THEOCHARIS, A.D.; PAVÃO, M.S.; TZANAKAKIS, G.N.; KARAMANOS, K. Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. **The FEBS journal**, v. 279, n. 7, p. 1177–97, 2012.

ANDRADE, L.F. **Avaliação da ação do medicamento m1 sobre o melanoma murino “ in vivo”**. Curitiba, 2011, 65 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

ARORA, S.; AGGARWAL, A.; SINGLA, P.; JYOTI, S.; TANDON, S. Anti-proliferative effects of homeopathic medicines on human kidney, colon and breast cancer cells. **Homeopathy : the journal of the Faculty of Homeopathy**, v. 102, n. 4, p. 274–82, 2013.

ASIMAKOPOULOU, A.P.; THEOCHARIS, A.D.; TZANAKAKIS, G.N.; KARAMANOS, N.K. The biological role of chondroitin sulfate in cancer and chondroitin-based anticancer agents. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 22, n. 3, p. 385–9, 2008.

BELLAVITE, P.; CONFORTI, A.; PIASERE, V.; ORTOLANI, R. Immunology and Homeopathy. 1. Historical background. **eCAM**, v. 2, n. 4, p. 441-452, 2005.

BEN-ARYE, E.; ALI-SHTAYEH, M.S.; NEJMI, M.; SCHIFF, E.; HASSAN, E.; MUTAFOGLU, K; AFIFI, A.U.; JAMOUS, R.M.; LEV, E.; SILBERMMAN, M. Integrative oncology research in the Middle East: weaving traditional and complementary medicine in supportive care. **Supportive care in cancer: official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer**, v. 20, n. 3, p. 557–64, 2012.

BERNFELD, M.; GOTTE, M.; PARK, P.W.; REIZES, O.; FITZGERALD, M.L.; LINCECUM, J.; ZAKO, M. Functions Of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. **Annual Review of Biochemmistry**, p. 729–777, 1999.

BRASIL. Portaria n. 971, de 03 de maio de 2006. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 04 de maio de 2006.

BRUYN, M.; RYBCZNSKA, A.A.; WEI, Y.; SCWENKERT, M.; FEY, G.H.; DIERCKX R.A.J.O.; WAARDE, A.; HELFRICH, W.; BREMER, E. Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan (MCSP)-targeted delivery of soluble TRAIL potently inhibits melanoma outgrowth *in vitro* and *in vivo*. **Molecular Cancer**, v. 9, n. 1, p. 301, 2010.

CESAR, B.; ABUD, A.P.R.; DE OLIVEIRA, C.C.; CARDOSO, F.; GREMSKI, W.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Activation of mononuclear bone marrow cells treated *in vitro* with a complex homeopathic medication. **Micron**, v. 39, n. 4, p. 461-470, 2008.

CESAR, B.; ABUD, A.P.R.; DE OLIVEIRA, C.C.; CARDOSO, F.; DI BERNARDI, R.P.; GUIMARÃES, F.S.F.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Treatment with at homeopathic complex medication modulates mononuclear bone marrow cell differentiation. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2011, p. 212459, 2011.

CHEN, K.G.; LAEPMAN, R.D.; ZHANG, G.; LAI, B.; VALENCIA, J.C.; CARDARELLI, C.O.; VIEIRA, W.D.; HEARING, V.J.; GOTTESMAN, M.M. Influence of melanosome dynamics on melanoma drug sensitivity. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 18, p. 1259–71, 2009.

CHEUNG, F.W.K.; GUO, J.; LING, Y.; CHE, C.; LIU, W.. Anti-melanogenic property of geoditin A in murine B16 melanoma cells. **Marine drugs**, v. 10, n. 2, p. 465–76, 2012.

CHOI, J.H.; HAN, E.H.; HWANG, Y.P.; CHOI, J.M.; CHOI, C.Y.; CHUNG, Y.C.; SEO, J.K.; JEONG, H.G. Suppression of PMA-induced tumor cell invasion and metastasis by aqueous extract isolated from *Prunella vulgaris* via the inhibition of NF-kappaB-dependent MMP-9 expression. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 48, n. 2, p. 564–71, 2010.

CHOI, Y.J.; UEHARA, Y.; PARK, J.Y.; CHUNG, K.C.; HA, Y.M.; KIM, J.M.; SONG, Y.M.; CHUN, P.; PARK, J.W.; MOON, H.R.; CHUNG, H.Y. Suppression of melanogenesis by a newly synthesized compound, MHY966 via the nitric oxide/protein kinase G signaling pathway in murine skin. **Journal of dermatological science**, v. 68, n. 3, p. 164–71, 2012.

CHU, W.; PAK, B.J.; BANI, M.R.; KAPOOR, M.; LU, S.; TAMIR, A.; KERBEL, R.S.; BEM-DAVID, Y. Tyrosinase-related protein 2 as a mediator of melanoma specific resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II): therapeutic implications. **Oncogene**, v. 19, n. 3, p. 395–402, 2000.

CHUNG, H.; LEE, J.; JEONG, D.; HAN, I.; OH, E. Melanocortin 1 receptor regulates melanoma cell migration by controlling syndecan-2 expression. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 23, p. 19326–35, 2012.

CORNWALL, R., TOOMEY, B.H.; BARD, S.; BACON, C.; JARMAN, W.M.; EPEL, D. Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of the mussel *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates. **Aquatic Toxicology**, v. 31, p. 277–296, 1995.

CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S.; QUINTAS, L.E.M. *Similia Similibus Curentur*: notação histórica da medicina homeopática. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n. 4, p. 347-351, 1997.

CURRAN, S.; MURRAY, G. I. MATRIX METALLOPROTEINASES IN TUMOUR INVASION AND METASTASIS. **The Journal of Pathology**, v. 308, p. 300–308, 1999.

DUH, P.D.; CHEN, Z.T.; LEE, S.W.; LIN, T.P.; WANG, Y.T.; YEN, W.J.; KUO, L.F.; CHU, H.L. Antiproliferative activity and apoptosis induction of Eucalyptus Citriodora resin and its major bioactive compound in melanoma B16F10 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 32, p. 7866–72, 2012.

FARACH-CARSON; M.C.; CARSON, D.D. Perlecan—a multifunctional extracellular proteoglycan scaffold. **Glycobiology**, v. 17, n. 9, p. 897-905, 2007.

FEINBERG, A. P.; OHLSSON, R.; HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nature reviews Genetics**, v. 7, n. 1, p. 21–33, 2006.

FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 1–6, 2003.

FJELDSTAD, K.; KOLSET, S. O. Decreasing the metastatic potential in cancers--targeting the heparan sulfate proteoglycans. **Current Drug Targets**, v. 6, n. 6, p. 665–82, 2005.

FRANCO, C.R.; TRINDADE, E.S.; ROCHA, H.A.; SILVEIRA, R.B.; PALUDO, K.S.; CHAMMAS, R.; VEIGA, S.S.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Glycosaminoglycan chains from alpha5beta1 integrin are involved in fibronectin-dependent cell migration. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 87, n. 4, p. 2009, 2009.

FUKUNAGA-KALABIS, M.; HERLYN, M. Beyond ABC: another mechanism of drug resistance in melanoma side population. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 10, p. 2317–2319, 2013.

GANDHI, N. S.; MANCERA, R. L. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. **Chemical Biology & Drug design**, v. 72, n. 6, p. 455–82, 2008.

GARBE, C.; EIGENTLER, T.K.; KEILHOLZ, U.; HAUSCHIKD, A.; KIRKWOOD, J.M. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. **The Oncologist**, v. 16, n. 1, p. 5–24, 2011.

GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. **Journal of Immunological Methods**, v. 94, n. 1-2, p. 57–63, 1986.

GHOSH, S.; BISHAYEE, K.; PAUL, A.; MUKHERJEE, A.; SIKDAR, S.; CHAKRABORTY, D.; BOUJEDAINI, N.; KHUDA-BUKHSH, A.R. Homeopathic mother tincture of Phytolacca decandra induces apoptosis in skin melanoma cells by activating caspase-mediated signaling via reactive oxygen species elevation. **Journal of Integrative Medicine**, v. 11, n. 2, p. 116–24, 2013.

GILLIES, R. J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. **Analytical Biochemistry**, v. 159, n. 1, p. 109–13, 1986.

GODOY, L.C.; ANDERSON, C.T.M.; CHOWDHURY, R.; TRUDEL, L.J.; WOGAN, G.N. Endogenously produced nitric oxide mitigates sensitivity of melanoma cells to cisplatin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 50, p. 20373–8, 2012.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851–7, 2007.

GUIMARÃES, F.S.F. **Potencial anti-melanoma de complexos imunomodulatórios homeopáticos**. Curitiba, 2009, 102 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

GUIMARÃES, F.S.F.; ABUD, A.P.R.; OLIVEIRA, S.M.; OLIVEIRA, C.C.; CÉSAR, B.; ANDRADE, L.F.; DONATTI, L.; GABARDO, J.; TRINDADE, E.S.; BUCHI, D.F. Stimulation of lymphocyte anti-melanoma activity by co-cultured macrophages activated by complex homeopathic medication. **BMC Cancer**, v. 9, p. 293, 2009.

GUIMARÃES, F.S.F.; ANDRADE, L.F.; MARTINS, S.T.; ABUD, A.P.R.; SENE, R.V. In vitro and in vivo anticancer properties of a *Calcearia carbonica* derivative complex (M8) treatment in a murine melanoma model. **BMC Cancer**, v. 10, p. 113, 2010.

HAASS, N.K; HERLYN, M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. **The Society for Investigative Dermatology**, v. 10, n. 2, p. 153-163, 2005

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.

HEARING, V. J. Determination of melanin synthetic pathways. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. E1, p. E8–E11, 2011.

HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science (New York, N.Y.)**, v. 235, n. 4787, p. 473–6, 1987.

HIROBE, T. How are proliferation and differentiation of melanocytes regulated? **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 24, n. 3, p. 462–78, 2011.

HO, M.; KIM, H. Glypican-3: a new target for cancer immunotherapy. **European Journal of Cancer**, v. 47, n. 3, p. 333–338, 2012.

HOFMANN, U.B.; WESTPHAL, J.R.; MUIJEN, G.N.P.; RUITER, D.J. Matrix metalloproteinases in human melanoma. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 3, p. 337–44, 2000.

HOFMANN, U.B.; HOUBEN, R.; BROKER, E.B.; BECKER, J.C. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. **Biochimie**, v. 87, n. 3-4, p. 307–14, 2005.

HONSOVÁ, E.; LODEREROVÁ, A.; FRANKÓVA, S.; OLIVERIUS, M.; TRUNECKA, P. Glypican-3 immunostaining significantly improves histological diagnosis of hepatocellular carcinoma. **Casopis lékařů českých**, v. 150, n. 1, p. 37–40, 2011.

HUANG, H.C.; HSIEH, W.Y.; NIU, Y.L.; CHANG, T.M. Inhibition of melanogenesis and antioxidant properties of *Magnolia grandiflora* L. flower extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 1, p. 72, 2012.

HUHTALA, M. T.; PENTIKÄINEN, O. T.; JOHNSON, M. S. A dimeric ternary complex of FGFR [correction of FGFR1], heparin and FGF-1 leads to an “electrostatic sandwich” model for heparin binding. **Structure (London, England : 1993)**, v. 7, n. 6, p. 699–709, 1999.

IBRAHIM, N.; HALUSKA, F. G. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. **Annual Review of Pathology**, v. 4, p. 551–79, 2009.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). **Incidência 2012**: Estimativa de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2011.

IOZZO, R. V.; SANDERSON, R. D. Proteoglycans in cancer biology, tumor microenvironment and angiogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 5, p. 1013–1031, 2011.

JEMAL, A.; BRAY, F.; FERLAY, J. Global Cancer Statistics. v. 61, n. 2, p. 69–90, 2011.

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

KANG, Y.G.; CHOI, E.J.; CHOI, Y.; HWANG, J.K. 5,7-dimethoxyflavone induces melanogenesis in B16F10 melanoma cells through cAMP-dependent signalling. **Experimental Dermatology**, v. 20, n. 5, p. 445–7, 2011.

KIM, A.; KIM, M.J.; YANG, Y.; KIM, J.W.; YEOM, Y.I.; LIM, J.S. Suppression of NF- κ B activity by NDRG2 expression attenuates the invasive potential of highly malignant tumor cells. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 6, p. 927–936, 2009.

KIRKWOOD, J.M.; BUTTERFIELD, L.H.; TARHINI, A.A.; ZAROOUR, H.; KALINSKI, P.; FERRONE, S. Immunotherapy of Cancer in 2012. **CA: A Journal Cancer for Clinicians**, v. 62, n. 5, p. 309–335, 2012.

KLEEFF, J.; ISHWATA, T.; KUMBASAR, A.; FRIESS, H.; BUCHLER, M.W.; LANDER, A.D.; KORC, M. The cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulates growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 9, p. 1662–73, 1998.

KOJIMA, H.; NAKATSUBO, N.; KIKUCHI, K.; KAWAHARA, S.; KIRINO, Y.; NAGOSHI, H.; HIRATA, Y.; NAGANO, T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 13, p. 2446–53, 1998.

LEE, D.H.; KIM, D.H.; OH, I.Y.; KIM, S.Y.; LIM, Y.Y.; KIM, H.M.; KIM, Y.H.; CHOI, Y.M.; KIM, S.E.; KIM, B.J.; KIM, M.N. Inhibitory effects of *Saururi chinensis* extracts on melanin biosynthesis in B16F10 melanoma cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 5, p. 772–9, 2013.

LEE, J.; PARK, H.; CHUNG, H.; CHOI, S.; KIM, Y.; YOO, H.; KIM, T.Y.; HANN, H.J.; SEONG, I.; KIM, J.; KANG, K.G.; HAN, I.C.; OH, E.S. Syndecan-2 regulates the migratory potential of melanoma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 40, p. 27167–75, 2 out. 2009.

LI, M.; SONG, L.; QIN, X. Glycan changes: cancer metastasis and anti-cancer vaccines. **Journal of Biosciences**, v. 35, n. 4, p. 665–673, 2010.

LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–33, 2007.

LINDAHL, U.; LIDHOLT, K.; SPILLMANN, D.; KJELLÉN, L. More to “heparin” than anticoagulation. **Thrombosis Research**, v. 75, n. 1, p. 1–32, 1994.

LOPES, L.; GODOY, L.M.F.; OLIVEIRA, C.C.; GABARDO, J.; SCHADECK, R.J.G.; BUCHI, D.F. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Micron (Oxford, England : 1993)**, v. 37, n. 3, p. 277–87, 2006.

LOPES, C.C.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 2, p. 157-167, 2006.

LUANPITPONG, S.; TALBOTT, S.J.; ROJANASAKUL, Y.; NIMMANNIT, U.; PONGRAKHANANON, V.; WANG, L.; CHANVORACHOTE, P. Regulation of lung cancer cell migration and invasion by reactive oxygen species and caveolin-1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 50, p. 38832–40, 2010.

MADONNA, G.; ULLMAN, C.D.; GENTILCORE, G.; PLAMIEIR, G.; ASCIERTO, P.A. NF- κ B as potential target in the treatment of melanoma. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 53, 2012.

MARTÍ, R. M.; SOROLLA, A; YERAMIAN, A. New therapeutic targets in melanoma. **Actas Dermo-sifilográficas**, v. 103, n. 7, p. 579–90, 2012.

MARTINS, J.R.; 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.

MATTHEWS, N.E.; ADAMS, M.A.; MAXWELL, L.R.; GOFTON, T.E.; GRAHAM, C.H. Nitric Oxide-Mediated Regulation of Chemosensitivity in Cancer Cells. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 6, p. 1879–1885, 2001.

MCMANUS, B. J. F. A.; CASON, A. J. E. Carbohydrate histochemistry studied by acetylation techniques. **Carbohydrate Histochemistry**, I, p. 651–655, 1950.

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

MEIERJOHANN, S. Oxidative stress in melanocyte senescence and melanoma transformation. **European Journal of Cell Biology**, 2013.

MILAZZO, S.; RUSSELL, N.; ERNST, E. Efficacy of homeopathic therapy in cancer treatment. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 3, p. 282–9, fev. 2006.

MISKO, T.P.; SCHILLING, R.J.; SALVEMINI, D.; MOORE, W.M.; CURRIE, M.G. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. **Analytical Biochemistry**, v. 214, p. 11–16, 1993.

MIZUMOTO, S.; SUGAHARA, K. Glycosaminoglycans are functional ligands for receptor for advanced glycation end-products in tumors. **The FEBS Journal**, v. 280, n. 10, p. 2462–70, 2013.

MOLASSIOTIS, A.; ORTEGA, P.F.; PUD, D.; OZDEN, G.; SCOTTS, J.A.; PANTELI, V.; MARGULIES, A.; BROWALL, M.; MAGRI, M.; SEKVEKEROVA, S.; MADSEN, E.; MILOVICS, L.; BRUYNS, I.; GUDMUNSDOTTIR, G.; HUMMERSTON, S.; AHMADA, A.M.A.; PLATIN, N.; KEARNEY, N.; PATIRAKI, E. Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey. **Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 16, n. 4, p. 655–63, 2005.

MONTFORT, H. Education and debate: A new homeopathic approach to neoplastic diseases: from cell destruction to carcinogen- induced apoptosis. **British Homeopathic Journal**, p. 78–83, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

NAKATSURA, T.; NISHIMURA, Y. Usefulness of the novel oncofetal antigen glypican-3 for diagnosis of hepatocellular carcinoma and melanoma. **BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy**, v. 19, n. 2, p. 71–7, 2005.

NISHIKAWA, M. Reactive oxygen species in tumor metastasis. **Cancer Letters**, v. 266, n. 1, p. 53–9, 2008.

O'CONNELL, M.P.; FIORI, J.L.; KERSHNER, E.K.; FRANK, B.P.; INDIG, F.E.; TAUB, D.D.; HOEK, K.S.; WEERARATNA, S.T. Heparan sulfate proteoglycan

modulation of Wnt5A signal transduction in metastatic melanoma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 42, p. 28704–12, 2009.

OLIVEIRA, C.C.; OLIVEIRA, S.M.; GODOY, L.M.F.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Canova, a Brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. **The Journal of infection**, v. 52, n. 6, p. 420–32, 2006.

OLIVEIRA, C.C.; OLIVEIRA, S.M.; GOES, V.M.; PROBST, C.M.; KRIEGER, M.A.; BUCHI D.F. Gene expression profiling of macrophages following mice treatment with an immunomodulator medication. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 104, n. 4, p. 1364–77, 2008.

OLIVEIRA, C.C.; ABUD, A.P.R; OLIVEIRA, S.M.; GUIMARÃES, F.S.F.; ANDRADE, L.F.; DI BERNARDI, R.P.; COLETTI, E.L.O.; KUCZERA, D.; 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, n. 1, p. 101, 2011.

ORECCHIA, P.; CONTE, R.; BALZA, E.; PETRETTO, A.; MAURI, Q.; MINGARI, M.C.; CARNEMOLLA, B. A novel human anti-syndecan-1 antibody inhibits vascular maturation and tumour growth in melanoma. **European Journal of Cancer**, v. 49, n. 8, p. 2022–33, 2013.

OTT, M.; GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOOVSKY, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis: an international journal on programmed cell death**, v. 12, n. 5, p. 913–22, 2007.

PALMIERI, G.; CAPONE, M.; ASCIERTO, A.L.; GENTILCORE, G.; STROCEK, D.F.; CASULA, M.; SINI, M.C.; PALLA, M.; MOZZILLO, N.; ASCIERTO, P.A. Main roads to melanoma. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, p. 86, 2009.

PASCO, S.; RAMONT, L.; MAQUART, F.X.; MONBOISSE, J.C. Control of melanoma progression by various matrikines from basement membrane macromolecules. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 49, n. 3, p. 221–33, 2004.

PIEMONTE, M.R.; BUCHI, D.F. Analysis of IL-2, IFN-gamma and TNF-alpha production, alpha5 beta1 integrins and actin filaments distribution in peritoneal mouse macrophages treated with homeopathic medicament. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 34, n. 3, p. 255–63, 2002.

PINON, A.; LIMAMI, Y.; MICALLEF, L.; MOREAU, J.; LIAGRE, B.; DELAGE, C.; DUVAL, R.E.; SIMON, A. A novel form of melanoma apoptosis resistance: melanogenesis up-regulation in apoptotic B16-F0 cells delays ursolic acid-triggered cell death. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 12, p. 1669–76, 2011.

PREETHI, K.; ELLANGHIYIL, S.; KUTTAN, G.; KUTTAN, R. Induction of apoptosis of tumor cells by some potentiated homeopathic drugs: implications on mechanism of action. **Integrative Cancer Therapies**, v. 11, n. 2, p. 172–82, 2012.

PRICE, M.A.; WANSHURA, L.E.C.; YANG, J.; CARLSON, J.; XIANG, B.; LI, G.; FERRONE, S.; DUDEK, A.Z.; TURLEY, E.A.; MCCARTHY, J.B. CSPG4, a potential therapeutic target, facilitates malignant progression of melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 24, n. 6, p. 1148–1157, 2012.

REGAD, T. Molecular and cellular pathogenesis of melanoma initiation and progression. **Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS**, v. 70, n. 21, p. 4055–65, 2013.

REILAND, J.; SANDERSON, R.D.; WAGUESPACK, M.; BARKER, S.A.; LONG, R.; CARSON, D.D.; MARCHETTI, D. Heparanase degrades syndecan-1 and perlecan heparan sulfate: functional implications for tumor cell invasion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 9, p. 8047–55, 2004.

RIGEL, D. S.; CARUCCI, J. A. Malignant melanoma: prevention, early detection, and treatment in the 21st century. **CA: Cancer Journal for Clinicians**, v. 50, n. 4, p. 215–36; quiz 237–40, 2000.

ROMÉRO-GRILLET, C.; ABERDAM, E.; BIAGOLI, N.; MASSABNI, W.; ORTONNE, J.P.; BALLOTTI, R. Cell Biology and Metabolism: Ultraviolet B Radiation Acts through the Nitric Oxide and cGMP Signal Transduction Pathway to Stimulate Melanogenesis in Human Melanocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, p. 8–13, 1996.

RONOT, X.; BENEL, L.; ADOLPHE, M.; MOUNLOU, J.C. Mitochondrial analysis in living cells: the use of rhodamine 123 and flow cytometry. **Bioogy of the Cell**, v. 57, p. 1–7, 1986.

ROTHWEILER, F.; MICHAELIS, M.; BRAUER, P.; OTTE, J.; WEBER, K.; FESHE, B.; DOERR, H.W.; WIESSE, M.; KREUTER, J.; AL-ABED, Y.; NICOLETI, F. CINATL, J. Anticancer Effects of the Nitric Oxide – Modified Saquinavir Derivative Saquinavir-NO against Multidrug-Resistant. **Neoplasia**, v. 12, n. 12, p. 1023–1030, 2010.

SAHA, S.; HOSSAIN, D.M.S.; MUKHERJEE, S.; MOHANTY, S.; MAZUMDAR, M.; MUKHERJEE, S.; GHOSH, U.K.; NAYEK, C.; RAVEENDAR, C.; KHURANA, A.; CHAKRABARTY, R.; SA, GAURISANKAR, S.; DAS, Y. Calcarea carbonica induces apoptosis in cancer cells in p53-dependent manner via an immuno-modulatory circuit. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 230, 2013.

SAMADDER, A.; DAS, S.; DAS, J.; PAUL, A.; BOUJEDAINI, N.; KHUDA-BUKHSH, A.R. The potentized homeopathic drug, Lycopodium clavatum (5C and 15C) has anti-cancer effect on hela cells in vitro. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 6, n. 4, p. 180–7, 2013.

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.Y.O.; WAL, R.; OLIVEIRA, C.C.; CATTANEO, R.I.I.; MALVEZZI, M.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic medication. **Homeopathy**, v. 94, n. 1, p. 26–32, 2005.

SAWADA, Y.; SAKAI, M.; YOSHIKAWA, T.; OFUJI, K.; NAKATSURA, T. A glypican-3-derived peptide vaccine against hepatocellular carcinoma. **Oncoimmunology**, v. 1, n. 8, p. 1448–1450, 2012.

SAWADA, Y.; NAKATSURA, T. The cancer specific antigen, glypican-3 (GPC3)-targeted immunotherapy. **Nihon rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine**, v. 70, n. 12, p. 2136–41, 2012.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–8, 2008.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer Statistics , 2013. v. 63, n. 1, p. 11–30, 2013.

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. 383–91, 2011.

SLOMINSKI, A.; TOBIN, D.J.; SHIBAHARA, S.; WORTSMAN, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 4, p. 1155–228, 2004.

SONG, H. H.; FILMUS, J. The role of glypicans in mammalian development. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1573, n. 3, p. 241–6, 19 dez. 2002.

SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SAOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; KONDOH, H.; LLEONART, M.E.. Oxidative stress and cancer: an overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 376–90, 2013.

SOUNNI, N.E.; DEVY, L.; HAJITOU, A.; FRANKENNE, F.; MUNAUT, C.; GILLIES, C.; DEROANNE, C.; THOMPSON, E.W.; FOIDART, F.; NOEL, A. MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. **FASEB journal**, v. 16, n. 6, p. 555–64, 2002.

STONEMAN, P.; STURGIS, P.; ALLUM, N.; SIBLEY, E. Incommensurable worldviews? Is public use of complementary and alternative medicines incompatible with support for science and conventional medicine? **PloS One**, v. 8, n. 1, 2013.

SUN, J. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases are essential for the inflammatory response in cancer cells. **Journal of Signal Transduction**, v. 2010, p. 985132, 2010.

SUNILA, E.S.; KUTTAN, R.; PREETHI, K.C.; KUTTAN, G. Dynamized preparations in cell culture. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 6, n. 2, p. 257–63, 2009.

TÉTAU, M. Hahnemann: Muito Além da genialidade. São Paulo: Editora Organon, 2001.

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

TOCHHAWNG, L.; DENG, S.; PERVAIZ, S.; YAP, C.T. Redox regulation of cancer cell migration and invasion. **Mitochondrion**, v. 13, n. 3, p. 246–53, 2013.

TRINDADE, E.S. **Caracterização do mecanismo de estímulo da síntese do proteoglicano de heparam sulfato em células endoteliais, pela heparina**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2004.

TROTTER, S.C.; SROA, N.; WINKELMANN, R.R.; OLENCKI, T.; BECHTEL, M. A global review of melanoma follow-up guidelines. **The Journal Clinical Aesthetic Dermatology**, v. 6, n. 9, p. 18–26, 2013.

VALENTE, P.; FASSINA, G.; MELCHIORI, A.; MASIELO, L.; CILLI, M.; VACCA, A.; ONISTO, M.; SANTI, L.; STEVENSON, W.G.S.; ALBINI, A. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. **International Journal of Cancer**, v. 75, n. 2, p. 246–53, 1998.

VANDESOMPELE, J.; PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; ROY, N.V.; PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, 2002.

VICKERS, A.; ZOLLMAN, C. ABC of complementary medicine: Homeopathy. **British Medical Journal**, p. 1115–1118, 1999.

VIKSVEEN, P.; DYMITR, Z.; SIMOENS, S. Economic evaluations of homeopathy: a review. **The European journal of health economics : HEPAC : health economics in prevention and care**, 2013.

VISVADER, J. E. Cells of origin in cancer. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 314–22, 2011.

VOELCKER, V.; GEBHARDT, C.; AVERBECK, M.; SAALBACH, A.; WOLF, V.; WEIH, F.; SLEEMAN, J.; ANDEREGG, U.; SIMON, J. Hyaluronan fragments induce cytokine and metalloprotease upregulation in human melanoma cells in part by signalling via TLR4. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 2, p. 100–7, 2008.

WAISSE, S. The science of high dilutions in historical context. **Homeopathy : the journal of the Faculty of Homeopathy**, v. 101, n. 2, p. 129–37, 2012.

WALSH, N.; KENNEDY, S.; LARKIN, A.M.; EUSTACE, A.J.; MAHGOUB, T.; CONWAY, C.; OGLESBY, I.; COLLINS, D.; BALLOT, J.; OOI, W.S.; GULLO, G.; CLYNES, J.; CROWN, J.; O'DRISCOLL, L. Membrane transport proteins in human melanoma: associations with tumour aggressiveness and metastasis. **British Journal of Cancer**, v. 102, n. 7, p. 1157–62, 2010.

WANG, H.H.; MCINTOSH, A.R.; HASINOFF, B.B.; RECTOR, E.S.; AHMED, N.; NANCE, D.M.; ORR, F.W. B16 Melanoma Cell Arrest in the Mouse Liver Induces Nitric Oxide Release and Sinusoidal Cytotoxicity: A Natural Hepatic Defense against Metastasis. **Cancer Research**, p. 5862–5869, 2000.

WHITTAKER, J. R. Changes in Melanogenesis During the Dedifferentiation of Chick Retinal Pigment Cells in Cell Culture. **Developmental Biology**, v. 8, p. 99–127, 1963.

WILLENBERG, A.; SAALBACH, A.; SIMON, J.C.; ANDEREGG, U. Melanoma cells control HA synthesis in peritumoral fibroblasts via PDGF-AA and PDGF-CC: impact on melanoma cell proliferation. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 2, p. 385–93, 2012.

World Health Organization (WHO). **World Cancer Report 2008**. Lyon, 2008.

WRIGHT, C. S. Structural comparison of the two distinct sugar binding sites in wheat germ agglutinin isolectin II. **Journal of Molecular Biology**, v. 178, n. 1, p. 91–104, 1984.

XU, W.; LIU, L.Z.; LOIZIDOU, M.; AHMED, M.; CHARLES, I.G. The role of nitric oxide in cancer. **Cell Research**, v. 12, n. 5-6, p. 311–20, 2002.

YANG, Y.; PARK, H.; YANG, Y.; KIM, T.S.; BANG, A.I.; CHO, D. Enhancement of cell migration by corticotropin-releasing hormone through ERK1/2 pathway in murine melanoma cell line, B16F10. **Experimental Dermatology**, v. 16, n. 1, p. 22–7, 2007.

ZBYTEK, B., CARLSON, J.A.; GRANESE, J.; ROSS, J.; MIHIM, M.C.; SLOMINSKI, A. Currents concepts of metastasis in melanoma. **Expert Review of Dermatology**, v. 3, n. 5, p. 569–585, 2009.

ZHAO, W.; LIU, H.; XU, S.; ENTSCHLADEN, F.; NIGGEMANN, B.; ZAENKER, K.S.; HAN, R. Migration and metalloproteinases determine the invasive potential of mouse melanoma cells, but not melanin and telomerase. **Cancer Letters**, v. 162 Suppl, p. S49–S55, 2001.

ZHOU, J.; SHANG, J.; PING, F.; ZHAO, G. Alcohol extract from *Vernonia anthelmintica* (L.) willd seed enhances melanin synthesis through activation of the p38 MAPK signaling pathway in B16F10 cells and primary melanocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 639–47, 2012.