

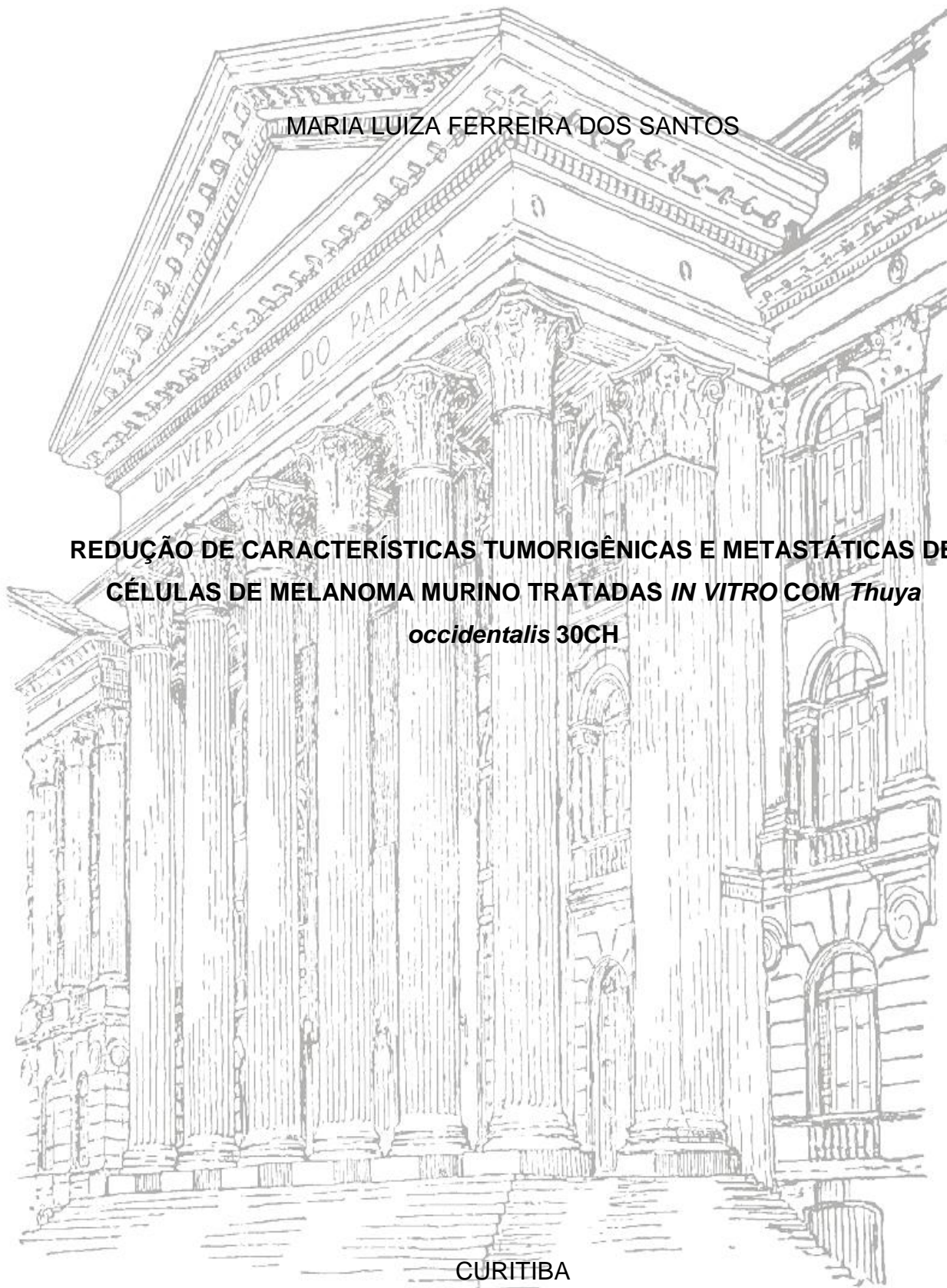
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA LUIZA FERREIRA DOS SANTOS

**REDUÇÃO DE CARACTERÍSTICAS TUMORIGÊNICAS E METASTÁTICAS DE
CÉLULAS DE MELANOMA MURINO TRATADAS *IN VITRO* COM *Thuya*
occidentalis 30CH**

CURITIBA

2016



MARIA LUIZA FERREIRA DOS SANTOS

**REDUÇÃO DE CARACTERÍSTICAS TUMORIGÊNICAS E METASTÁTICAS DE
CÉLULAS DE MELANOMA MURINO TRATADAS *IN VITRO* COM *Thuya*
occidentalis 30CH**

Monografia apresentada como requisito à conclusão do Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

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

Coorientadora: Jenifer Pendiuk Gonçalves
Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA

2016

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antonia Ferreira e Jair Lima dos Santos, que sempre dedicaram tudo para a minha felicidade e sempre pensaram no meu futuro, me dando o melhor aprendizado, muita atenção e carinho, e acima de tudo muito amor e paciência. Muito obrigada pela ajuda, apoio e presença de vocês na minha vida, amo muito vocês!

A minha prima Jéssica Louize dos Santos Buiar, que é uma irmã para mim e apoia todos os meus passos, você é meu orgulho, e meu exemplo de superação e dedicação.

Ao Lucas José Albieri, meu namorado que me ajudou muito principalmente quando o cansaço começou a virar rotina, sempre ao meu lado, me alegrando e me ajudando a superar as dificuldades. Obrigada por toda a ajuda, atenção, amor, alegrias, chocolates e abraços.

A minha orientadora Carolina Camargo de Oliveira, pelos quase quatro anos de orientação, pela paciência, atenção, dedicação e confiança. Aprendi e aprendo todos os dias com você, um exemplo de professora dedicada e amiga, pela qual tenho muito orgulho de ter como orientadora.

A Jenifer Pendiuk Gonçalves, que sempre me ensinou tudo dentro do laboratório, com muita didática, atenção e carinho. Obrigada por todos os ensinamentos, você é meu exemplo de pesquisadora (e professora).

A todos os professores e amigos do laboratório, Prof^a Célia e Prof Edvaldo, Gustavo, Daniel, Ana, Thais, Stellee, Francine, Maíra, Fernanda e Israel, que sempre estiveram dispostos em ajudar, e principalmente ensinar, nosso grupo é demais!

A Tabatinha, que me acompanha desde o primeiro dia de aula e sempre pudemos nos apoiar uma à outra, obrigada pela parceria, amizade, e momentos de alegrias que tivemos (que são muitos), te amo batata!

A Vivi, que tive o prazer de me aproximar agora no final do curso, a sua presença fez o trabalho ser muito mais leve e divertido, além de ter feito a gentileza de me emprestar o notebook nos últimos dias do prazo de entrega da monografia, muito obrigada por todo o seu carinho e amizade.

A todos os amigos que estiveram juntos no decorrer do tempo principalmente Luana, Thalita, Palominha, que ajudaram em todas as dificuldades e estiveram nos momentos mais alegres, se não fosse por vocês, boa parte do curso teria sido muito mais difícil.

A banca avaliadora, Prof^a Dr^a Mariana da Rocha Piemonte e Prof^a Dr^a Francine Bittencourt Potrich, por aceitarem corrigir minha monografia e auxiliarem no meu desenvolvimento científico.

A Universidade Federal do Paraná, a todos os professores e servidores, pela oportunidade de realizar o curso de Ciências Biológicas, e por todos os funcionários que auxiliaram na minha formação acadêmica.

A Farmácia de Manipulação Homeoterápica, pela manipulação dos medicamentos e por gentilmente doarem os mesmos para a pesquisa.

A Dr^a Luciane Ganiko, responsável pelo equipamento ImageXpress Micro® High Content Screening (Molecular Devices), por realizar gentilmente a análise dos dados.

A todas as agências financiadoras, em especial a UFPR/Tesouro Nacional, que me concedeu a bolsa de iniciação científica em paralelo com o desenvolvimento da monografia.

RESUMO

O melanoma é o câncer de pele mais agressivo e surge da transformação dos melanócitos. As células apresentam alto potencial metastático, manipulam o sistema imunológico a seu favor e se camuflam, impossibilitando sua detecção e expulsão. Os tratamentos atuais não são completamente efetivos e causam efeitos colaterais, por isso há a necessidade de novos tratamentos. Compostos naturais altamente diluídos não agredem o organismo e são opções viáveis no tratamento do câncer. O objetivo do trabalho é avaliar o efeito do composto natural altamente diluído *Thuya occidentalis* 30CH (Thuya 30CH), em células de melanoma murino (B16-F10), com foco em analisar características e funcionalidades das células, além de possíveis ações antimetastáticas e antitumorígenicas. Além disso, verificar a citotoxicidade e viabilidade de células normais (Balb/3T3). Com esses objetivos, células foram plaqueadas e cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium, 10% de Soro Fetal Bovino, penicilina 100U/ml, estreptomicina 100µg/ml, e mantidas a 37°C, 5% CO₂. Foram tratadas ou não com 20% (v/v) da solução teste (Thuya 30CH), ou veículo (água), e com reforço de 1% (v/v) a cada 24h, por 72h de tratamento. Foram analisadas a proliferação celular através do ensaio de cristal violeta e a produção de melanina pelo ensaio de melanogênese. Além disso, foi realizada a marcação com a sonda fluorescente DCFH-DA para detecção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) e DAF-FM para de nitrogênio (óxido nítrico - NO). A capacidade de retenção de vermelho neutro em vesículas ácidas foi analisada, assim como a atividade mitocondrial através do teste de MTT e o potencial de membrana mitocondrial foi verificado através do ensaio com JC-1. A morte celular foi verificada através de citometria de fluxo com os marcadores anexina/7AAD, e o ciclo celular com solução de PI/RNase. Foram analisadas por imunomarcação as moléculas de superfície CD44 e N-caderina, importantes para migração e invasão. Além disso, foi realizado o ensaio de formação de colônias utilizando matriz 3D de alginato. Thuya 30CH mostrou-se promissor no combate ao melanoma, diminuindo a proliferação, aumentando a produção de melanina e a concentração de ROS intracelular. O tratamento não alterou os parâmetros de funcionalidades testados, não foi possível detectar mudanças na integridade mitocondrial, na produção de NO e foi observado que não ocorre nenhum tipo de morte celular decorrente do tratamento. Houve diferenças significativas nas fases do ciclo celular, o que pode significar que o tratamento esteja deixando o ciclo mais lento e por isso diminuindo a proliferação celular. A expressão de N-caderina foi diminuída pelo tratamento, e Thuya 30CH diminuiu o número de colônias formadas em ensaio *in vitro*, demonstrando promissor potencial antitumoral e antimetastático. Conclui-se que o composto testado é eficaz contra células de melanoma, diminuindo seu poder proliferativo e suas características metastáticas e tumorigênicas.

Palavras-chave: Altas diluições. B16-F10. Citotoxicidade. Estresse oxidativo. Formação de colônia. *Thuya occidentalis* 30CH.

ABSTRACT

Melanoma is the most aggressive skin cancer and arises from melanocytes transformation. These cells have a high metastatic potential, and manipulate the immune system in its advantage turning into unlikely its detection and elimination. Treatments used nowadays are not as effective as it should be, and present several side effects. Thus there is an urgent need for new treatments. Highly diluted natural compounds do not harm the body and are viable options to treat cancer. This work aims to evaluate the effects of the natural compound highly diluted *Thuja occidentalis* 30CH (Thuja 30CH) on murine melanoma cells (B16-F10), focusing on analyzing tumor cell features and functionality related to metastasis and tumorigenesis. Also, cytotoxicity and viability of normal cells (Balb/3T3) were verified. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium, 10% fetal bovine serum, penicillin 100U/ml, streptomycin 100µg/ml, and kept at 37°C, 5% CO₂. The cells were treated or not with 20% (v/v) of the tested solution or vehicle (water), with 1% (v/v) of additional treatment every 24 hours for up to 72h. Cell proliferation was assessed by crystal violet assay and melanogenesis by melanin detection assay. In addition, the fluorescent probe DCFH-DA was used for intracellular reactive oxygen species (ROS) detection, and DAF-FM for nitric oxide (NO) detection. Lysosomal neutral red retention capacity and mitochondrial activity by the MTT assay were analyzed. Mitochondrial membrane potential was checked by JC-1 assay. Cell death was verified by flow cytometry with Annexin/7AAD, and cell cycle with PI/RNase solution. Immunostaining of CD44 and N-cadherin surface molecules, important for migration and invasion, were also performed. In addition, the capacity of colony formation was detected using a 3D alginate matrix. Thuja 30 CH showed to be a promising agent against melanoma, decreasing cell proliferation, increasing melanin production, and intracellular concentration of ROS. The treatment did not affect cells functionality parameters, as well as mitochondrial integrity, and NO production. Even though no cell death was observed, there was a significant change in cell cycle phases. The treatment was able to slow down the cell cycle, thus reducing cell proliferation. N-cadherin expression was decreased by the treatment, as well as the number of colonies formed *in vitro*. Together, the results showed that Thuja 30CH is effective against melanoma cells, reducing cells proliferative capacity, in addition to tumorigenic and metastatic features.

Keywords: High dilutions. B16-F10. Cytotoxicity. Oxidative Stress. Colony formation. *Thuja occidentalis* 30 CH.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	CÂNCER	11
2.1.1	<i>Melanoma.....</i>	13
2.1.2	<i>Tratamentos convencionais para melanoma</i>	15
2.2	COMPOSTOS NATURAIS ALTAMENTE DILUÍDOS.....	18
2.2.1	<i>Thuya occidentalis 30CH.....</i>	21
3	JUSTIFICATIVA.....	25
4	OBJETIVOS	26
4.1	OBJETIVO GERAL.....	26
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
5.1	CULTURA DE CÉLULAS - <i>IN VITRO</i>	27
5.1.1	<i>Cultura de células tumorais</i>	27
5.1.2	<i>Cultura de células não tumorais</i>	28
5.2	COMPOSTO NATURAL ALTAMENTE DILUÍDO	28
5.3	TRATAMENTO <i>IN VITRO</i>	28
5.4	CRISTAL VIOLETA – PROLIFERAÇÃO CELULAR	29
5.5	MELANOGÊNESE – PRODUÇÃO DE MELANINA	29
5.6	DETECÇÃO DE ROS INTRACELULAR	30
5.7	VERMELHO NEUTRO – ATIVIDADE LISOSSOMAL	30
5.8	MTT – ATIVIDADE MITOCONDRIAL	31
5.9	POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi M$)	32
5.10	MORTE CELULAR	33

5.11	CICLO CELULAR	33
5.12	IMUNOMARCAÇÕES PARA CITOMETRIA DE FLUXO E TRIAGEM DE ALTO RENDIMENTO	34
5.13	ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM ALGINATO.....	35
5.14	DETECÇÃO DE RNS INTRACELULAR.....	36
5.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
6	RESULTADOS.....	38
7	DISCUSSÃO	55
8	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1 INTRODUÇÃO

O melanoma é um tipo de câncer de pele cuja incidência vem aumentando a cada ano em todo o mundo. É altamente maligno e apresenta um dos maiores índices de metástase dentre os cânceres conhecidos. (HOLMES, 2014). A cirurgia é o tratamento mais utilizado no estágio inicial da doença, porém quando ocorre metástase, ou seja, quando células malignas migram pelos vasos sanguíneos ou linfáticos e invadem outros tecidos formando novas colônias, a remoção cirúrgica não é capaz controlar o câncer que já atingiu esse estágio de progressão. Nesse caso, os especialistas recorrerem à quimioterapia como forma de tratamento utilizando drogas que são capazes de prevenir a proliferação celular e progressão dessa doença. (ATALLAH; FLAHERTY, 2005).

Há muita dificuldade de se desenvolver tratamentos que sejam específicos para combater as células de melanoma devido principalmente ao fato de as células tumorais residirem em tecidos saudáveis. Sendo assim, os tratamentos atuais geralmente são pouco eficazes quando a doença se encontra em estágio metastático, proporcionando vários efeitos colaterais, comprometendo a qualidade de vida do paciente, (MARTÍ; SOROLLA; YERAMIAN, 2012) e ainda, não levando à cura. (BHATIA, TYKODI e THOMPSON, 2009). Por ser tão resistente, e prejudicar tanto a qualidade de vida de portadores da doença, o melanoma tem sido cada vez mais estudado e utilizado como modelo de pesquisa em todo o mundo, as quais buscam desenvolver e analisar alternativas para o tratamento desse câncer. (BHATIA, TYKODI e THOMPSON, 2009). Dessa forma, há a necessidade de se pesquisar e testar novos tratamentos que possam melhorar a qualidade de vida de pacientes portadores de melanoma, os quais possam combater de maneira mais fácil e eficaz esse tipo de neoplasia maligna, ou que, até mesmo, venham a aumentar a capacidade de defesa do próprio organismo, fortalecendo-o e combatendo as células cancerosas.

Os compostos naturais altamente diluídos estão incluídos na gama de tratamentos utilizados na medicina integrativa que estão sendo testados, pelo fato marcante de normalmente não demonstrarem efeitos colaterais. (BETTI, 2013). Esses podem ser formulados com extratos de origem vegetal, animal ou mineral

que sejam considerados úteis para determinados sintomas ou doença. Diversas observações clínicas demonstram o sucesso de tratamentos com esse tipo de compostos, uma vez que levam o organismo a responder positivamente a diferentes condições patológicas. Compostos naturais altamente diluídos são utilizados por muitos pacientes para tratamento de diferentes doenças, desde problemas mais simples como resfriados, febres e lesões cutâneas, até enfermidades mais complexas, como infecções por patógenos e neoplasias. (BELL; KOITHAN, 2012).

Vários estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstram resultados relevantes utilizando compostos e complexos naturais altamente diluídos, que foram capazes de modificar a resposta imunológica. Foi observado que compostos e complexos naturais altamente diluídos ativam células do sistema imunológico tanto *in vitro* quanto *in vivo*, melhorando a imunidade celular e humoral, proporcionando grande proteção ao organismo contra infecções, além de modular a resposta inflamatória, uma vez que levam a redução da produção de citocinas inflamatórias quando simulada uma infecção. (PIEMONTE; BUCHI, 2002; OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011a). Além dessas propriedades, os complexos testados não se mostraram citotóxicos nem mutagênicos nas concentrações utilizadas. (OLIVEIRA et al., 2011b). Estudos utilizando células tumorais também foram realizados na tentativa de analisar se, além de alterar os padrões imunológicos, os compostos e complexos naturais altamente diluídos poderiam modificar aspectos e características intrínsecas do câncer. Sendo assim, em 2005, Sato e colaboradores observaram que o tratamento por 19 dias de camundongos com sarcoma-180 com um complexo natural altamente diluído promoveu redução no tamanho dos tumores, menor ulceração cutânea, além de regular os leucócitos de forma a compensar os efeitos da doença e conter a progressão tumoral. (SATO et al., 2005). Efeitos dos complexos naturais altamente diluídos também foram observados em animais portadores de melanoma (*in vivo*) e em linhagens de melanoma experimentais *in vitro*. O tratamento *in vitro* mostrou melhora da resposta imunológica contra células de melanoma B16-F10, redução da invasão e migração celular além de aumento da adesão celular. (GUIMARÃES et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2010). Em modelos *in vivo* de melanoma, quando os animais eram tratados com os complexos naturais altamente

diluídos, observou-se menor metástase pulmonar e diminuição do volume tumoral em modelo subcutâneo. (GUIMARÃES et al., 2010; ANDRADE et al., 2016). Também foi observado que em culturas de células mononucleares humanas pré-tratadas com o complexo natural altamente diluído denominado M1 e, subsequentemente cocultivadas com células 1205Lu (melanoma humano), tiveram sua capacidade de indução de morte das células tumorais aumentada. (KUCZERA, 2013). Ainda, em pesquisa utilizando os complexos M1 e M8 demonstrou-se a ação direta nas células tumorais através da redução de características fenotípicas metastáticas de células de melanoma murino B16-F10. (POTRICH, 2014; GONÇALVES, 2016). Com todos esses achados, pode-se dizer que compostos e complexos naturais altamente diluídos devem continuar sendo estudados e utilizados a favor do tratamento não só do câncer, mas de diversas patologias, por se mostrarem eficientes em diversos mecanismos biológicos.

Anteriormente, pensava-se que os efeitos antitumorais dos compostos naturais altamente diluídos apresentados, eram consequências apenas da ativação do sistema imunológico, uma vez que há estudos e evidências que comprovam que essa ativação de fato acontece e que é um dos mecanismos responsáveis pelo resultado antitumoral. Porém, hoje se sabe que esses compostos e complexos naturais altamente diluídos também são capazes de atuar diretamente sobre células tumorais o que poderia fazer com que o tratamento fosse ainda mais eficiente, atingindo diretamente as células tumorais e também via sistema imunológico, estimulando o próprio organismo a combatê-las. Neste trabalho foram estudadas funcionalidades e características tumorigênicas e metastáticas intrínsecas de células de melanoma após tratamento com o composto natural altamente diluído *Thuya occidentalis* 30CH.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum a presença de células com crescimento acelerado e características migratórias e invasivas. Como essas células anormais costumam se dividir muito rapidamente, o câncer costuma ser muito agressivo, chegando ao ponto de ser incontrolável. Em geral, nos casos de câncer, após ocorrer o desprendimento das células anormais do tumor primário, essas células migram e invadem outros tecidos formando tumores secundários, num processo denominado de metástase. (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2016). Por outro lado, um tumor quando chamado benigno se apresenta como uma massa localizada de células que também se multiplica de forma anormal e que se assemelha ao seu tecido original, porém apresentando características diferentes das células verdadeiras do tecido em que se encontra. Diferente do tumor maligno, raramente apresenta risco à vida do paciente, uma vez que não apresenta capacidade de realizar metástase. (INCA, 2016).

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). Os motivos e razões que levam ao aparecimento do câncer são extremamente variados e podem ser tanto externos quanto internos ao organismo e podem ainda estar inter-relacionados. As causas internas estão relacionadas com a carga genética pré-determinada para cada indivíduo, a qual dificilmente será alterada. Apesar disso, 80% a 90% dos cânceres estão associados a fatores externos ambientais, como tabagismo, exposição solar, contaminação viral além de componentes alimentícios. (STEWART, 2015). Os hábitos e estilo de vida de cada indivíduo também podem influenciar fortemente no aparecimento do câncer. Dados mostram que em países economicamente desenvolvidos o número de mortes por câncer é maior do que em países em desenvolvimento devido à adoção de estilo de vida com inatividade física, dieta “ocidentalizada” e ao tabagismo, aliados ao envelhecimento da população. (JEMAL, 2011). Ainda, esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais.

Para entender como o câncer surge é preciso entender que uma célula normal pode a qualquer momento sofrer alterações nos genes presentes no DNA. Quando isso ocorre, essas células que tiveram o material genético alterado começam a realizar atividades diferentes e/ou até mesmo perdendo sua capacidade funcional. Proto-oncogenes são genes responsáveis pelo crescimento e diferenciação normais em células, que estão frequentemente envolvidos com a transdução de sinal e com a execução de sinais mitóticos, geralmente através de seus produtos proteicos. (BLAGOSKLONNY, 2003). Caso ocorram alterações sucessivas e acumulativas em proto-oncogenes, esses passam a se chamar oncogenes, uma vez que se tornam responsáveis por iniciar o processo de malignização das células normais (cancerização), podendo levar a formação de um tumor. Os oncogenes fornecem a essas células novas propriedades, que foram descritas como *hallmarks* do câncer. Essas “marcas de identificação” são o crescimento e divisão hiperativa, proteção contra morte celular programada, perda de limites teciduais normais e a habilidade de se tornarem estáveis em diversos ambientes teciduais. Além disso, genes supressores de tumor estão geralmente inativados nas células cancerígenas, auxiliando na perda das funções normais dessas células, como replicação de DNA acurada, controle sobre o ciclo celular, orientação e aderência nos tecidos e interação com as células do sistema imunológico, além de estimular o crescimento dos vasos sanguíneos para fornecer nutrientes aos tumores (angiogênese sustentada) e potencial para migração e invasão de novos tecidos. (HANAHAN, WEINBERG, 2000, 2011). (FIGURA 1).

FIGURA 1 – MARCADORES DE IDENTIFICAÇÃO DO CÂNCER

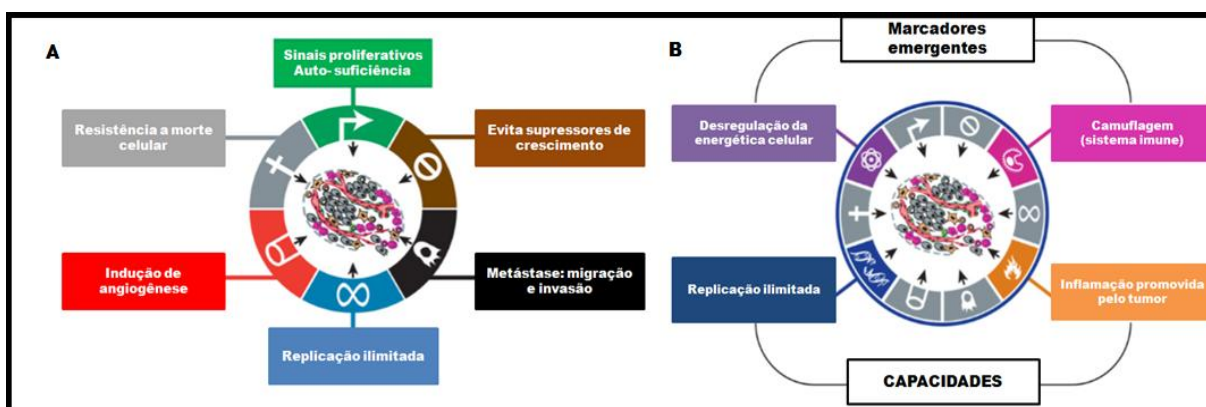


Diagrama que mostra as diferentes capacidades adquiridas durante a progressão do tumor, ou da doença denominada câncer. O diagrama A mostra os marcadores do câncer propostos inicialmente pelos autores em 2000, e o diagrama B mostra as atualizações adicionadas que definem as capacidades tumorais e os marcadores emergentes.

FONTE: adaptado de (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Copyright © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

2.1.1 Melanoma

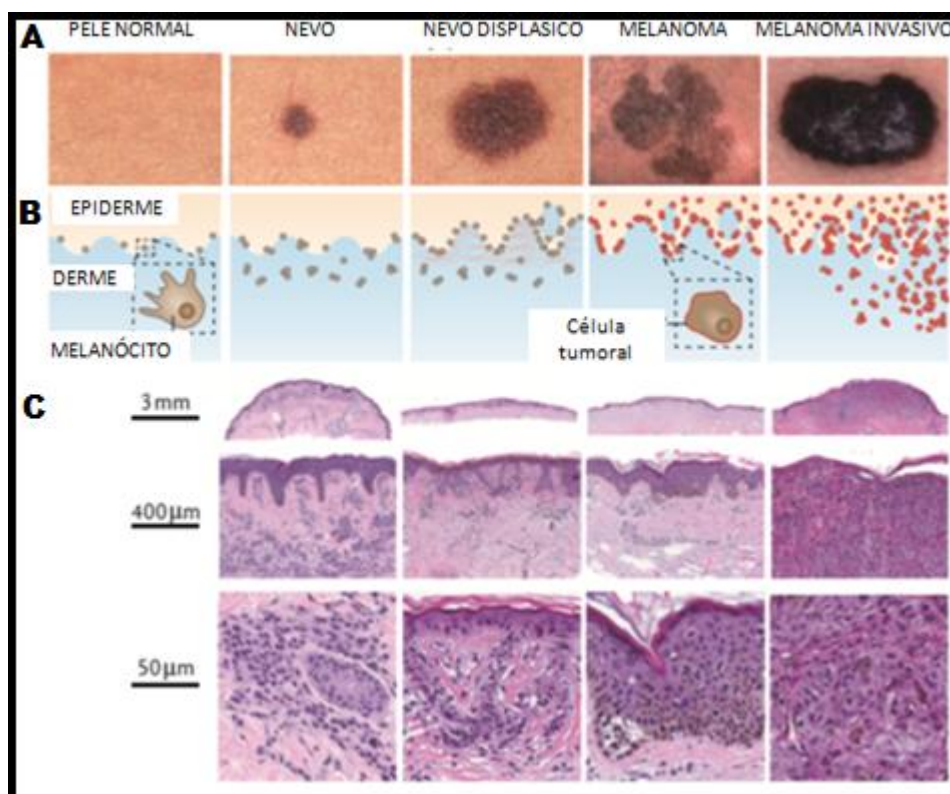
O melanoma é um tipo de câncer de pele que se origina da transformação maligna dos melanócitos, que são as células responsáveis pela produção do pigmento da pele, a melanina. Os melanócitos são células derivadas da crista neural que, durante o desenvolvimento, colonizam a pele, os olhos e, em menor grau, uma ampla gama de outros tecidos em todo o corpo. Os melanócitos nesses locais diversos podem dar origem a tipos fenotipicamente diversos de melanoma. (SHAIN, 2016). Os melanomas geralmente aparecem como manchas de coloração preta ou marrom, e com menos frequência, rosa, vermelha, roxa ou branca, além de poderem apresentar bordas irregulares, coloração heterogênea (regiões mais claras e escuras), e também formação de feridas. (GUPTA, 2014). (FIGURA 2).

O risco de desenvolvimento de melanoma está relacionado com características genéticas e pessoais, como o comportamento de exposição a raios ultravioleta. (WHO, 2016). Estudos epidemiológicos mostram o aumento da incidência de melanoma ao longo das últimas décadas, e com previsão de crescimento no número de casos. Atualmente, 132 mil casos de câncer de pele tipo melanoma ocorrem globalmente a cada ano. Os índices mais altos de melanoma ocorrem em países onde os habitantes são predominantemente de pele clara.

(NIKOLAOU; STRATIGOS, 2014). O melanoma, apesar de menos frequente do que os cânceres de pele do tipo não melanoma, representando apenas 5% dos tipos de câncer da pele, é o mais grave e agressivo dentre esses, sendo a maior causa de morte por câncer de pele. (SHAIN, 2016).

O processo de transformação maligna dos melanócitos é causado por uma complexa interação entre fatores ambientais e genéticos. O principal fator ambiental que contribui para o surgimento de melanoma é a exposição solar, podendo o melanoma aparecer devido a mutações não reparadas no DNA, causadas por radiação UVB. Essas mutações podem levar à divisão celular rápida e formação de tumores malignos. (NARAYANAN, 2010). Porém, os fatores genéticos continuam sendo o principal risco para o desenvolvimento da doença, uma vez que o surgimento do melanoma é predominante em indivíduos de pele pouco pigmentada (caucasianos). (WHO, 2016). Por isso o surgimento desse tipo de câncer de pele ocorre na maioria das vezes em pessoas com pele clara, e que tenham grande exposição solar.

FIGURA 2 – MELANOMA E OS ESTÁGIOS DA DOENÇA



A figura mostra imagens clínicas que representam o melanoma (linha A), nos diferentes estágios da transformação: Nevo (pinta), nevo displásico, melanoma e melanoma invasivo. Abaixo (linha B) apresenta esquema ilustrando as características arquitetônicas de cada tipo de lesão. Na sequência (linha C) estão representadas fotomicrografias ilustrando as características histopatológicas representativas de cada tipo de lesão. Não necessariamente o melanoma passa por todos os estágios.

FONTE: Adaptado de (SHAIN, 2016).

Copyright © 2016, Rights Managed by Nature Publishing Group.

A metástase é a causa mais importante de mortalidade no caso do melanoma maligno. (PASCO, 2004). O potencial invasivo em melanoma está diretamente relacionado à espessura do tumor primário, uma vez que existe um aumento progressivo no potencial invasivo e metastático com o aumento da espessura do tumor. (CERDEIRA, 2011). 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. Dessa forma, a descoberta de genes envolvidos na predisposição e desenvolvimento do melanoma seguida da identificação de novas mutações tem melhorado os mecanismos de entendimento dessa doença fatal. (IBRAHIM; HALUSKA, 2009).

2.1.2 Tratamentos convencionais para melanoma

Quando diagnosticado precocemente, o melanoma pode ser retirado cirurgicamente, e cerca de 80% dos casos são tratados dessa forma. No entanto, esse procedimento pode deixar células malignas circulantes, que muitas vezes podem dar origem a novos tumores. (MAVERAKIS et al., 2015).

Para o tratamento do câncer diversas drogas e inovações tecnológicas são propostas todos os anos por diferentes centros de pesquisa pelo mundo, na tentativa de combater esse tipo de doença. Porém, os tratamentos mais utilizados na clínica ainda são os mais antigos como, por exemplo, a remoção cirúrgica, a quimioterapia (que vem sendo alterada com o passar dos anos) e a radioterapia. Todas essas terapias estão disponíveis como tratamentos convencionais contra o câncer sendo geralmente escolhidas uma ou mais intervenções, com o objetivo de curar ou prolongar o tempo de vida do paciente. (WHO, 2016). Porém, para a maior parte dos tipos de câncer, essas terapias são transitórias, insatisfatoriamente efetivas trazendo ainda diversos efeitos colaterais ao organismo. (HANAHAN; COUSSENS, 2012).

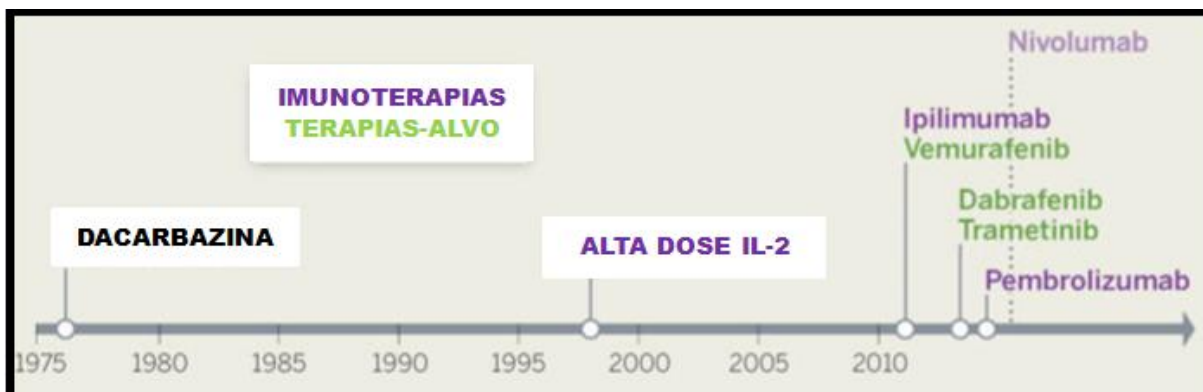
Sendo o melanoma metastático altamente refratário às terapias existentes (GRAY-SCHOPFER et al., 2007), os pacientes que apresentam melanoma avançado recebem um prognóstico desfavorável. Entretanto, pelo fato do diagnóstico ocorrer precocemente o tempo de sobrevivência de pessoas portadoras de melanoma tem aumentado.

Dentre as drogas quimioterápicas utilizadas nos tratamentos clínicos convencionais para melanoma maligno estão: dacarbazina (DTIC), cisplatina, paquitaxel, docetaxel, temozolomida análoga de DTIC, dentre outras. (GRAY-SCHOPFER et al., 2007). Outros tipos de tratamentos como imunoterápicos também vêm sendo utilizados clinicamente através de administração de imunoestimulantes como Interleucina-2 (IL-2) e Interferon (IFN). Porém, nenhum dos tratamentos mencionados oferece taxa de sucesso maior que 30% para a regressão total ou cura desta patologia. (PALUMBO, 2016). Além disso, a utilização dessas drogas é acompanhada de múltiplos efeitos colaterais, tais como: febre, náusea, vômito, fadiga, distensão abdominal, dores de cabeça, edemas periféricos, disfunção renal, mielossupressão, síndrome do escape capilar que afeta a irrigação sanguínea em vários órgãos, hipotensão, aumento de creatinina no soro, congestão vascular pulmonar, edema generalizado, aumentada suscetibilidade a infecção por *Staphylococcus*, supressão de medula óssea, depressão, chegando até a desenvolver comportamento suicida. (ATALLAH; FLAHERTY, 2005).

Além disso, novos tratamentos que interferem na regulação da sinalização e de genes mutados presentes nas células de melanoma responsáveis pela malignização das mesmas estão sendo testados e utilizados, permitindo que esses tratamentos sejam geneticamente adaptados. (IBRAHIM; HALUSKA, 2009). A primeira terapia dirigida para demonstrar uma eficácia substancial contra o melanoma foi o tratamento com Vemurafenibe, um inibidor de BRAF competitivo com ATP. No ensaio clínico de fase III, esse tratamento conferiu uma vantagem de sobrevivência comparada à quimioterapia com dacarbazina. (MARZUKA, 2015. GRIMALDI, 2015). O Dabrafenibe, outro inibidor BRAF, proporciona um benefício clínico semelhante. Vemurafenibe e Dabrafenibe foram aprovados pela FDA para o tratamento de melanoma avançado, apresentando mutação em BRAF, em 2011 e 2013 respectivamente. (LO, 2014). A combinação de Ipilimumabe e Nivolumabe também foi testada em 2015 e mostrou melhorias, porém devido à alta toxicidade

vários pacientes relataram que interromperam o uso pela grande quantidade de efeitos colaterais. (PALUMBO, 2016). (FIGURA 3).

FIGURA 3 – TRATAMENTOS PARA O MELANOMA



Tratamentos mais utilizados para o melanoma. Inicialmente foi descoberta e utilizada na quimioterapia a dacarbazina, que gera vários efeitos colaterais aos pacientes. No final da década de 90, o uso de altas doses de Interleucina-2 foi introduzido, e a partir de 2010 surgiram tratamentos mais específicos como Vemurafenibe e o Ipilimumabe por exemplo. Porém nenhum desses tratamentos é eficaz o suficiente para curar o paciente do melanoma.

FONTE: Adaptado de (LO, 2014).

Copyright © 2014. American Association for the Advancement of Science.

O melanoma maligno é considerado um dos cânceres mais resistentes aos tratamentos convencionais, aliado ao fato de não existir terapia que efetivamente iniba o potencial metastático desse tumor. (MARTÍ; SOROLLA; YERAMIAN, 2012). Sendo assim, apesar de todos os avanços tecnológicos e todo o empenho de diversos pesquisadores a cura para o melanoma ainda não foi descoberta sendo necessária a continuação de todos os estudos relacionados a esta patologia.

2.2 COMPOSTOS NATURAIS ALTAMENTE DILUÍDOS

A utilização de compostos altamente diluídos como sistema terapêutico foi iniciada no final do século XVIII pelo médico alemão Samuel Christian Hahnemann (1755-1843). (WAISSE, 2012). Fundamentado no princípio da similitude “*similia similibus curantur*” que significa o “semelhante cura o semelhante”, que significa que se algum composto, quando administrado em altas doses por um indivíduo saudável, gera determinados sintomas quando um indivíduo doente apresentar os mesmos sintomas, ele pode ser curado com o mesmo composto, porém diluído.

Além disso, tem como objetivo estimular os mecanismos de cura do próprio corpo, segundo a Farmacopeia Homeopática Brasileira (2011). Esses compostos utilizam uma série de substâncias derivadas de plantas, animais, minerais, substâncias químicas sintéticas ou drogas convencionais, todas em quantidades mínimas, usando um processo de preparação especial com repetidas diluições e sucussões (agitação vigorosa). (BELLAVITE, 2014).

No Brasil, desde 1980, a homeopatia é uma das especialidades médicas reconhecidas pelo Conselho Federal de Medicina. (BRASIL, 1980). Em 2006 o Ministério da Saúde considerou a homeopatia como sendo um sistema médico complexo, de abordagem integral e dinâmica do processo saúde-doença, com ações no campo da prevenção de agravos, promoção e recuperação da saúde. (PORTARIA 971, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006), sendo que em 2007, o Ministério da Saúde também incluiu os tratamentos homeopáticos na rede de Sistema Único de Saúde (SUS), permitindo uma maior utilização e atingindo um maior número de pacientes. (BRASIL, 2008).

A utilização de medicamentos homeopáticos por pacientes vem aumentando no Brasil e no mundo. Alguns dos fatores que explicam esse aumento são: o fato da alopatia apresentar diversos efeitos colaterais, ter forte tendência a levar os pacientes à dependência da droga, e também por vezes, o alto custo. Na Europa, por exemplo, a homeopatia é a terapia médica complementar mais comum. (MILAZZO et al., 2006; PREETHI et al, 2011).

Diferente dos medicamentos alopáticos, que são os mais comumente utilizados e levam anos de estudo para serem liberados para utilização pela população, a homeopatia a medida que é desenvolvida já é utilizada clinicamente. Isso significa que pouco se sabia cientificamente sobre a eficácia e segurança desse tipo de terapia antes de sua utilização clínica. Apesar disso, hoje em dia o banco de dados de pesquisa básica em homeopatia 'HomBRex' lista mais de 2000 trabalhos com pesquisa básica na homeopatia. (CLAUSEN, et al., 2011). O trabalho mais antigo foi realizado na Alemanha e data de 1832. Entre 1832 e 1900, 21 trabalhos foram publicados, dentre os quais 17 foram realizados por pesquisadores da Alemanha. Os primeiros estudos de pesquisa básica relatados fora da Alemanha datam de 1902 (França), 1922 (Estados Unidos), 1936 (UK), 1968 (Índia) e 1982 (Brasil). Juntos, França, Alemanha, Índia e Brasil contribuem com 70% das

publicações de experimentos com homeopatia. No Brasil a investigação da atividade de compostos naturais altamente diluídos aumentou nos últimos 10 anos e metade dessas publicações passa por revisores antes de serem publicadas (do inglês *peer reviewed*). (CLAUSEN, 2014). Esses dados mostram que a pesquisa no campo da homeopatia, apesar de ainda não atingir as proporções das pesquisas com alopatia, está crescendo e, além disso, de uma forma muito mais confiável, fazendo com que haja cada vez mais trabalhos publicados de forma ética, rigorosa e precisa, contribuindo para o avanço da ciência.

Com o passar dos anos, os pacientes vêm percebendo que a alopatia muitas vezes cura por algum tempo, mas que logo há a necessidade de fazer a utilização do mesmo medicamento novamente. Por esse motivo também há uma procura maior por tratamentos alternativos que curem o organismo como um todo, como trazem os princípios da homeopatia. Apesar disso, há poucos estudos clínicos sobre a eficácia dos medicamentos homeopáticos no tratamento do câncer. (PREETHI et al, 2011). Inúmeras hipóteses sobre como atuam esses compostos altamente diluídos já foram formuladas, porém até então, nenhuma explica de maneira satisfatória sua ação. Recentemente, a ocorrência de nanopartículas de sílica como fator para a atuação dos compostos naturais altamente diluídas vem sendo estudada. Alguns trabalhos relatam a presença de moléculas derivadas da solução de partida em soluções altamente diluídas, que supostamente ficaram na forma de nanopartículas em suspensão na interface ar-líquido e sendo dessa forma passadas entre as sucessivas diluições. (BELL, 2012). Porém, são necessárias pesquisas científicas avançadas e em maior número, livre de crenças ou descrenças no sistema em questão. (BELLAVITE, 2014).

As terapias que alteram as respostas biológicas estimulam os mecanismos de defesa natural do hospedeiro, mediando, por exemplo, a regressão do câncer. Entretanto, o desenvolvimento de técnicas quimio-imune-terapêuticas tem sido dificultado o desenvolvimento dos estudos devido à quimioterapia citotóxica suprimir a resposta imunológica. (BALLOW; NELSON, 1997). Por ser promissora e estar cada vez sendo mais utilizada, destaca-se a importância de estudar de forma séria e controlada os efeitos dos compostos naturais altamente diluídos utilizando métodos científicos em diferentes modelos biológicos, como animais e cultura de células, por

exemplo, a fim de obter bases sólidas para sua consolidação no âmbito científico e clínico. (BELLAVITE, 2014).

2.2.1 *Thuja occidentalis* 30CH

A *Thuja occidentalis* é uma planta que foi identificada pela primeira vez durante uma expedição do século XVI no Canadá. Era usada pelos índios nativos como remédio para o tratamento de reumatismo, gota e malária e posteriormente foi revelado ser eficaz no tratamento de escorbuto. É originária do leste da América do Norte e cultivada na Europa como uma árvore ornamental. (SHEALY, 1999). (FIGURA 4).

FIGURA 4 – *Thuja occidentalis*



Folhas da planta *Thuja occidentalis*.

FONTE: (NASER, et al., 2005).

Copyright © The Author (2005). Published by Oxford University Press. All rights reserved.

Hoje em dia, é muito usada na fitoterapia e na medicina homeopática sendo considerado o terceiro composto mais utilizado em pesquisa com homeopatia. (SHEALY, 1999; NASER et al., 2005; CLAUSEN et al., 2011). A tintura-mãe é preparada a partir de macerados de suas folhas e ramos até formar uma polpa que serve como base para o medicamento homeopático. (SHEALY, 1999). Na medicina popular, *Thuja occidentalis* tem sido usada para tratar catarro brônquico, cistite, psoríase, carcinoma de útero, amenorreia e reumatismo. (CHANG, et al., 2000). Ela apresenta uma extensa patogenesia, contudo é principalmente indicada em dores de cabeça e nevralgias intensas (SHEALY, 1999), além de infecções com presença de

catarro, verrugas, pólipos nasais e uterinos, gonorreias agudas e crônicas. (TOLEDO, 1910; SHEALY, 1999).

O potencial imunofarmacológico da *Thuya occidentalis* tem sido demonstrado em diversos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Naser e colaboradores (2005) revisaram suas propriedades fitoquímicas, demonstrando potencial antiviral e imunofarmacológico. Polissacarídeos dessa planta mostraram inibir a atividade dos vírus HIV e influenza tipo A, coestimulação e efeitos sobre citocinas, produção de anticorpos e ativação de células imunocompetentes e macrófagos. Os efeitos *in vitro* foram observados com doses ponderais (diluições baixas) do extrato da planta e de seus princípios ativos. Apesar de todos os estudos mostrando atividades eficazes com a *Thuya occidentalis*, o seu uso na medicina é moderado devido a propriedades tóxicas do seu óleo, chamado Tujona. O óleo da *Thuya occidentalis* e seu componente ativo podem ser usados para o tratamento de ovário policístico sem induzir osteoporose, e também tem capacidade abortiva e contraceptiva. (KÜPELI, 2015).

O uso de Thuya no combate ao câncer vem sendo descrito, e vários autores demonstraram seu potencial antitumoral. Jonas e colaboradores em 2003 verificaram em modelo animal de câncer de próstata que o uso de Thuya 6DH foi capaz de reduzir para 23% a incidência do tumor, além de reduzir em 38% o volume tumoral. Além disso, foi verificado que os tumores tratados tiveram aumento de 19% na apoptose. Em outro estudo, a administração de Thuya também mostrou retardar o crescimento de tumores. (HARIKUMAR et al, 2007). Sunila e colaboradores, em 2007, demonstraram que a atividade metastática de B16-F10 em animais tratados com Thuya foi diminuída. O tratamento *in vitro* de células tumorais com um componente do extrato alcoólico de *Thuya occidentalis* reduziu a viabilidade celular de forma bem específica, uma vez que não afetou células saudáveis. Além de também ter afetado o ciclo celular e de gerar apoptose da célula cancerosa, mostrando que os componentes dessa planta apresentam potencial antitumoral. (BISWAS, 2011). O extrato etanólico da folha de Thuya demonstrou potenciais apoptóticos e antiproliferativos contra a linhagem celular de carcinoma de pulmão A549, levando a uma diminuição dose-dependente na viabilidade dessas células após 24h de exposição, além de que, a proliferação celular foi reduzida de um modo dependente do tempo de exposição ao fármaco e induziu as células a apoptose

inicial. (MUKHERJEE, 2012). Também foi demonstrado que o lavonol, derivado do extrato de *Thuya*, reduziu a viabilidade das células A549, poupando células L-132 normais, levando a parada do ciclo celular na fase G2-M, levando a apoptose. (MUKHERJEE, 2014). Mazzio e colaboradores em 2014 relataram que o tratamento de células de carcinoma de mama humano de linhagem MDA-MB-231 com *Thuya* foi capaz de interferir na divisão celular, sendo considerada uma planta com potencial anti-mitótico natural. Ainda em modelo de carcinoma, *Thuya occidentalis* induziu as células a entrarem em processo de apoptose. (SAHA, 2014). Recentemente o trabalho de Torres e colaboradores (2016) testou frações de *Thuya* em células de glioblastoma utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* e demonstrou diminuição da viabilidade celular, efeito antiproliferativo, pró-apoptótico e anti-angiogênico potente. Os ensaios *in vivo* mostraram que o tratamento promoveu a regressão da neoplasia e inibiu os marcadores angiogênicos VEGF, Ang-4 e CD31 no tumor.

As soluções altamente diluídas utilizando *Thuya occidentalis* também são descritas na literatura. O composto natural altamente diluído *Thuya occidentalis* 1M apresentou atividade antimetastática significativa em animais portadores de melanoma B16-F10, ficando evidente a inibição da formação de nódulos tumorais nos pulmões, a partir da análise morfológica e histopatológica desses. (SUNILA, 2007). Em estudo com células pulmonares murinas normais cultivadas na presença de BaP, um potente carcinogênio, e em seguida tratadas com *Thuya occidentalis* 30CH, foi demonstrado aumento significativo na viabilidade das células intoxicadas por BaP e inibição significativa do nível de estresse induzido por BaP, através da regulação negativa de ROS. *Thuya occidentalis* 30CH em si não apresentou efeito prejudicial ao DNA, e nenhuma interação direta entre o fármaco e o DNA. No entanto, mostrou uma capacidade bastante surpreendente de reparar danos ao DNA causados por BaP. (MUKHERJEE, 2013). Ainda, altas diluições de *Thuya occidentalis* demonstraram atividade imunomoduladora, aumentando a proliferação de células B e T linfóides. (REMYA, 2015).

Dados prévios do nosso laboratório mostram que *Thuya occidentalis* 30CH atua aumentando significativamente a ativação de macrófagos de camundongos, a produção de citocinas como, por exemplo, de IFN- γ e a produção de óxido nítrico. (OLIVEIRA, 2006). Perante todos esses trabalhos utilizando *Thuya occidentalis*, e diante dos resultados obtidos tanto de forma imunomodulatória quanto

anticancerígena, há uma maior motivação para continuar a estudar o potencial do composto natural altamente diluído *Thuya occidentalis* 30CH em células de melanoma, e investigar a ação desse tratamento, para que futuramente esse composto possa ser difundido para todos os pacientes que são acometidos por essa patologia.

3 JUSTIFICATIVA

Levando-se em consideração as dificuldades de tratamento efetivo para o melanoma, tem-se a necessidade de novas formas de tratar os pacientes acometidos por essa doença. O ideal para essa patologia seria um tratamento que além de eficácia apresentasse uma diminuição ou ausência de efeitos colaterais, somados ainda a menor agressividade, visto que a maioria dos tratamentos utilizados é potencialmente agressiva ao organismo dos pacientes, tendo como exemplo a quimioterapia, que gera depressão do sistema imunológico com consequente piora da qualidade de vida do paciente. Os compostos naturais altamente diluídos são historicamente conhecidos por terem ações no organismo de forma não tóxica, podendo, portanto ser um tratamento contra o melanoma. São conhecidos cientificamente por não comprometer o quadro clínico com efeitos colaterais e, além disso, tem sido demonstrado que eles ativam o sistema imunológico, o que traz benefícios aos pacientes portadores da patologia em questão, sendo que com a utilização dos compostos altamente diluídos esses pacientes tornam-se mais saudáveis ficando portanto mais resistentes para controlar a doença.

Compostos naturais altamente diluídos produzidos a partir de *Thuya occidentalis* são conhecidos, entre os usuários desse tratamento, por ter forte ação contra o câncer em geral, apresentando alto potencial antitumoral desde a utilização da tintura-mãe. Por isso, há grande importância no estudo desse tratamento e de suas possíveis ações, as quais podem atuar tanto em células saudáveis e do sistema imunológico, quanto em células alvo desse tratamento, como as células de melanoma, por exemplo.

Diversos modelos animais de melanoma são utilizados atualmente para a pesquisa básica de agentes antitumorais, sendo que, um dos modelos mais utilizados nesses estudos consiste na proliferação das células B16-F10 que foram obtidas de camundongos C57BL/6, pois é considerada de alto potencial replicativo e metastático. (DANCIU et al., 2015). Sendo assim, nesse trabalho escolhemos testar os efeitos de *Thuya occidentalis* 30CH em células B16-F10 levando-se em consideração que novos tratamentos são imprescindíveis contra o melanoma,

patologia que acomete várias pessoas de uma forma tão drástica, sem tratamentos verdadeiramente eficazes.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a ação *in vitro* do composto natural altamente diluído *Thuya occidentalis* 30CH em células de linhagem de melanoma murino B16-F10.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar se o tratamento com o composto natural altamente diluído *Thuya occidentalis* 30CH altera as seguintes funcionalidades da célula de melanoma:

- ✓ características padrão da célula de melanoma - proliferação celular, melanogênese, atividade mitocondrial e atividade lisossomal, através dos ensaios com os reagentes cristal violeta, MTT, JC-1 e vermelho neutro respectivamente;
- ✓ ciclo e morte celular, utilizando os reagentes iodeto de propídio para detectar o ciclo celular e Anexina V/7AAD para verificar a ocorrência de morte;
- ✓ produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio intracelular através dos ensaios com as sondas DCFH-DA e DAF-FM;
- ✓ expressão de moléculas de superfície relacionadas a migração e invasão de outros tecidos;
- ✓ capacidade de crescimento independente de ancoragem através de ensaios de formação de colônias.

Verificar se o tratamento com o composto natural altamente diluído *Thuya occidentalis* 30CH altera as funcionalidades de células não tumorigênicas (linhagem Balb/3T3), como:

- ✓ proliferação celular através dos ensaios com o reagente cristal violeta;

- ✓ atividade mitocondrial e lisossomal, utilizando os ensaios de MTT e vermelho neutro;
- ✓ morte celular, utilizando o reagente Anexina V/7AAD para verificar a ocorrência de morte.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Células Inflamatórias e Neoplásicas e Laboratório de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados, situados no Departamento de Biologia Celular, no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

5.1 CULTURA DE CÉLULAS - *IN VITRO*

5.1.1 *Cultura de células tumorais*

Células de melanoma murino da linhagem B16-F10 (BCRJ code: 0046) foram utilizadas. As mesmas foram obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), contendo penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL, em atmosfera úmida, à 37°C, contendo 5% de CO₂. A linhagem foi mantida em garrafas de cultivo com 25 cm² ou 75 cm² de superfície de adesão, com 5 ou 15 mL de meio de cultura, respectivamente. O subcultivo aconteceu quando se observou através de microscópio óptico invertido que as células ocupavam aproximadamente 70% da área de adesão. Os subcultivos foram realizados utilizando a enzima tripsina (GIBCO, #15400054) diluída 10 vezes (concentração de uso em 0,05%) em PBS a 37°C (500 µl para uma garrafa pequena) por 3 minutos, seguida de inativação com meio completo. Após centrifugação a 1800 rpm por 3 minutos as células foram ressuspensas em DMEM com 10% de SFB. O homogeneizado foi parcialmente transferido para outras garrafas em conjunto com meio de cultivo suplementado e estéril para complementação do volume total, de modo que seja continuada a cultura, sendo que as células ficaram em cultura até no máximo a quinta passagem após o descongelamento.

5.1.2 Cultura de células não tumorais

Os fibroblastos de linhagem murina Balb/3T3 (ATC, CCL-163) gentilmente cedidos pelo Instituto Carlos Chagas (ICC - Fiocruz), foram cultivados utilizando os mesmos reagentes, produtos e protocolo de subcultivos descritos acima para linhagem murina de B16-F10.

5.2 COMPOSTO NATURAL ALTAMENTE DILUÍDO

O composto natural altamente diluído *Thuya occidentalis* 30CH segue as técnicas de preparação Hahnemannianas. A tintura-mãe é adquirida de agências autorizadas e licenciadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de modo a assegurar a qualidade (o composto estar livre de endotoxinas) e a composição físico-química dos produtos. O composto utilizado seguiu as normas de manipulação da Farmacopeia Homeopática Brasileira: utilizou-se tintura-mãe que foi, posteriormente, diluída diversas vezes (30 vezes) em água destilada (na proporção de uma parte de tintura-mãe para 99 partes de água destilada) e então dinamizada sucessivamente. Todas as dinamizações foram feitas manualmente. Assim, esse composto constitui solução altamente diluída da tintura original. O composto testado foi manipulado na Farmácia Homeoterápica de Curitiba sob a responsabilidade do farmacêutico Narciso da Lozzo Neto (CRF-PR 5604), e gentilmente cedido para a realização da pesquisa.

O veículo de diluição do composto é água destilada e por isso foi usado como controle do tratamento. O composto utilizado nesse estudo foi a *Thuya occidentalis*. Uma vez que foram realizados estudos *in vitro*, todas as soluções foram esterilizadas por meio de filtração em membranas de PVDF estéreis de 0,22 µm (Millipore). Ainda, todas foram mantidas ao abrigo de luz, à temperatura ambiente, e sucussionadas 20 vezes contra a palma da mão antes de cada tratamento experimental.

5.3 TRATAMENTO *IN VITRO*

No mínimo 6 horas após o plaqueamento, as células foram tratadas com o composto *Thuya occidentalis* 30CH ou veículo (água - referido nos resultados como H₂O). A concentração de 20% (v/v) foi utilizada, sendo que foi administrado reforço de 1% (v/v) a cada 24 horas, até completar 72 horas de tratamento. O composto e o

veículo foram agitados (sucussionados) 20 vezes contra a palma da mão, imediatamente antes de cada tratamento.

5.4 CRISTAL VIOLETA – PROLIFERAÇÃO CELULAR

O ensaio colorimétrico de cristal violeta é utilizado para determinar a proliferação celular e baseia-se na coloração do DNA. Portanto, a intensidade da coloração da monocamada é proporcional à quantidade de células. (BONNEKOH *et al.*, 1989; VEGA-AVILA; PUGSLEY, 2011).

Para esse ensaio as células de melanoma murino B16-F10 e fibroblastos Balb/3T3 foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas conforme descrito no item 5.3.. Para os experimentos de cada tipo celular individualizado as células B16-F10 foram plaqueadas na densidade de $1,2 \times 10^3$ células/cm², enquanto as Balb/3T3 na densidade de 3×10^3 células/cm², determinadas após observação da manutenção das capacidades proliferativas e características intrínsecas de cada célula. Para esse experimento foi realizada uma curva de tempo de tratamento (24, 48 e 72 horas). Após o final de cada tempo de tratamento, as células foram lavadas com PBS a 37°C e fixadas com Cytofix (BD) por 30 minutos em gelo. Após, foram incubadas com solução contendo 0,25 mg/ml de cristal violeta (MERCK) em água por 10 minutos, lavadas com água destilada e na sequência o corante foi eluído em solução de ácido acético (SYNTH) 33% durante 30 minutos à temperatura ambiente em um agitador. Ao final, a absorbância relativa de cada amostra foi medida em leitor de microplacas Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek® Instruments, Inc.) utilizando o comprimento de onda de 570nm. As absorbâncias obtidas foram convertidas para número de células, através da comparação direta com dados obtidos à partir de uma curva padrão de número de células (dados não mostrados).

5.5 MELANOGÊNESE – PRODUÇÃO DE MELANINA

A grande produção do pigmento melanina é uma das principais características das células B16-F10. 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).

Para a realização do ensaio de melanogênese as células de melanoma foram plaqueadas e tratadas como descrito para o ensaio de proliferação celular. Após os tempos de estudo, foram incubadas com solução de NaOH (E.M.S) 1N com 10% de DMSO (MERCK) por 1 hora à 80°C em estufa seca. Para comparação, foi feita uma curva padrão de concentração de melanina de zero, 1, 5, 10, 50, 100 mg/mL, submetida às mesmas condições. As amostras, assim como a curva, foram analisadas em leitor de microplacas Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek® Instruments, Inc.) no comprimento de onda de 405nm. A análise da concentração da melanina produzida pelas células foi determinada através da comparação com os dados obtidos na curva padrão (dados não mostrados). Os resultados de absorbância foram normalizados pelo número de células obtido ao final de cada tempo de tratamento (dado obtido no ensaio de proliferação).

5.6 DETECÇÃO DE ROS INTRACELULAR

A sonda fluorescente DCFH-DA (2,7-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato) é sensível à detecção de espécies reativas de oxigênio, mais especificamente, peróxido de hidrogênio e pode ser usada como marcador oxidativo tanto no meio intracelular como no meio extracelular. (ARMSTRONG, 2010).

As células de melanoma foram plaqueadas e tratadas como descrito anteriormente e então incubadas com a sonda DCFH-DA (Sigma) (1µM) em PBS por 25 minutos à 37°C, 5% de CO₂. Em seguida foi adicionado ao sobrenadante uma solução de 3 mM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ - VETEC: 12,5mol/L) nos poços do controle positivo e incubado por mais 5 minutos. Em seguida as células foram lavadas, centrifugadas e ressuspendidas em PBS. Após esse procedimento as soluções foram lidas em citômetro de fluxo (FACScalibur, BD) e com laser de 488nm e filtro de emissão FL1 (530/30). Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do programa Flowing Software 2.

5.7 VERMELHO NEUTRO – ATIVIDADE LISOSSOMAL

O vermelho neutro (2-amino-3-metil-7-dimetil-amino-fenazonioclorido) é um corante que tem capacidade de penetrar as membranas celulares por difusão

passiva, e concentra-se nos lisossomos onde se liga por ligações hidrofóbicas eletrostáticas nos locais aniônicos da matriz lisossomal. (BORENFREUND et al., 1985). Dessa forma esse ensaio avalia a capacidade lisossomal da célula, se os lisossomos estão com a funcionalidade intacta.

Para esse ensaio, ambas as linhagens de células seguiram o mesmo esquema de plaqueamento e tratamento do ensaio de cristal violeta. Como controle negativo, um grupo foi incubado na presença de saponina (Sigma) 0,01% em PBS por 30 minutos antes do ensaio a fim de inviabilizar as células, uma vez que a saponina é um detergente e, portanto, desestabiliza as membranas celulares. Após 30 minutos foram adicionados 20 µL da solução de vermelho neutro (SIGMA – N2889) 1100 µg/mL (concentração final de vermelho neutro = 100 µg/mL) aos grupos, seguido de incubação por 2 horas (37°C e 5% CO₂). Em seguida, foi retirado todo o volume da placa e adicionado 100 µL de solução de extração (etanol (MERCK) 50%/ ácido acético (SYNTH) 1%) em cada poço. A solução foi homogeneizada por 10 minutos e então a absorbância foi lida em leitor de microplacas Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek® Instruments, Inc.) em 550 nm. Os resultados de absorbância foram normalizados pelo número de células obtido ao final de cada tempo de tratamento (dado obtido no ensaio de proliferação).

5.8 MTT – ATIVIDADE MITOCONDRIAL

O método tem como finalidade avaliar a funcionalidade mitocondrial através do MTT (brometo de (3-metil-[4-5dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich). É um ensaio colorimétrico que analisa a capacidade de redução do sal de MTT (amarelo). Pode-se quantificar o MTT reduzido pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADPH através quantificação da formação de cristais de formazan, de cor azul. Assim, a quantidade de formazan medida no espectrofotômetro é diretamente proporcional ao nível de funcionamento e atividade da mitocôndria das células avaliadas. (MOSSMAN, 1983).

Para esse ensaio as células de melanoma murino B16-F10 e Balb/3T3 foram plaqueadas e tratadas da mesma forma que para os ensaios anteriores. Finalizados os tempos de tratamento, foi retirado o meio de cultura dos poços do grupo do controle negativo e adicionados 200 µL/poço de solução de saponina (Sigma)

0,01%. Após meia hora, foram adicionados em todos os poços, 20 μ L de solução mãe de MTT (Sigma-Aldrich – 135038 – 5g – 0,45 mg/mL) 5 mg/mL, com concentração final de 0,45 mg/mL. Depois de 3 horas na incubadora (37°C e 5% de CO₂) foi retirado todo o volume dos poços e adicionados 100 μ L/poço de DMSO (dimetilsulfóxido) (SIGMA). Foi homogeneizado por 15 minutos e lido em leitor de microplacas Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek® Instruments, Inc.) em 550 nm. Os resultados de absorbância foram normalizados pelo número de células obtido ao final de cada tempo de tratamento (dado obtido no ensaio de proliferação).

5.9 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi$ M)

Foi utilizada a sonda fluorescente JC-1 (Molecular Probes, #T3168) para determinar o potencial de membrana mitocondrial das células após o tratamento com o composto em estudo. JC-1 é um cátion lipofílico capaz de atravessar as membranas celulares, e que entra seletivamente nas mitocôndrias. Existe numa forma monomérica (fluorescência verde), e também na forma agregada (fluorescência vermelha) que ocorre quando a mitocôndria está com a membrana normal (superpolarizada) (PROOST, et al., 2008).

As células de melanoma foram plaqueadas e tratadas como descrito anteriormente em placas de 96 poços com paredes pretas e fundo transparente (Corning). Terminado o tempo de tratamento, o poço do controle positivo foi incubado com 1 μ M de valinomicina (Sigma) por 30 minutos a 37°C para que ocorra a despolarização da membrana mitocondrial. Em seguida as células foram lavadas com PBS a 37°C (Sigma Aldrich) duas vezes e incubadas por 30 minutos a 37°C em 40 μ L/poço de solução de PBS contendo 2 μ M de JC-1 e 5 μ g/mL de Hoescht (33342 Invitrogen, #H1399) que marca o núcleo celular sem matar a célula. Na sequência, a placa foi lida no equipamento ImageXpress Micro® High Content Screening (Molecular Devices) com laser de excitação de 488nm, em filtros de emissão de 529nm (verde) e 590nm (vermelho).

5.10 MORTE CELULAR

A anexina V é uma proteína de ligação para fosfatidilserina. Mostrou-se útil na detecção de células apoptóticas, pela alta exposição de fosfatidilserina no início desse processo. (KOOPTMAN et al., 1994; Josephson *et al.*, 2004). Já o composto 7-AAD (7-amino-actinomycin d) é um corante fluorescente intercalante de DNA, que sofre um desvio espectral quando ocorre a associação entre os mesmos. Pode ser observada sua fluorescência quando excitado com laser 488 nm e com emissão máxima de 647 nm. Uma vez que esse corante não permeia membranas biológicas, para que a intercalação com o DNA ocorra é necessário que ocorra rompimento das membranas. Isso ocorre quando a célula está em processo de necrose celular, ou apoptose tardia, onde os sinais de morte celular por apoptose e necrose se misturam. (DE BOER et al., 2002).

O *Apoptosis Detection Kit* (BD Pharmingen) é composto de proteína Anexina conjugada a um fluorocromo (FITC) e de corante intracitoplasmático 7-AAD, permitindo a identificação das células nos estágios: apoptose inicial (anexina positiva e 7-AAD negativo), apoptose tardia (ambos positivos), células viáveis (ambos negativos) e necrose (anexina negativa e 7-AAD positivo). As células foram plaqueadas e tratadas como descrito anteriormente em placas de 6 poços, lavadas em PBS e ressuspensas em 100 µL de tampão diluído (*Annexin V Binding Buffer*). Nessa solução foram adicionados os reagentes conforme instruções do fabricante (5µL de anexina V-FITC e 5µL de 7-AAD) agitados e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente, na ausência de luz. Foram adicionados mais 400 µL do tampão diluído e na sequência foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS calibur, BD Pharmingen), com laser de 488 nm, e filtro de emissão FL1 (530/30) para FITC e FL3 (670LP) para 7AAD. Para a análise dos dados, foi utilizado o programa Flowing Software 2.

5.11 CICLO CELULAR

Iodeto de propídio (PI) é um corante fluorescente que cora DNA e RNA. O PI se liga ao DNA e RNA, por isso esse último deve ser removido por digestão com ribonucleases. O teor de DNA pode revelar informações sobre o ciclo celular e as

proteínas envolvidas na regulação desse processo. As células nas fases do ciclo celular G2 e M têm o dobro do conteúdo de DNA daquelas em fases G0 e G1. As células em fase S têm um teor de DNA que se encontra entre estes dois extremos (DOUGLAS, et al., 1995)

As células foram cultivadas e tratadas em placas de 6 poços e ao fim de 72 horas de tratamento as células foram lavadas com PBS e desaderidas através de raspagem com rodinho. Foram coletadas e centrifugadas por 3 minutos a 1800 rpm. Após isso, as células foram fixadas com paraformaldeído 1% (EMS) por 30 minutos a temperatura ambiente, logo em seguida as células ficaram *overnight* em etanol 70% (Merck) em temperatura de -20°C. No dia seguinte as células foram centrifugadas, ressuspendidas e mantidas em solução de PI/RNase (*PI/RNase Staining Buffer - BD Pharmingen*) por 15 minutos em temperatura ambiente, conforme instruções do fabricante do kit. Na sequência as células foram transferidas para tubos de citômetro, e lidas em citômetro de fluxo BD FACSCalibur, utilizando o software CellQuest (BD Biosciences). Foi utilizado o laser de 488nm e o filtro de emissão FL3 (670LP). Para a análise dos dados, foi utilizado o programa Flowing Software 2.

5.12 IMUNOMARCAÇÕES PARA CITOMETRIA DE FLUXO E TRIAGEM DE ALTO RENDIMENTO

Imunomarcacão é uma técnica que utiliza anticorpos para reconhecer certa proteína e/ou molécula em células ou tecidos, essa identificação ocorre devido a reações específicas de interação anticorpo-antígeno. Normalmente são utilizados anticorpos conjugados com fluoróforos, cuja fluorescência pode ser quantificada por citometria de fluxo ou microscópios de fluorescência (COONS, et al., 1941).

As células foram cultivadas e tratadas em garrafas de cultura (25 cm²) e, após serem desaderidas com scraper (rodinho para raspagem) foram passadas para tubos de citômetro identificados. As células cultivadas para triagem de alto rendimento foram tratadas em placas de 96 poços com fundo de vidro e paredes escuras (Corning) e o processamento ocorreu com as células aderidas na própria placa. Após isso as células foram fixadas em paraformaldeído 2% (EMS) em PBS, realizado o bloqueio de radicais aldeídos com 0,1 M de glicina (VETEC) em PBS, pH

7,4, permeabilização celular com saponina 0,01% (Sigma Aldrich) em PBS e bloqueio dos sítios inespecíficos com BSA 1% (Sigma Aldrich) em PBS.

As seguintes marcações foram realizadas com anticorpos específicos:

- N-caderina:

As células foram incubadas com anticorpo primário IgG anti-N-caderina (Santa Cruz sc-31030) produzido em cabra, diluído 1:50 em PBS 1% de BSA e 0,01% de saponina por 1 hora. Foi utilizado anticorpo secundário anti-IgG de cabra conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen A11078, lote 1069847) produzido em coelho, diluído 1:300 em PBS 0,01% de saponina por 30 minutos no escuro.

- CD44:

As células foram incubadas com anticorpo primário IgG2b anti-CD44 (BD, 550538) produzido em rato, diluído 1:100 em PBS contendo 1% de BSA por 1 hora. Incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado com FITC (Jackson 112-095-003) produzido em cabra, diluído 1:200 em PBS por 30 minutos no escuro.

As amostras foram lidas em citômetro de fluxo (BD FACScalibur), utilizando o software CellQuest (BD Biosciences) e os lasers e canais de detecção apropriados para cada fluoróforo. No citômetro foram adquiridos 10.000 eventos de cada amostra e os dados foram analisados utilizando o programa Flowing Software 2.

No equipamento ImageXpress Micro® High Content Screening (Molecular Devices) foram analisadas as amostras para triagem de alto rendimento, utilizando também filtros de excitação e emissão adequados para cada fluoróforo. Os poços da placa foram escaneados (quatro regiões de cada poço, abrangendo praticamente toda a área dos mesmos), obtendo-se imagens das imunomarcações, que foram posteriormente quantificadas. A análise foi gentilmente realizada pela equipe da Molecular Devices, tendo como responsável Luciane Ganiko.

5.13 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM ALGINATO

Esse ensaio utiliza uma matriz artificial, feita de alginato, que mimetiza uma matriz extracelular onde as células podem crescer de forma tridimensional e independente de ancoragem. Dessa forma pode-se avaliar o crescimento de colônias formadas pelas células B16-F10, que se assemelham a microtumores, e

permite observar se o tratamento diminui a capacidade celular de formar colônias (DVIR-GINZBERG, et al., 2007).

As células foram plaqueadas e tratadas por 72 horas em placas de 6 poços, depois foram desaderidas com rodinho e contadas. Quinhentos μL de solução contendo $2,5 \times 10^3$ células de cada amostra em DMEM com 10% de SFB e 10% de tampão de endurecimento (Gibco) foram transferidos para placas de 24 poços *AlgiMatrix 3D Culture System* (Gibco), conforme instruções do fabricante. A placa foi centrifugada a 100g por 4 minutos para sedimentação das células na matriz. Posteriormente foram adicionados mais 500 μL de DMEM com 10% de SFB. As células foram incubadas a 37°C e 5% de CO_2 por mais 6 dias para formação das colônias na ausência do tratamento, com substituição de todo o meio no terceiro dia. As amostras foram então lavadas com DMEM sem SFB e fixadas em PFA 1% em DMEM overnight a 4°C, coradas com solução de cristal violeta 0,25 mg/mL em água por 1 hora sob agitação, lavadas 3x com água por 30 minutos cada sob agitação. As colônias foram fotografadas sob estéreomicroscópio binocular Tecnival (modelo SQF-FL) em aumento de 2X e contadas usando o programa ImageJ.

5.14 DETECÇÃO DE RNS INTRACELULAR

DAF-FM é um reagente criado para quantificar baixas concentrações de óxido nítrico (NO). É um composto que entra na célula e reage com o NO intracelular formando belzoatrizol e emitindo fluorescência. A intensidade de fluorescência pode ser lida por citometria de fluxo, no filtro FL1 (KOJIMA, et al., 1999).

As células de melanoma foram plaqueadas em placas de 6 poços, e tratadas por 72h. No dia do ensaio, as células foram lavadas 2x com PBS, desaderidas com rodinho e passadas para tubos de citômetro onde foram incubadas por 40 minutos, a 37°C, com a sonda fluorescente DAF-FM 1 μM (Invitrogen). Após o tempo de incubação as células foram lavadas com PBS para retirar o excesso de sonda, e submetidas a leitura em citômetro de fluxo (FACScalibur, BD) com laser de 488nm e filtro de emissão FL1 (530/30). O programa Flowing Software 2 foi utilizado para analisar os dados obtidos.

5.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Cada ensaio foi realizado pelo menos três vezes e os resultados estão mostrados, de maneira geral, em gráficos de dispersão com representação da mediana. (WEISSGERBER et al., 2015). Para cada experimento os dados referentes às amostras experimentais (*Thuya occidentalis* 30CH) foram comparados ao controle daquele mesmo experimento (veículo). Os dados foram submetidos a testes de normalidade e em seguida ao teste estatístico mais adequado, e considerados estatisticamente significativos os valores com $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS

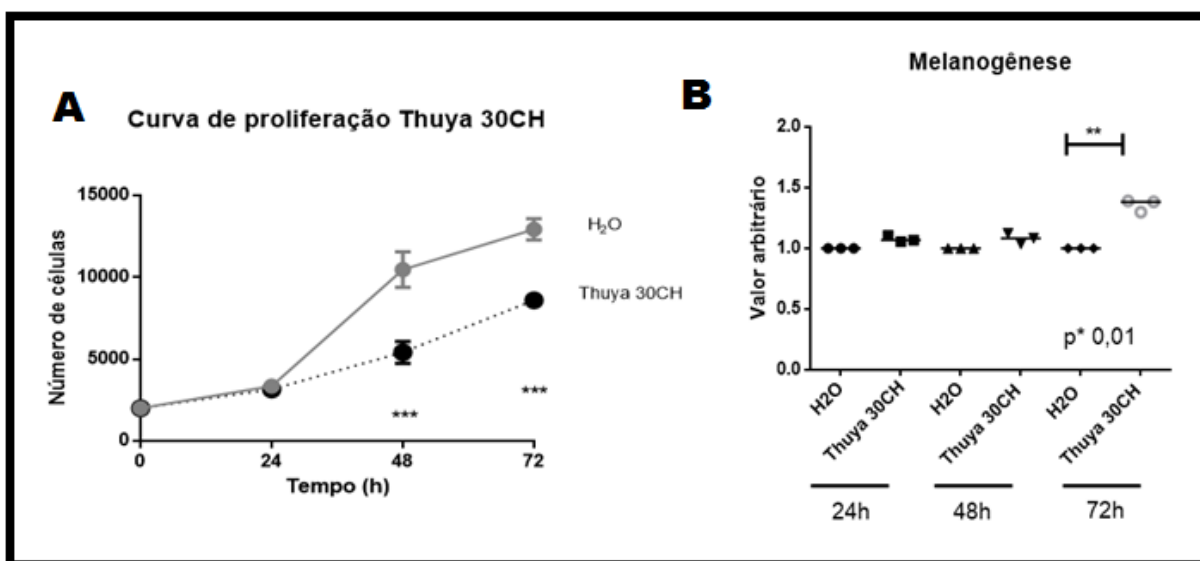
Características intrínsecas da célula B16-F10 são alteradas após o tratamento com *Thuya occidentalis* 30CH (Thuya 30CH)

O melanoma é comumente descrito como sendo um câncer que apresenta rápido crescimento devido à rápida proliferação das células que o origina. Por isso, foi realizado o ensaio de proliferação celular utilizando o corante cristal violeta. Nesse ensaio basicamente é avaliada a quantidade de células aderidas na placa de cultura após o tratamento.

Foi observado que após 48 e 72h de tratamento com o composto Thuya 30CH, houve diminuição significativa na proliferação celular de células B16-F10.

Além do rápido crescimento descrito para o melanoma, também há descrito na literatura, uma relação entre a proliferação celular e o processo de melanogênese na cultura de linhagem B16-F10 (D'MELLO, 2016). Quando a proliferação está mais rápida as células produzem menos melanina, e quando a proliferação celular está mais lenta a produção de melanina está aumentada. Na cultura de células feita em laboratório também foi observado esse padrão em diversos momentos, por essa razão foi considerado como uma característica importante o processo metabólico envolvendo a produção de melanina (melanogênese). Através do ensaio de melanogênese pôde-se observar que o tratamento com Thuya 30CH estava alterando essa característica da célula B16-F10, pois após o tratamento a melanogênese foi aumentada no tempo de 72h. (FIGURA 5), possivelmente relacionada à redução da proliferação celular, uma vez que esses processos estão relacionados.

FIGURA 5 – PROLIFERAÇÃO CELULAR E PRODUÇÃO DE MELANINA DE CÉLULAS B16-F10 APÓS TRATAMENTO COM THUYA 30CH



As células B16-F10 foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas com 20% v/v de Thuya 30CH por 24, 48 ou 72h e então realizado os ensaios de cristal violeta e melanogênese. A) Curva de proliferação celular. As células foram fixadas e coradas com cristal violeta. Os dados de absorvância obtidos foram comparados a uma curva padrão de número de células. O tratamento diminuiu significativamente a proliferação das células B16-F10 após 48 e 72h comparado com o veículo (água). B) Gráfico de melanogênese. O conteúdo de melanina celular foi eluído em NaOH. Os dados de absorvância obtidos foram normalizados pelo número de células obtido após cada tempo de tratamento em A. O tratamento aumentou significativamente a produção de melanina no tempo de 72h. Foram realizados 3 experimentos independentes. As barras representam a mediana dentre os pontos. Teste Mann Whitney. ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,001$

FONTE: O autor (2016).

Produção de espécies reativas de oxigênio intracelular é aumentada na célula B16-F10 após tratamento com Thuya 30CH

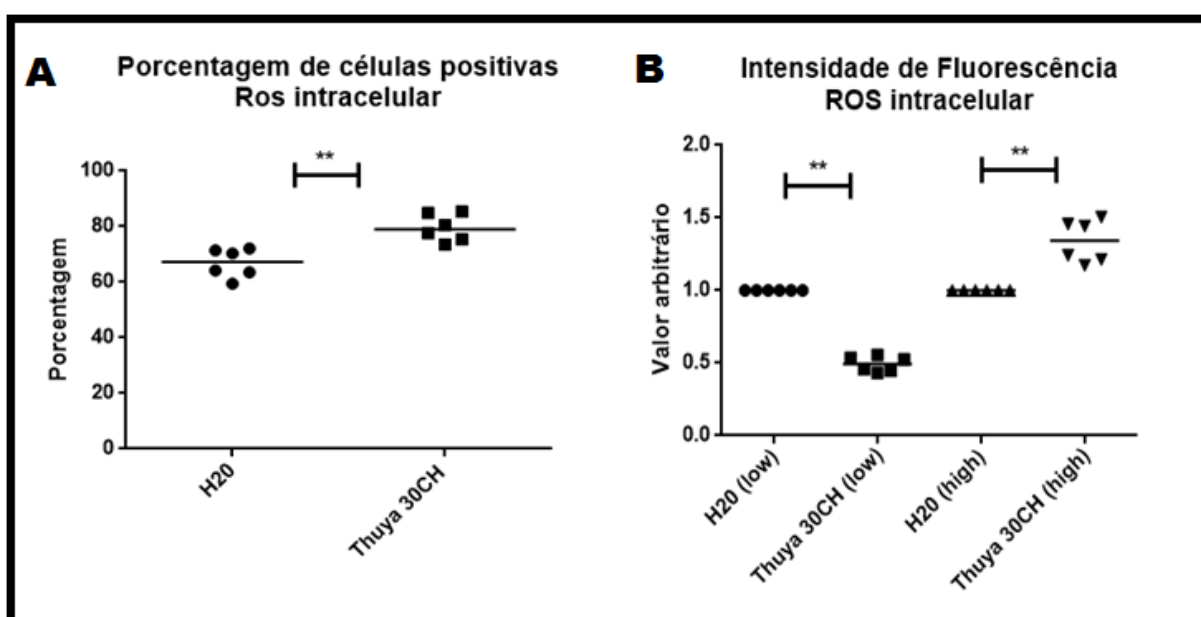
O processo de melanogênese é descrito como sendo uma via metabólica, que quando está aumentada gera desequilíbrio de espécies reativas, e principalmente a produção de espécies reativas de oxigênio é alterada, levando ao aumento de ROS intracelular (D'MELLO, 2016). Esse aumento de espécies reativas poderia ser a razão da diminuição da quantidade de células encontradas anteriormente no ensaio de proliferação celular, já que quando essas moléculas estão aumentadas e livres na célula, podem ser gerados diversos distúrbios, como alteração da funcionalidade de organelas, alteração do ciclo celular, e até levar a morte da célula.

Por esse motivo, foi realizado ensaio utilizando a sonda fluorescente DCFH-DA, que quando entra na célula é capaz de detectar principalmente peróxido de hidrogênio livre. O ensaio foi realizado após o tratamento de 72h, e foi verificado que

Thuya 30CH tem capacidade de aumentar significativamente a produção de ROS intracelular quando comparado à porcentagem de células positivas do tratamento com a do controle (água).

Além disso, foi possível verificar duas populações diferentes de células B16-F10 marcadas com a sonda. Uma das populações foi chamada de "Low", onde as células dessa população apresentaram uma intensidade de fluorescência pequena, e outra população foi chamada de "High" que abrange as células que apresentaram fluorescência de maior intensidade que a outra população. Quando comparadas foi observado que o tratamento com Thuya 30CH diminuiu a intensidade de fluorescência da população "Low", e agiu de forma diferente na população High, aumentando a intensidade de fluorescência dessas células. (FIGURA 6).

FIGURA 6 – PRODUÇÃO INTRACELULAR DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO PELAS CÉLULAS B16-F10 APÓS TRATAMENTO COM THUYA 30CH



As células foram tratadas com Thuya 30CH por 72 horas em placas de 6 poços. Posteriormente, foi realizado o ensaio com a sonda fluorescente DCFH-DA que detecta ROS intracelular através de citometria de fluxo. A) Gráfico da porcentagem de células positivas: foi observado aumento da quantidade de células marcadas com a sonda fluorescente DCFH-DA. B) Gráfico da intensidade de fluorescência das populações Low e High: o tratamento com Thuya 30CH por 72h aumentou a intensidade de fluorescência das células da população High, e diminuiu a intensidade de fluorescência da população Low. Foram realizados 6 experimentos independentes e cada ponto representa um experimento, a barra horizontal representa a mediana dos dados. Mann Whitney $**p < 0,005$.

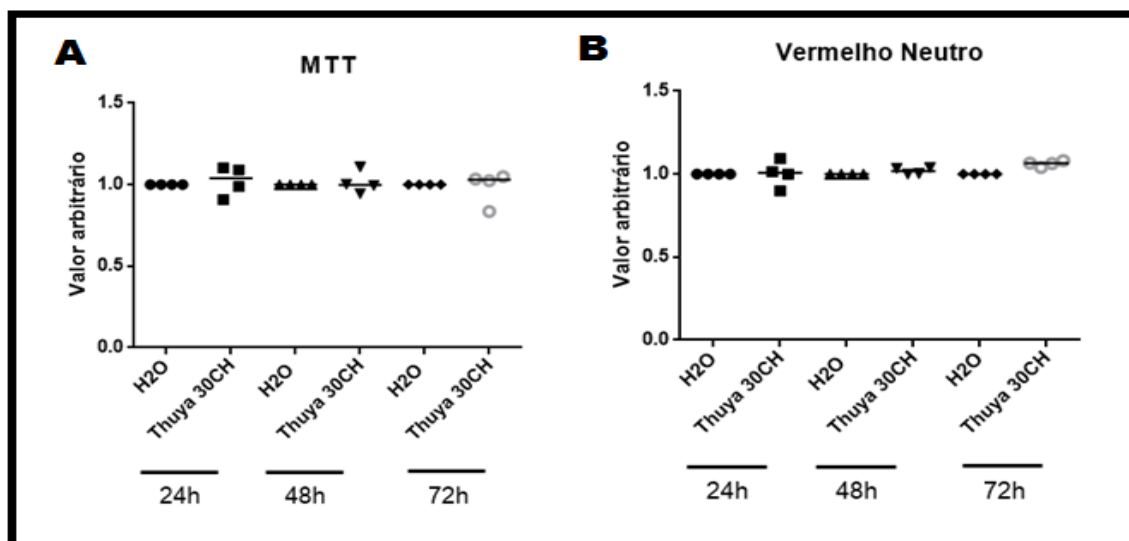
FONTE: O autor (2016).

Padrões de funcionalidade de organelas da célula B16-F10 não são alterados após o tratamento com Thuya 30CH

Após verificar que o composto Thuya 30CH estava alterando características intrínsecas muito bem descritas no melanoma como proliferação celular, e também aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio, foram realizados ensaios que analisam as funcionalidades da célula, como atividade mitocondrial, atividade lisossomal e potencial de membrana mitocondrial. Como a proliferação celular observou-se diminuída após o tratamento, o objetivo a seguir foi verificar a forma que o tratamento poderia estar levando a essa diminuição, já que o aumento de ROS intracelular pode causar danos de diversas formas dentro da célula. Por isso foram utilizados ensaios que verificam se as organelas das células de B16-F10 estavam sofrendo perda de funcionalidade, prejudicando a proliferação celular.

Primeiramente foram feitos os ensaios de MTT e Vermelho Neutro, dois ensaios colorimétricos que avaliam, respectivamente, a funcionalidade mitocondrial e lisossomal, organelas responsáveis por vários processos importantes dentro da célula. Após tratamento de 24, 48 e 72h com Thuya 30CH, não foi possível verificar diferenças significativas entre o tratamento e o controle (água), tanto para o ensaio de MTT quanto para o de Vermelho Neutro. (FIGURA 7).

FIGURA 7 – FUNCIONALIDADE DE MITOCONDRIAS E LISOSSOMOS DE CÉLULAS B16-F10 APÓS TRATAMENTO COM THUYA 30CH



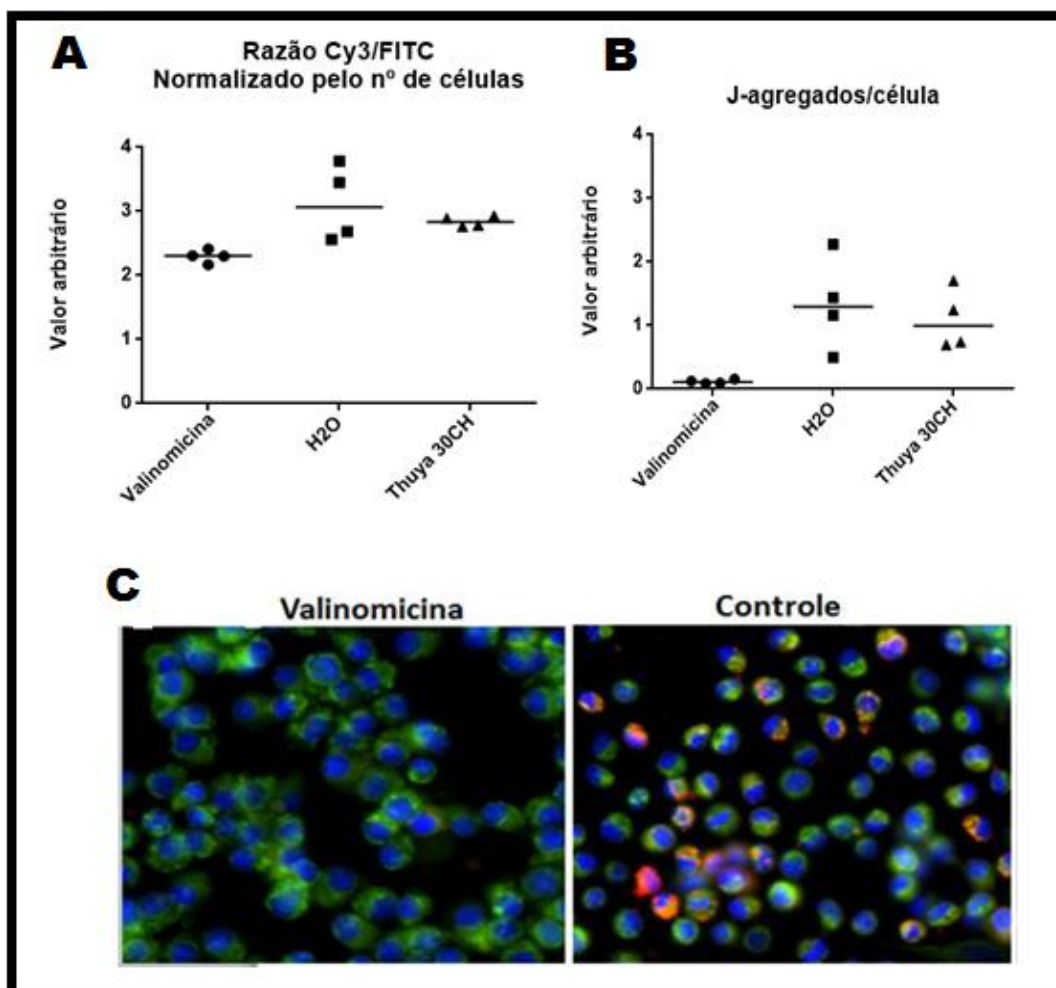
As células foram tratadas com Thuya 30CH por 72 horas em placas de 96 poços. Posteriormente, foram realizados os ensaios colorimétricos MTT e Vermelho Neutro que avaliam, respectivamente, a atividade mitocondrial e lisossomal. A) Gráfico do ensaio de MTT: Não foi observada nenhuma alteração da funcionalidade mitocondrial após o tratamento. B) Gráfico de Vermelho Neutro: Não foi observada nenhuma alteração da funcionalidade lisossomal após o tratamento. Foram realizados 4 experimentos independentes e cada ponto representa a média de triplicatas de um experimento, os dados foram normalizados pelo número de células e a barra horizontal representa a mediana dos dados. Teste Mann Whitney.

FONTE: O autor (2016).

Como nos ensaios de MTT e Vermelho Neutro não foram observadas diferenças significativas após o tratamento, foi utilizada a sonda fluorescente JC-1 por ser mais sensível que ensaios colorimétricos, e ser capaz de detectar alterações discretas no potencial de membrana mitocondrial.

Porém após 72h de tratamento com Thuya 30CH também não foi possível verificar alteração no potencial de membrana mitocondrial. Foi avaliada a razão das duas fluorescências (verde e vermelho) e também a quantidade de J-agregados formados por célula, e nenhum dos dois apresentou diferenças significativas. (FIGURA 8).

FIGURA 8 – ANÁLISE DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL DE CÉLULAS B16-F10 APÓS O TRATAMENTO COM THUYA 30CH



As células B16-F10 foram plaqueadas e tratadas com Thuya 30CH por 72h e após foi realizado ensaio com a sonda fluorescente JC-1 que avalia o potencial de membrana mitocondrial. A) Gráfico da razão entre as fluorescências vermelha e verde, o composto não mostrou diferenças significativas na razão entre as fluorescências comparado com o veículo. B) Gráfico da quantidade de J-agregados formados por célula, e Thuya 30CH também não foi capaz de alterar significativamente a quantidade comparada com o veículo. A valinomicina foi usada como controle positivo, e no gráfico fica possível verificar que não há J- agregados formados. C) Imagens obtidas no equipamento ImageXpress Micro® High Content Screening. Os campos são aleatórios e ilustrativos. Na imagem pode ser visto o controle positivo usado: valinomicina, com células apresentando monômeros de JC-1 no citoplasma celular (em verde). No controle é possível verificar que ocorreu a formação de J-agregados (em vermelho) como consequência do potencial de membrana mitocondrial (superpolarizado). Núcleo celular corado em azul. Foram realizados 2 experimentos independentes com 2 replicatas cada, e cada ponto representa uma replicata. A barra horizontal representa a mediana dos dados. Teste Mann Whitney.

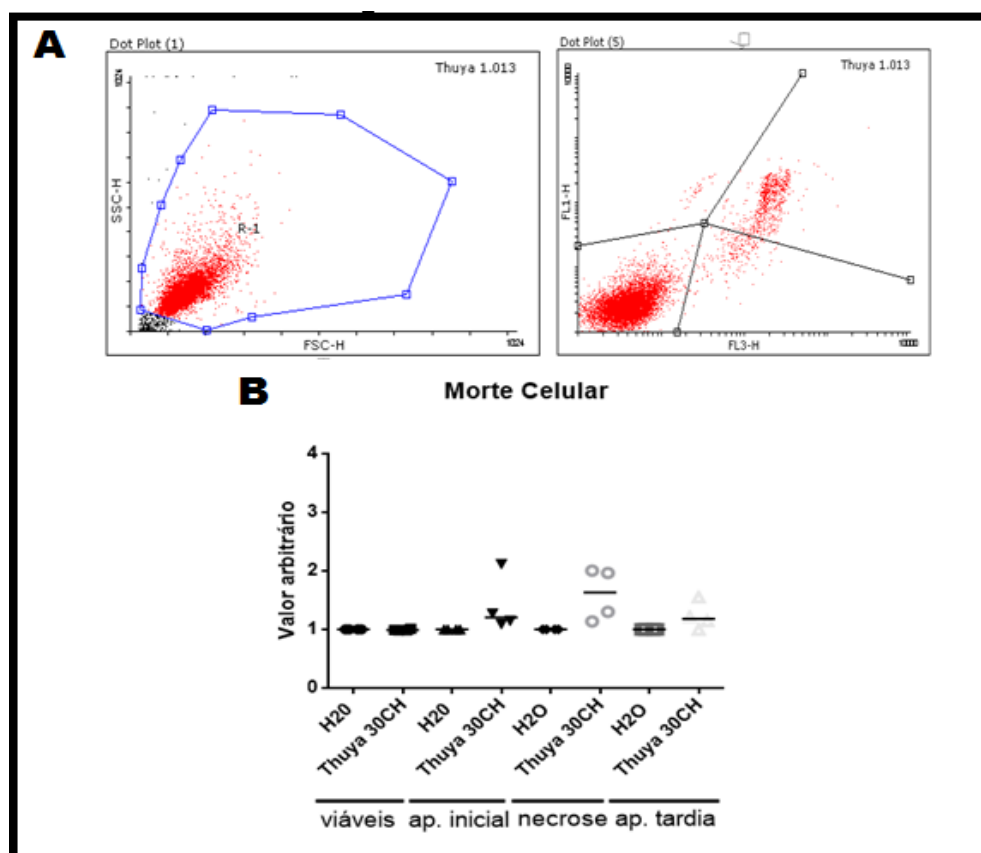
FONTE: O autor (2016).

Morte celular não é induzida na célula B16-F10 após o tratamento com Thuya 30CH

A morte celular é um processo que pode ser natural ou induzido por algum tratamento ou patogenia. Foi considerado importante para este trabalho verificar se o tratamento com Thuya 30CH nas células B16-F10 poderia estar levando as células a algum tipo de morte. Na busca de justificar a diminuição da proliferação celular encontrada inicialmente, foi realizado o ensaio com Anexinina V/7AAD, que detecta morte celular por apoptose e por necrose, respectivamente.

As células foram tratadas por 72h, e na análise dos dados as células foram classificadas através de citometria de fluxo em células viáveis (quadrante inferior esquerdo), células em apoptose inicial (quadrante superior esquerdo), células em processo de necrose (quadrante inferior direito) e células em necrose e apoptose tardia (quadrante superior direito), dependendo da presença de marcação para cada marcador (FIGURA 9). Não foi observada diferença significativa no grupo tratado com Thuya 30CH em comparação com a água.

FIGURA 9 – MORTE DE CÉLULAS B16-F10 APÓS TRATAMENTO COM THUYA 30CH



As células B16-F10 foram plaqueadas e tratadas com Thuya 30CH por 72h e após foi realizado o ensaio com anexina V/7AAD para detectar os diferentes tipos de morte celular através de citometria de fluxo. A) Dot plot e histograma ilustrativos das células B16-F10 marcadas com anexina V/7AAD. B) Gráfico apresenta a taxa de diferentes tipos de morte como apoptose inicial, necrose e apoptose tardia além de células viáveis. Thuya 30CH não foi capaz de induzir significativamente nenhum tipo de morte celular quando comparado com o veículo. Foram realizados 4 experimentos independentes e cada ponto representa um experimento, a barra horizontal representa a mediana dos dados. Teste Mann Whitney.

FONTE: O autor (2016).

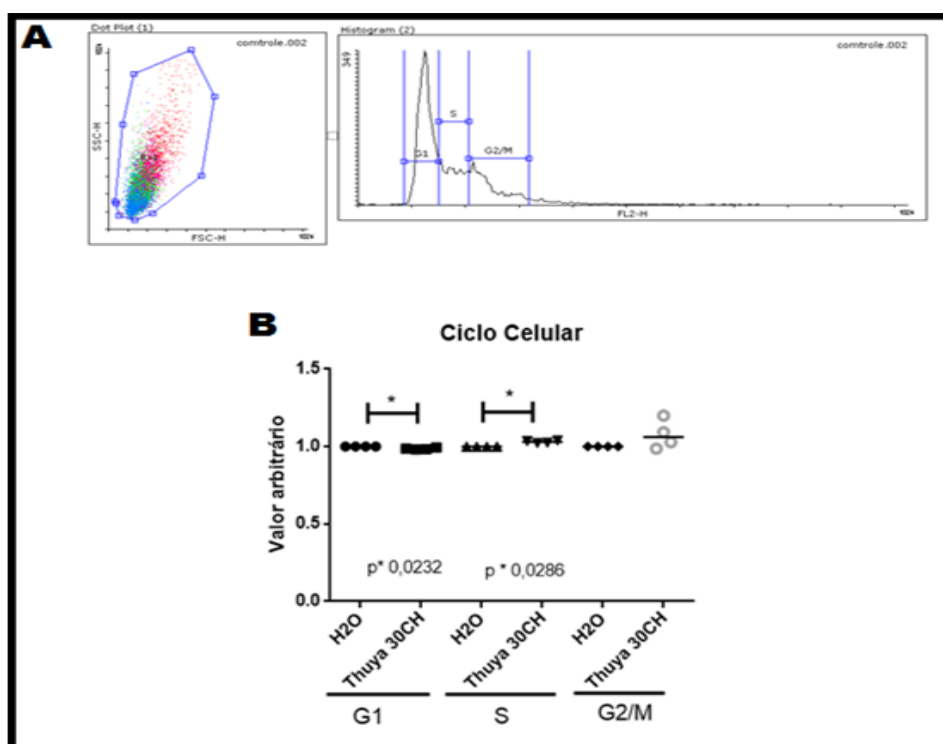
O ciclo celular de células B16-F10 é alterado após o tratamento com Thuya 30CH

Como no ensaio de morte celular não foi observada alteração nas taxas de morte após o tratamento com Thuya 30CH comparando com o veículo, pode-se dizer que essa não é a forma como o tratamento está diminuindo a quantidade de células observadas no ensaio de cristal violeta. Uma vez que foram testadas outras maneiras que poderiam estar alterando as células tratadas com Thuya 30CH, como

a funcionalidade de organelas e a taxa de morte, e como nenhuma delas mostrou alteração, o próximo passo foi verificar se o tratamento poderia estar alterando o ciclo das células B16-F10, já que o aumento de ROS intracelular também é capaz de alterar esse processo. (SHACKELFORD, 2000).

Como as células tratadas são de melanoma (B16-F10) é interessante que o tratamento realize a parada do ciclo, ou pelo menos diminua a velocidade das fases. Foi observada diminuição significativa no número de células na fase G1 (fase onde a célula está crescendo) após o tratamento com Thuya 30CH, e aumento no número de células na fase S (fase onde ocorre a duplicação do material genético). Sendo assim, é possível inferir que o tratamento promove acúmulo de células na fase S e parada na progressão do ciclo celular, uma vez que há redução de células em G1 e nenhuma alteração em G2 e conseqüentemente, levando a lentidão maior do que o tempo normal para realizar as etapas do ciclo (FIGURA 10).

FIGURA 10 – ANÁLISE DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS B16-F10 APÓS TRATAMENTO COM THUYA 30CH



As células B16-F10 foram plaqueadas e tratadas com Thuya 30CH por 72h e após foi realizado o ensaio com PI/Rnase para detectar as diferentes fases do ciclo celular através de citometria de fluxo. A) Dot plot e histograma ilustrativos das células B16-F10 marcadas com PI/Rnase permitindo separar as fases de acordo com a quantidade de DNA. O Iodeto de propídio é possível ser detectado através do filtro FL3. B) Gráfico das fases do ciclo e a diferença de porcentagem de células em cada fase. Thuya 30CH foi capaz de aumentar significativamente a porcentagem células na fase S do ciclo celular quando comparado com o veículo. Foram realizados quatro experimentos independentes,

sendo que cada ponto representa a mediana da porcentagem de células em cada fase do ciclo normalizada pelo controle de cada experimento. As barras representam a mediana entre os pontos. Todos os dados foram comparados com o controle (água). Teste Mann Whitney. * $p < 0,05$.

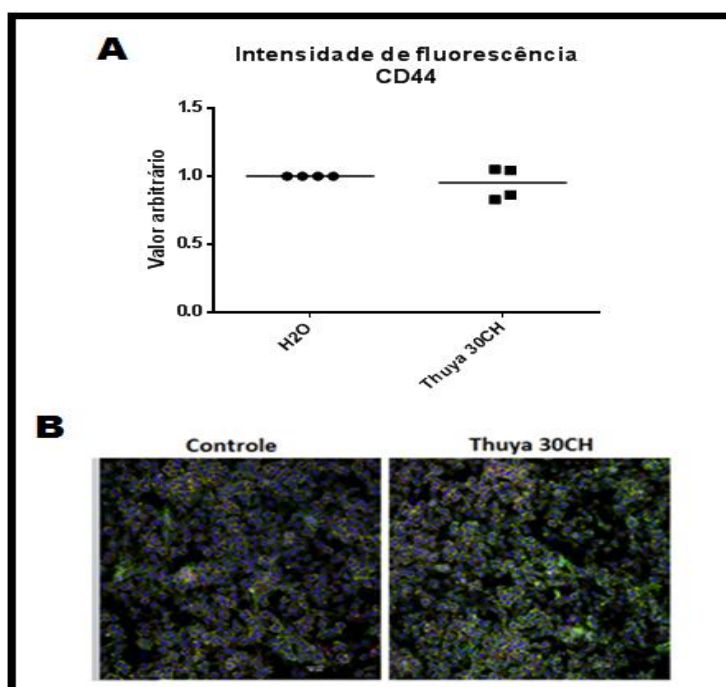
FONTE: O autor (2016).

Marcadores metastáticos e capacidade tumorigênica da célula B16-F10 são reduzidos após tratamento com Thuya 30CH

Em pacientes com melanoma é observado elevada expressão de CD44, que é o principal receptor para o ácido hialurônico e está intimamente relacionado ao alto risco de metástase, bem como à redução da sobrevivência. (DIETRICH *et al.*, 1997).

Por isso, foi realizada imunomarcação para citometria de fluxo e triagem de alto rendimento para verificar se a marcação para CD44 na superfície das células B16-F10 seria alterada pelo tratamento com Thuya 30CH. O tratamento com Thuya 30CH durante 72h não modificou a marcação para CD44 (FIGURA 11) nas condições testadas.

FIGURA 11 – DETECÇÃO DE CD44 EM CÉLULAS B16-F10 APÓS TRATAMENTO COM THUYA 30CH



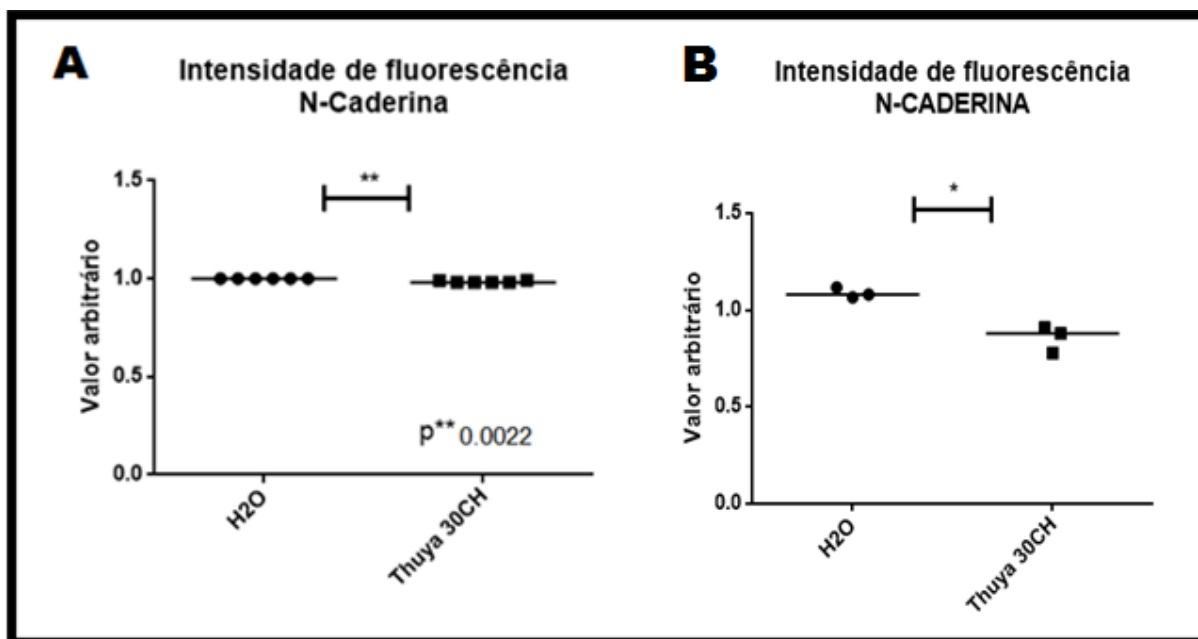
As células B16-F10 foram plaqueadas e tratadas com Thuya 30CH por 72h e após foi realizada a imunomarcação para CD44. A) Gráfico da intensidade de fluorescência de CD44 realizada através de citometria de fluxo. Não foi observada diferença significativa na quantidade de CD44 após o tratamento com Thuya 30CH. B) Imagem realizada no equipamento Molecular Devices, a imagem é aleatória e ilustrativa. Em verde marcação para CD44, em vermelho para actina e em azul para o

núcleo. Foram realizados 4 experimentos independentes para citometria de fluxo. As barras representam a mediana de todos os valores para cada grupo. Teste Mann Whitney.

FONTE: O autor (2016).

A N-caderina faz parte de uma família de moléculas de adesão chamadas caderinas, proteínas de adesão célula-célula. Elas são responsáveis por juntar e integrar milhões de células nos tecidos, já que cada célula original de um tecido expressa um tipo de caderina específico, e essas células com o mesmo tipo de caderina tendem a preferir aderir a células com o mesmo tipo específico. (TAKEICHI, 1990). Visto a importância da expressão de N-caderinas, já que células de melanoma são extremamente ágeis quanto à migração e invasão para novos tecidos (metástase), procurou-se verificar através de imunomarcações se o tratamento com Thuya 30CH alteraria a marcação para essa molécula em células B16-F10. A análise quantitativa por citometria de fluxo mostrou que Thuya 30CH foi capaz de reduzir significativamente a marcação quando comparada ao controle (FIGURA 12A). O padrão do resultado foi semelhante quando visto a análise por triagem de alto rendimento (FIGURA 12B).

FIGURA 12 – DETECÇÃO DE N-CADERINA EM CÉLULAS B16-F10 APÓS TRATAMENTO COM THUYA 30CH

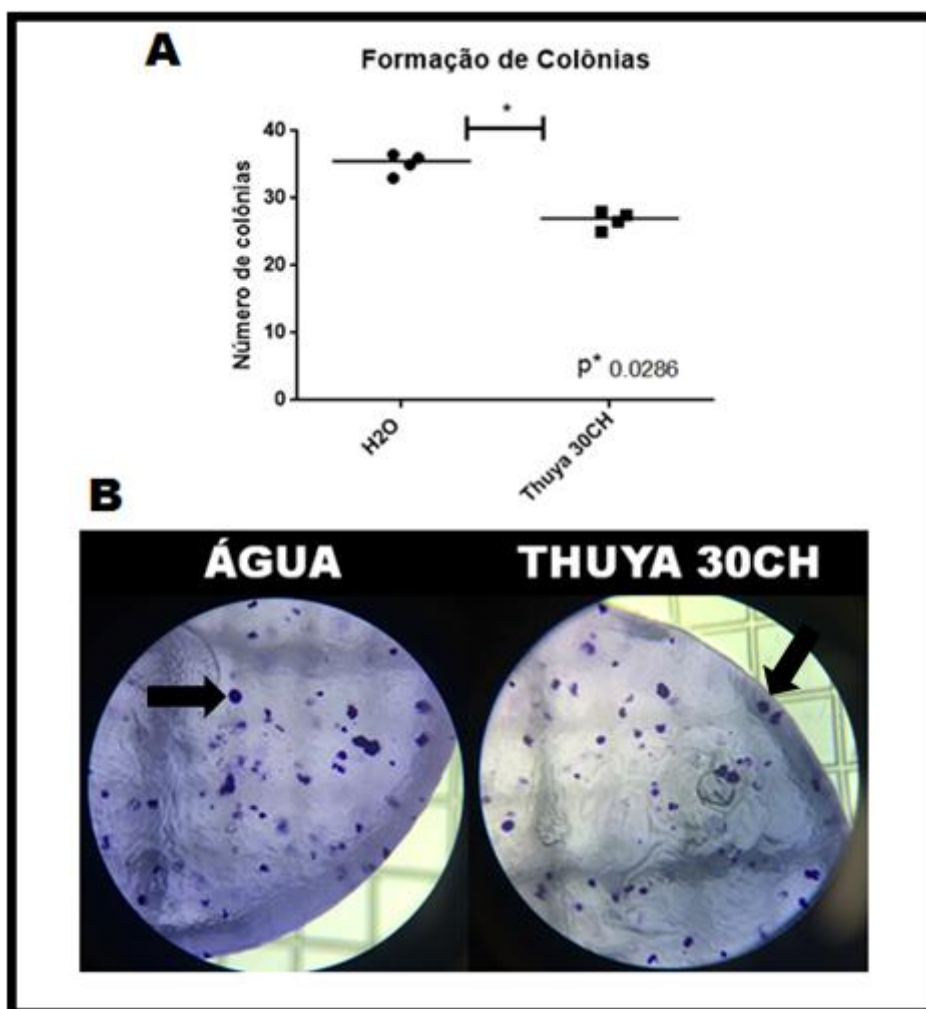


As células B16-F10 foram plaqueadas e tratadas com Thuya 30CH por 72h e após foi realizada a imunomarcagem para N-caderina. A) Gráfico da intensidade de fluorescência de N-caderina realizada através de citometria de fluxo onde pôde ser observada a diminuição significativa da quantidade de N-caderina após o tratamento com Thuya 30CH. Foram realizados 6 experimentos independentes. B) Thuya 30CH também reduziu a marcação das células para N-caderina quando analisadas em equipamento de triagem de alto rendimento. Foram realizados 3 experimentos independentes em duplicata. Para citometria de fluxo, os pontos representam a mediana da intensidade de fluorescência (MFI) normalizada pelo controle. Para os resultados da triagem de alto rendimento, os pontos representam os valores de intensidade obtidos normalizados pelo número de células de cada amostra. Todos os dados foram comparados com o controle (água) de cada experimento. As barras representam a mediana de todos os valores para cada grupo. Teste T Student * $p < 0,05$ e teste Mann Whitney ** $p < 0,005$.

FONTE: O autor (2016).

Após a análise de algumas moléculas da superfície celular de B16-F10, e verificar que N-caderina foi diminuída com o tratamento com Thuya 30CH, foi realizado o ensaio que mimetiza, *in vitro*, a formação de colônias, semelhantes a microtumores. Para ensaio de crescimento independente de ancoragem, as células foram previamente tratadas por 72h, soltas, replaqueadas em matriz de alginato na ausência de tratamento, e deixadas por determinado tempo para crescimento. O tratamento prévio com Thuya 30CH foi capaz de reduzir significativamente a quantidade de colônias formadas comparando com o veículo (água). (FIGURA 13).

FIGURA 13 – FORMAÇÃO DE COLÔNIAS PELAS CÉLULAS B16-F10 APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM THUYA 30CH



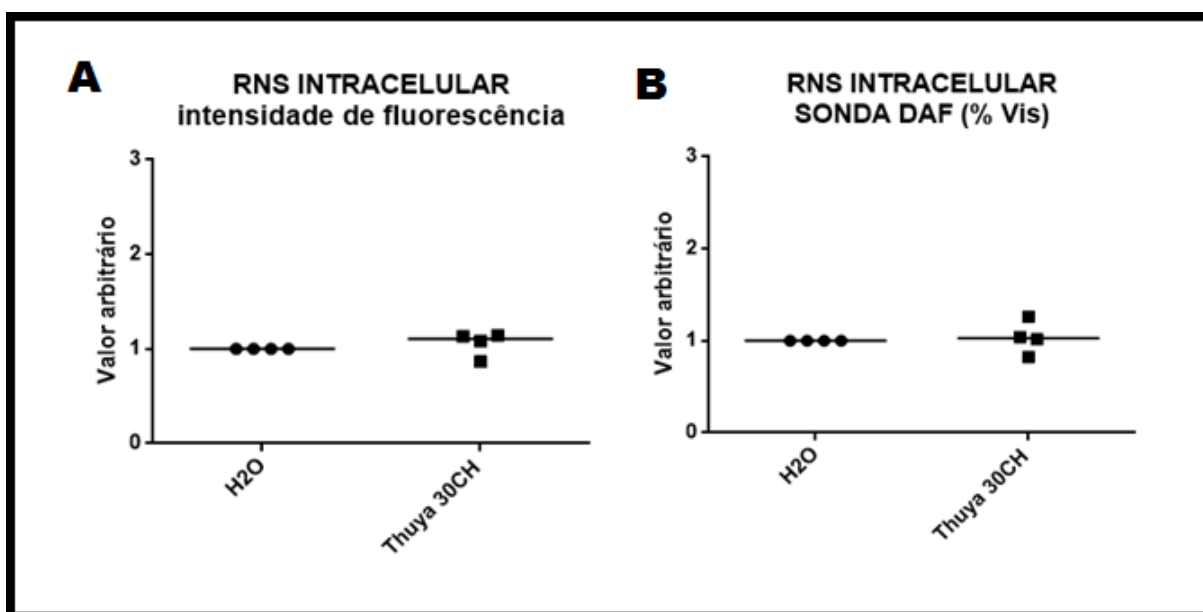
As células B16-F10 foram plaqueadas e tratadas com Thuya 30CH por 72h e após foi realizada o ensaio que avalia a capacidade de formação de colônias inseridas em uma matriz 3D de alginato. A) Gráfico da quantidade de colônias formadas. Foi observada diminuição significativa da quantidade de colônias após o tratamento com Thuya 30CH. As colônias com área maior que $0,009 \text{ mm}^2$ foram contadas usando o programa ImageJ. Os pontos do gráfico representam a média do número de colônias contidas nos 4 quadrantes da matriz de alginato de cada amostra. As barras representam a mediana dentre os pontos. Teste Mann Whitney. $*p < 0,05$. B) As matrizes de alginato contendo as colônias (setas) foram colocadas em placas de petri com fundo quadriculado (2 mm), divididas em 4 quadrantes e fotografadas sob estereomicroscópio.

FONTE: O autor (2016).

Produção de espécies reativas de nitrogênio (RNS) intracelular pelas células B16-F10 não foi alterada após o tratamento com Thuya 30CH

O ensaio com a sonda DAF-FM que detecta espécies reativas de nitrogênio, principalmente óxido nítrico, intracelular, foi realizado para verificar se o tratamento com Thuya 30CH poderia estar aumentando essas moléculas e consequentemente estimulando a produção de melanina como foi observado previamente. A produção de RNS intracelular não foi alterada após o tratamento por 72h, sendo que tanto a intensidade de fluorescência da marcação quanto a porcentagem de células marcadas pela sonda não foram alteradas. (FIGURA 14).

FIGURA 14 – PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO INTRACELULAR PELAS CÉLULAS B16-F10 APÓS TRATAMENTO COM THUYA 30CH



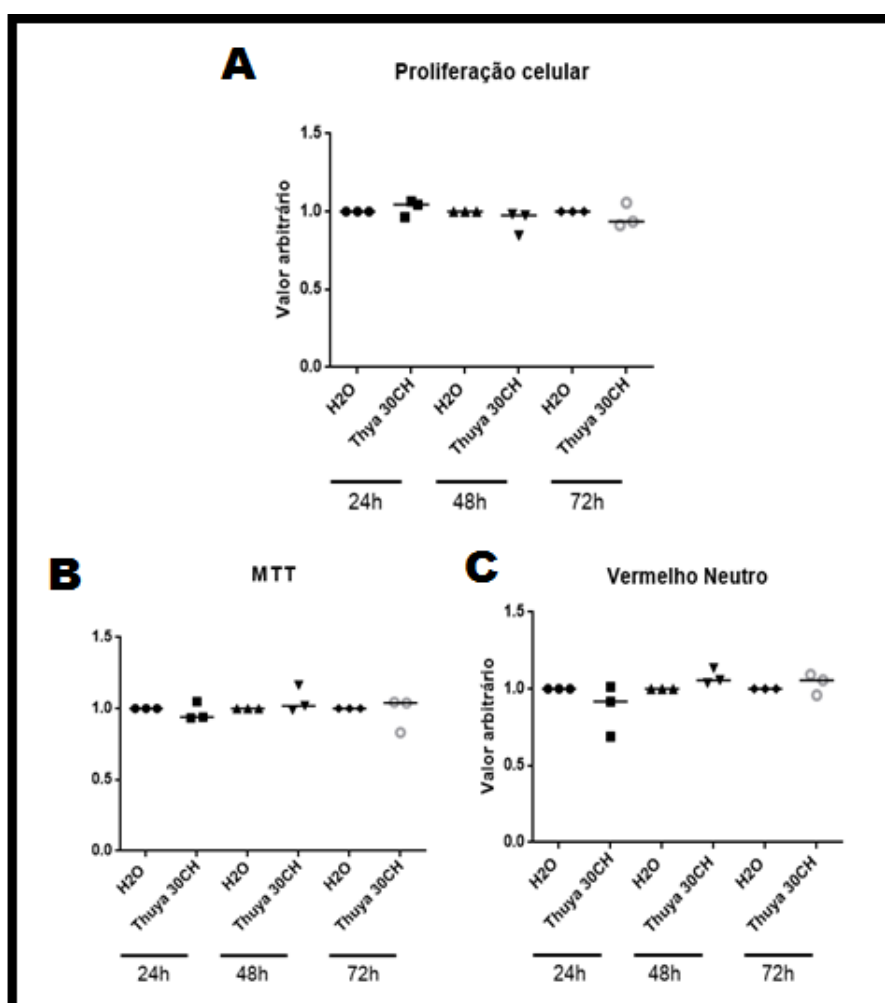
As células B16-F10 foram plaqueadas e tratadas com Thuya 30CH por 72h e então foi realizado o ensaio com a sonda fluorescente DAF-FM que detecta RNS intracelular. A) O tratamento com Thuya 30CH não alterou a intensidade de fluorescência das células comparada com o veículo. B) A porcentagem de células positivamente marcadas também não foi alterada significativamente pelo tratamento. Foram realizados 4 experimentos independentes. As barras representam a mediana dentre os pontos. Teste Mann Whitney.

FONTE: O autor (2016).

Proliferação e funcionalidade em células de fibroblastos Balb/3T3 não foram alteradas após o tratamento com Thuya 30CH

A fim de verificar se o tratamento *in vitro* de fibroblastos murinos Balb/3T3 com Thuya 30CH alterava o padrão de proliferação dessas células, as mesmas foram tratadas por até 72h horas e posteriormente coradas com cristal violeta. Os dados de proliferação celular do veículo foram comparados ao grupo correspondente da Thuya 30CH. Os dados obtidos mostraram que o tratamento não alterou a proliferação celular nas condições estudadas (tempo e concentração) (FIGURA 15 A).

FIGURA15 – PROLIFERAÇÃO CELULAR E ATIVIDADE MITOCONDRIAL E LISOSSOMAL DE CÉLULAS BALB/3T3 APÓS TRATAMENTO COM THUYA 30CH



As células Balb/3T3 foram plaqueadas e tratadas com Thuya 30CH por até 72h e então foram realizados os ensaios de proliferação celular através do corante cristal violeta, além de MTT para

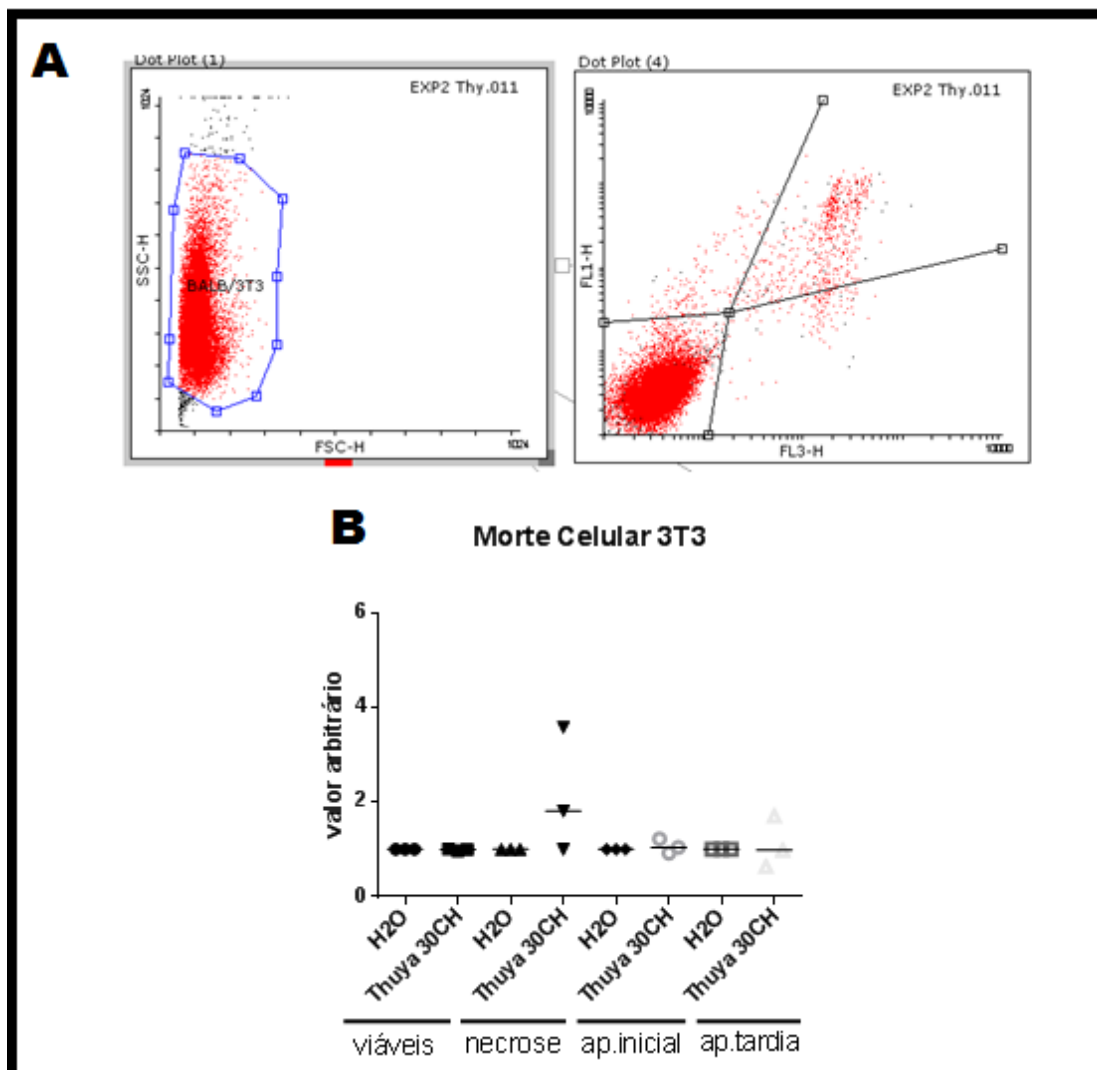
avaliar a atividade mitocondrial e o ensaio Vermelho Neutro para avaliar a atividade lisossomal. A) O tratamento não alterou a proliferação das células comparada com o veículo. B) Thuya 30CH também não alterou a funcionalidade das mitocôndrias comparado com a água. C) No ensaio de vermelho neutro o tratamento também não foi capaz de alterar a atividade lisossomal das células não tumorais Balb/3T3. Foram realizados 3 experimentos independentes, os dados de MTT e Vermelho Neutro foram normalizados pelo número de células. A barra horizontal representa a mediana dos dados. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparar os dados.

FONTE: O autor (2016).

Também foram realizados os ensaios de Vermelho Neutro e MTT que avaliam, respectivamente, a funcionalidade de organelas (lisossomos e mitocôndrias) para verificar se o tratamento com Thuya 30CH poderia estar causando alguma toxicidade às células de fibroblastos Balb/3T3. Nos tempos de 24, 48 e 72h de tratamento, não foram observadas alterações na funcionalidade dessas organelas (FIGURAS 15 B e C).

Além disso, também foi realizado o ensaio que avalia a taxa de morte das células a fim de verificar se o tratamento com Thuya 30CH poderia induzir algum tipo de morte celular em células normais ou não tumorais. E após o tratamento de 72h não foi verificado nenhum tipo de morte celular comparado com o veículo. (FIGURA 16).

FIGURA 16 – MORTE DE CÉLULAS BALB/3T3 APÓS TRATAMENTO COM THUYA 30CH



As células Balb/3T3 foram plaqueadas e tratadas com Thuya 30CH por 72h e então foi realizado o ensaio que avalia a taxa de morte de células através da marcação com anexina V/7AAD. A) Dot plot e histograma ilustrativos das células Balb/3T3 marcadas com anexina V/7AAD. B) Gráfico que apresenta a taxa de diferentes tipos de morte como apoptose inicial, necrose e apoptose tardia além de células viáveis. Thuya 30CH não foi capaz de induzir significativamente nenhum tipo de morte celular quando comparado com o veículo. Foram realizados 3 experimentos independentes, a barra horizontal representa a mediana dos dados. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparar os dados.

FONTE: O autor (2016).

7 DISCUSSÃO

Thuya occidentalis é amplamente utilizada na homeopatia e fitoterapia, e apresenta potencial imunofarmacológico demonstrado em inúmeros modelos, testados tanto *in vivo* quanto *in vitro*. (NASER et al., 2005). Alguns artigos trazem resultados interessantes utilizando *Thuya occidentalis* em células tumorais, demonstrando sua capacidade antitumoral. (SUNILA et al., 2007; BISWAS, 2011; PREETHI et al., 2012; MUKHERJEE et al., 2014; SAHA et al., 2014). Nesse trabalho, observou-se que o tratamento com *Thuya occidentalis* 30CH atua na célula de melanoma regulando negativamente suas características tumorigênicas e metastáticas. Inicialmente foi verificado que ocorreu aumento da produção de melanina pelas células, e menor proliferação celular (quantidade de células aderidas), após o tratamento com *Thuya* 30CH (FIGURAS 5). Tanto a melanogênese quanto a proliferação, são características intrínsecas fortemente relacionadas no melanoma, pois basicamente a função dessa célula, enquanto não tumoral, é produzir melanina, e quando se torna tumoral, no caso o melanoma, uma de suas características mais fortes é o rápido crescimento. Porém a melanogênese ainda é uma via que está sendo muito estudada, e as informações ainda não são conclusivas. (PASCO, 2004; BHATIA, TYKODI e THOMPSON, 2009; CERDEIRA, 2011; MARTÍ; SOROLLA; YERAMIAN, 2012; HOLMES, 2014; SHAIN, 2016; WHO, 2016). Por isso foi importante iniciar o estudo do composto *Thuya* 30CH verificando quais as alterações relacionadas a essas características poderiam ser manifestadas mediante o tratamento com este composto altamente diluído em células de melanoma B16-F10.

O processo de melanogênese é considerado um tópico importante, porém apesar dos recentes avanços, a regulação deste não é totalmente esclarecida. A melanina é produzida pelos melanócitos em seus melanossomas, sendo que essas células interagem com o sistema imunológico e inflamatório, e sua atividade pode ser regulada por fatores extrínsecos, tais como, fármacos e radiação ultravioleta, num processo complexo chamado de melanogênese (VIDEIRA, 2013). A produção e distribuição de melanina envolvem várias etapas: transcrição de proteínas melanogênicas, biogênese do melanossoma, classificação de proteínas melanogênicas nos melanossomas, transporte de melanossomas para as pontas

dos dendritos dos melanócitos e transferência para os queratinócitos. Esses eventos são fortemente regulados por uma variedade de fatores parácrinos e autócrinos em resposta a estímulos endógenos e exógenos, principalmente pela radiação UV (PARK, et al., 2009, D'MELLO, et al., 2016). Existem dois tipos de câncer de pele, os considerados não melanomas e os melanomas, a principal diferença entre eles em termos de função celular, é a produção de melanossomas no câncer tipo melanoma, que são organelas únicas adaptadas para a síntese de melanina em células produtoras desse pigmento. Com base em características morfológicas são classificados em quatro diferentes fases (I, II, III e IV) no decorrer da via de biogênese. Estudos sugerem que na fase IV da biogênese ocorre um aumento da sensibilidade ao tratamento por efeitos citotóxicos levando tais células a morte (menos resistente a drogas). (CHEN, et al., 2009, D'MELLO, et al., 2016). Portanto, pode-se fazer uma relação em que as células que tem mais melanossomo do tipo IV são menos resistentes a fármacos, levando à morte celular. O que foi demonstrado no nosso trabalho foi que houve aumento da produção de melanina, e diminuição da proliferação celular. Isso significa provavelmente que as células devem apresentar mais melanossomas de estágio IV e por isso há maior produção de melanina. Conseqüentemente, como nesse estágio as células ficaram mais sensíveis ao tratamento, ocorre uma queda de proliferação celular.

A via metabólica da melanogênese é relatada por produzir diversas espécies reativas de oxigênio, principalmente H_2O_2 , mas também várias outras espécies reativas que provocam um forte estresse oxidativo para os melanócitos, e também para as células de melanoma. Esse estresse oxidativo é considerado como resultado de desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes no interior da célula, e ele tende a aumentar quando a produção de melanina também está aumentada. (PERLUIGI, et al., 2003, MUNOZ-MUNOZ, et al., 2009, HUANG, et al., 2013). Visto que o tratamento com Thuya 30CH diminuiu a proliferação, e aumentou a produção de melanina, e que a via metabólica da melanogênese aumentada produz mais espécies reativas de oxigênio, foi investigado se o tratamento poderia estar aumentando também a produção de ROS intracelular. Foi visto que realmente, o aumento da melanogênese pelo tratamento teve como consequência aumento da produção de ROS nas células B16-F10 (FIGURA 6). As ROS possuem papel duplo quando o assunto é o desenvolvimento do melanoma. Concentrações muito altas

podem desencadear fatores antitumorais, porém em concentrações mais baixas podem levar ao acúmulo de mutações potencialmente oncogênicas (MEIERJOHANN, 2013). Em células neoplásicas o sistema antioxidante é fraco fazendo com que as ROS que são produzidas interfiram em processos que podem ajudar na progressão do tumor. Porém algumas terapias chamadas pró-oxidativas estão sendo desenvolvidas para induzir as células a apoptose, mas essa técnica pode ser considerada agressiva, pelo fato de que também pode prejudicar as células normais. Algumas enzimas que geram moléculas como H_2O_2 e aumentam a quantidade de ROS intracelular estão sendo estudadas para melhorar o tratamento de câncer (NISHIKAWA, 2008). Também em determinada concentração, chamada subletal, ROS podem agir como segundo mensageiro e regular a transcrição de vários genes que estão envolvidos no aumento da proliferação, da migração e da invasão celular (TOCHHAWNG *et al.*, 2013). Diversos estudos têm analisado o papel das ROS na migração celular e invasão, porém resultados diferentes têm sido publicados dependendo do tipo de ROS, da quantidade, do local onde é produzido, bem como do tipo celular. Sendo assim, percebe-se que o entendimento do papel das ROS no melanoma ainda tem que ser melhor estudado. Sabe-se também, que o aumento de ROS intracelular, quando presente em concentrações elevadas, pode provocar muitas alterações em diversos processos celulares, como funcionalidade de organelas, alterar o ciclo celular, e até levar a apoptose (WANG *et al.*, 2000; TOCHHAWNG *et al.*, 2013). Muitos compostos e complexos naturais altamente diluídos são usados diariamente pela população mundial, porém muitos deles nunca foram testados para saber o que são capazes de fazer aos diferentes tipos de células presentes no organismo. Sendo assim, é muito importante verificar se ocorrem injúrias celulares ou se, por exemplo, esse tratamento está prejudicando processos vitais da célula. O composto natural altamente diluído Thuya 30CH age na célula de forma negativa para o melanoma. Dessa forma, é importante determinar em que nível e de que forma esse composto está prejudicando essas células. Para isso, nossa hipótese foi de que, uma vez que o tratamento induz a produção de melanina, e que durante esse processo a produção de ROS intracelular é aumentada, a viabilidade celular esteja sendo afetada, visto que esses reativos causam danos aos processos que ocorrem normalmente na célula, podendo levá-las a morte (NISHIKAWA, 2008).

Compostos e complexos naturais altamente diluídos, como todo e qualquer medicamento e droga utilizada, podem alterar processos celulares e de alguma forma deixar a célula mais sensível, mais fraca, ou desestabilizada. (JUNCO, 2015). Dessa forma, para que saibamos se tal droga está prejudicando algum tipo celular, necessita-se verificar a viabilidade, no caso, quão saudável está essa célula. No caso do melanoma, quanto menos viável estiver, melhor para o paciente. Porém, quando se utiliza uma droga ela age em todos os tipos de célula e não apenas no tumor, por isso também se faz necessário verificar os danos causados em células normais. (REGAD, 2013). Quando o tumor primário de melanoma é originado, diversas outras células fazem parte do microambiente tumoral, inclusive os fibroblastos. Essas células muitas vezes são manipuladas pelas células de melanoma a produzir certas moléculas e também agir da forma que é convencional para a célula tumoral. (HANAHAN; COUSSENS, 2012; BALKWILL et al., 2012). Além disso, a maioria dos tratamentos que são utilizados contra o melanoma, além de matar as células do tumor, também prejudica e causam diversos danos para outras células do organismo, células não tumorais (ATALLAH; FLAHERTY, 2005; HANAHAN; COUSSENS, 2012). Para a segurança do uso de Thuya 30CH, é importante verificar se o tratamento poderia estar alterando a proliferação, a funcionalidade de organelas, e também a taxa de morte de células que são consideradas normais para o organismo, como os fibroblastos.

Para avaliar a viabilidade, utilizam-se ensaios onde se analisa o funcionamento das células, como o ensaio com o corante vermelho neutro, que verifica a capacidade de retenção e manutenção do corante em compartimentos com pH baixo, e também outro ensaio comum é com MTT, que é reduzido através de processos mitocondriais, demonstrando o funcionamento correto da organela. (MOSSMAN, 1983). Os resultados mostraram que, comparado com o veículo, não houve diferença na funcionalidade celular, ao menos nos processos celulares que os ensaios avaliam tanto nas células tumorais B16-F10 (melanoma), quanto nas células não tumorais Balb/3T3 (fibroblastos) (FIGURAS 7 e 15). Baseando-se nesses resultados, pode-se concluir que a diminuição do número de células de melanoma após tratamento com Thuya 30CH não se deve à redução da viabilidade dessas células. Como o tratamento inicialmente levou a menor proliferação celular, alguma via estava sendo afetada na célula de melanoma pelo tratamento com Thuya 30CH,

e como os ensaios que avaliam a funcionalidade mitocondrial e lisossomal não mostraram nenhuma alteração significativa, partimos para um estudo mais refinado do funcionamento mitocondrial nas células de melanoma.

A mitocôndria apresenta grande riqueza de funções dentro da fisiologia celular, além da função no metabolismo energético (ZOROV et al, 1997; KOWALTOWSKI, 2000). Sua matriz consiste num espaço de alta capacidade para o armazenamento de íons Ca^{2+} (revisado por GUNTER E GUNTER, 2001) e contém enzimas essenciais para a síntese de ureia e modificação de grupos heme (ATAMNA et al., 2002). Além disso, o funcionamento da cadeia respiratória garante baixas tensões de oxigênio intracelular, evitando oxidações indesejáveis, ao mesmo tempo a cadeia de transporte de elétrons também é um dos principais geradores de radicais livres e espécies reativas de oxigênio sinalizadoras ou danosas às células. (WALLACE, 1999). A mitocôndria contém ainda uma variedade de proteínas envolvidas na regulação da morte celular por apoptose, um processo altamente regulado de eliminação celular que é dependente de energia (DANIAL e KORSMEYER, 2004).

Alguns tratamentos contra o câncer induzem a célula cancerígena à morte e se faz necessário saber qual o mecanismo que este tratamento utiliza para chegar a tal ponto. A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos, como dano ao DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas. Esse desequilíbrio induz a apoptose. (HENGARTNER, 2000). A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial). A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular como danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Os sinais que são traduzidos em resposta a estes problemas convergem principalmente para a mitocôndria (DESAGHER, et al., 2000).

Inúmeros estudos sobre apoptose apontam a mitocôndria como o principal mediador desse tipo de morte. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes. Quando sinais de morte alcançam a mitocôndria, levam ao colapso do potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi$), bem como a uma transição da permeabilidade mitocondrial (TPM) (LOEFFLER et al., 2000). Dessa

forma, utilizamos a sonda JC-1 para avaliar o potencial de membrana mitocondrial, podendo indicar se o tratamento com Thuya 30CH estaria afetando drasticamente a célula. A resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é uma via importante no início da apoptose. (PETROS et al., 2004). A permeabilidade geral à água aumenta, fazendo com que ela alcance a matriz mitocondrial, levando à ruptura da organela e consequente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma. (LOEFFLER et al, 2000 e GUPTA, 2003). Além da liberação de moléculas pela mitocôndria, a despolarização do $\Delta\psi$ e TPM levam à perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS). (KROEMER, et al., 2000). O aumento nos níveis de ROS leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso do $\Delta\psi$. (GREEN, et al., 2004). Portanto, a resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é uma via importante no início da apoptose.

Falado sobre a importância e riqueza de funções da mitocôndria, não é surpreendente constatar que sua integridade e funcionalidade possam afetar a viabilidade das células. (OLDENBURG et al., 2003). Como verificamos que a proliferação celular foi diminuída após o tratamento, e que os ensaios de MTT e Vermelho Neutro não mostraram alterações na funcionalidade de tais organelas (FIGURA 7), foi de grande interesse analisar a integridade da mitocôndria, pois caso essa integridade tenha sido perdida com o tratamento, pode-se indicar uma via para que Thuya 30CH diminua a proliferação celular. Entretanto, o tratamento com Thuya 30CH não foi capaz de alterar o potencial de membrana mitocondrial de células B16-F10, demonstrando que a mitocôndria continua com a sua integridade e funcionalidade (FIGURA 8).

Os ensaios de viabilidade celular baseados na coloração com MTT e vermelho neutro, realizados neste trabalho, são aplicados às células aderidas na placa. Portanto, não foram avaliadas as células que, porventura, tenham morrido e/ou se soltado da placa em decorrência do tratamento. Foram realizados três diferentes testes que avaliam a funcionalidade e integridade de organelas importantes para a viabilidade celular, e nenhum dos ensaios mostrou alteração. Porém, esses ensaios levam em consideração apenas as células aderidas. Sendo assim, todas as células constantes nas placas foram submetidas à análise de taxa de morte celular, verificando se após 72h de tratamento as células poderiam estar

morrendo, e conseqüentemente se soltando da placa, o que justificaria a diminuição da quantidade de células aderidas encontradas no ensaio de cristal violeta.

Naturalmente, ocorrem diversos processos que podem levar a célula à morte. Dentre os tipos de morte podemos citar apoptose e necrose. A apoptose é o processo identificado como morte celular programada, onde a célula recebe sinais extrínsecos ou intrínsecos para que ela inicie um processo de morte. Ela é considerada uma via natural de morte, resultante da ativação de endonucleases e subsequente redução do DNA a fragmentos nucleossomais (ROSEN & CASCIOLA-ROSEN, 1997; SALGAME et al., 1997). Esse processo, denominado apoptose, pode se diferenciar da necrose através da observação de alterações morfológicas. Na apoptose ocorre a diminuição do volume celular, a condensação da cromatina e a formação de corpos apoptóticos. Já na necrose ocorre caracteristicamente o aumento do volume celular e degradação nuclear (KANNAN & JAIN, 2000). Outra característica importante é que os transtornos metabólicos que ocorrem durante a necrose promovem lesões osmóticas na membrana plasmática, o que, por outro lado, é muito preservado durante a apoptose (CZABOTAR, 2014). Quando a apoptose é inicial, os resíduos de fosfatidilserina são redistribuídos da face interna à face externa da bicamada lipídica da membrana plasmática (MOURDJEVA et al., 2005). A exposição de fosfatidilserina na superfície das células apoptóticas ocorre anteriormente à fragmentação do DNA e aos "blebs" - formação de vesículas na membrana plasmática (MARTIN et al., 1995; BLANKENBERG et al., 1998). O aumento progressivo da permeabilidade da membrana plasmática, por outro lado, apresenta-se como alteração morfológica típica das células apoptóticas tardias ou inviáveis (ASHKENAZI, 2014) demonstrando que ao final desse processo ele acaba se assemelhando ao processo de necrose. Diversos trabalhos recentes demonstram que tratamento com compostos naturais altamente diluídos tem levado à apoptose de células tumorais. Arora e Tandon (2015) analisaram a ação de *Ruta graveolens* em células de câncer de colo uterino humano, e verificaram aumento de apoptose após o tratamento. Também o composto *Condurango* nas potências de 6CH e 30CH demonstraram levar a apoptose células H460 de câncer de pulmão (SIKDAR, 2014). Porém, nos experimentos realizados com células tratadas com Thuya 30CH não foi possível detectar indução significativa de morte celular após o tempo estudo (FIGURA 9).

Como observado nos resultados, o tratamento altera o metabolismo da produção de melanina (melanogênese) e esse processo se torna aumentado após o tratamento. A via da melanogênese é conhecida por produzir ROS intracelular, e quando aumentada pode produzir em maiores quantidades, o que também foi verificado nos resultados obtidos. O aumento de ROS intracelular pode alterar processos e até levar a célula à morte. Porém, não houve alterações na funcionalidade de organelas nem indução de morte celular. Portanto, a hipótese de que as células estavam morrendo, justificando a menor proliferação celular, foi negada. Dessa forma, investigamos outro processo que pode ser alterado por ROS e que pode levar a diminuição da proliferação celular: o ciclo celular da B16-F10. Decidiu-se realizar o ensaio de ciclo celular, pois pode ser um meio para que o tratamento altere o padrão de proliferação celular.

O ciclo celular é o conjunto de processos que se passa numa célula viva entre duas divisões celulares. O ciclo celular consiste na interfase e na fase mitótica, que inclui a cariocinese (divisão do conteúdo genético) e a citocinese (divisão celular). A interfase é o período entre o final de uma divisão celular e o início da outra e geralmente células normais encontram-se nessa fase durante a maior parte da sua vida. Já a fase mitótica é um período de intensa atividade na célula, pois ocorre a duplicação do material genético. A interfase divide-se em três fases: G1, S e G2. Na fase G1 são sintetizadas muitas proteínas, enzimas e RNA, também ocorre à formação das organelas celulares e, por consequência, a célula cresce. Na fase S ocorre a replicação das moléculas de DNA. Na fase G2 ocorre a síntese das moléculas e organelas necessárias para a divisão celular, e a célula já apresenta o dobro da quantidade de DNA, e está pronta para se dividir. As fases G e S possuem essas denominações em decorrência de abreviações do inglês - G para *gap* (intervalo) e S para *synthesis* (síntese). Também se encontra na literatura uma fase chamada G0, onde uma célula permanece continuamente durante a interfase, interrompendo a divisão. É possível através de estímulos externos fazer com que a célula retorne para seu ritmo normal. (SHACKELFORD, 2000).

Considerando que a célula está se dividindo para formar duas células a partir de uma, o material genético, no caso o DNA, é duplicado. Para se analisar o ciclo celular através de citometria de fluxo, deve ser levada em consideração a quantidade de DNA presente nas células em cada fase do ciclo. O iodeto de propídio

é um intercalante de DNA usado nesse ensaio analisado por citometria de fluxo. É possível detectar em qual fase do ciclo a célula se encontra através da intensidade de fluorescência das células marcadas, indicando que quando maior a quantidade de DNA, maior será a fluorescência. (DOUGLAS et al., 1995, KALEJTA et al., 1997). Como as células tratadas são de melanoma (B16-F10) é interessante que o tratamento realize a parada do ciclo, ou pelo menos diminua a velocidade das fases. Foi observada diminuição significativa no número de células, no tratamento com Thuya 30CH, na fase G1 onde a célula está crescendo, com consequente aumento no número de células na fase S, onde está ocorrendo à duplicação do material genético (FIGURA 10). Uma vez que a proliferação foi diminuída e que o tratamento foi capaz de alterar o ciclo celular, pode-se inferir que esteja ocorrendo uma lentidão nas fases, maior do que o tempo normal para realizar as etapas do ciclo.

Estudos com novos tratamentos para o câncer demonstram que, quando ocorre a parada do ciclo celular na fase G2 as células conseqüentemente param de se duplicar e em seguida ocorre uma diminuição da proliferação celular. Era o esperado para Thuya 30CH, porém o tratamento com esse composto não parou o ciclo celular parecendo apenas deixá-lo mais lento. Samadi e colaboradores (2011) demonstraram em seu trabalho que o tratamento com o composto KU135 parou o ciclo celular na fase G2 e conseqüentemente diminuiu a proliferação celular. Em melanoma humano foi possível verificar a parada do ciclo celular em G2 e apoptose após a inibição de óxido nítrico e inibição de fator nuclear kB pelo tratamento com Curcumina (ZHENG et al, 2004). Esse resultado pode justificar a diminuição da quantidade de células aderidas encontradas no ensaio de proliferação celular, além de mostrar que Thuya 30CH pode ser considerado um agente antiproliferativo para o melanoma.

O próximo passo do estudo foi verificar se o tratamento com Thuya 30CH poderia estar alterando a expressão de moléculas envolvidas diretamente com a capacidade metastática da célula B16-F10. Essa linhagem celular de melanoma é conhecida e bem descrita pela facilidade e grande capacidade de migração e invasão, além de formação de novos tumores. (CHAMBERS, 2002). Já que o composto testado altera diversos processos celulares, e principalmente age como antiproliferativo de células de melanoma, é de grande importância analisar a ação também dessas características, como capacidade metastática e tumorigênica. Para

isso, inicialmente, foram realizadas imunomarcações que permitiram observar se o tratamento estava alterando expressão de moléculas de superfície importantes para a migração e adesão célula-célula, e que contribuem para a capacidade invasiva do melanoma.

CD44 é uma glicoproteína envolvida em interações célula-célula, migração e adesão celular. Nas células de melanoma ele é conhecido por ter uma elevada expressão e está intimamente relacionado ao alto risco de metástase (DIETRICH et al., 1997). Esse receptor pode também se ligar a diferentes componentes da matriz extracelular, como colágenos, fibronectina, condroitim sulfatos (GOODISON et al., 1999; ARUFFO et al., 1990), facilitando o movimento de células que o possuem, como as de melanoma. Sabe-se que a interação do ácido hialurônico com o CD44 - principal receptor para essa molécula - presente na superfície das células tumorais desencadeia sinais para vários processos importantes para a progressão do melanoma, inclusive estimulando a migração. (SIRONEN et al., 2011).

Já foi visto que quando é inibida a ligação de CD44 ao ácido hialurônico ocorre redução na formação de metástases pulmonares *in vivo* e gera capacidade de prolongamento da sobrevivência dos animais com os tumores, o que mostra que CD44 possa ter um papel importante no estabelecimento de metástases e novas colônias de melanoma no pulmão. (MUMMERT et al, 2003). Quando analisada a expressão de CD44 foi visto que ela tende a ser mais intensa ao longo da progressão do melanoma (AHRENS, THOMAS et al., 2001). Em 2014, Potrich mostrou que o tratamento *in vitro* com complexos naturais altamente diluídos reduz a produção/secreção de ácido hialurônico pelas células de melanoma, bem como a expressão de enzimas responsáveis pela degradação dessa molécula. Em 2016, Gonçalves mostrou que um daqueles complexos também reduzia diretamente a expressão de CD44 em B16-F10. O CD44 também é capaz de estimular a produção da metaloproteinase de matriz MMP-2, que é responsável pela degradação de diferentes matrizes extracelulares e, conseqüentemente, facilita a capacidade de migração e invasão de células de melanoma (TAKAHASHI et al., 1999). Nesse trabalho, realizamos imunomarcação para citometria de fluxo e triagem de alto rendimento para verificar se a marcação para CD44 na superfície das células B16-F10 seria alterado pelo tratamento com Thuya 30CH. O tratamento não modificou tal marcação (FIGURA 11).

Em seguida, investigamos a expressão de outra molécula fundamental para a capacidade invasiva das células de melanoma, a N-caderina, que pertence a uma família de moléculas de adesão célula-célula. Para que as caderinas funcionem normalmente elas precisam da presença de íons cálcio. Elas são responsáveis por juntar e integrar milhões de células em diferentes tecidos, já que as células que expressam um tipo de caderina tendem a preferir aderir a células com o mesmo tipo de caderina. (TAKEICHI, 1990). Há uma diferença de caderinas de tecidos epiteliais e de tecidos mesenquimais. Tecidos epiteliais normalmente apresentam a E-caderina. Quando melanócitos ainda não sofreram malignização, expressam E-caderina, que é capaz de mantê-los ligados aos queratinócitos controlando seu crescimento. Porém quando ocorre processo de formação em tumor, as células podem sofrer alterações nessas caderinas, passando a expressar N-caderina, característica de tecidos mesenquimais. Conseguindo assim rapidamente se libertar do controle dos queratinócitos e passando a ter afinidade maior pelos fibroblastos e, conseqüentemente, favorecendo a invasão de tecidos adjacentes. Estando na derme, o melanoma tem maior chance de acesso aos vasos sanguíneos, cujas células também expressam N-caderina. Portanto, a N-caderina favorece o escape das células do tumor primário, e também auxilia a interação com células endoteliais para adentrar a circulação sanguínea, indicando portanto a aquisição de capacidade metastática. (LI et al., 2001; WHEELLOCK et al., 2008). Além disso, a adesão celular por N-caderina pode ativar uma via antiapoptótica através de AKT, que pode contribuir para a sobrevivência dessas células. (LI et al., 2001).

Sabendo da devida importância que há entre o balanço de E e N-caderinas em processos metastáticos, verificou-se por imunomarcção se o tratamento com Thuya 30CH poderia alterar a marcação para N-caderina em células de melanoma. Uma diminuição na marcação de N-caderina é muito significativa para um tratamento que tem como objetivo ser antitumoral e antimetastático. Thuya 30CH foi capaz de diminuir essa marcação (FIGURA 12), fornecendo mais indícios de que esse composto pode levar as células a diminuir suas capacidades metastáticas.

Os ensaios realizados até agora permitiram associar o tratamento com Thuya 30CH como tendo capacidade de diminuir padrões importantes para manter o fenótipo agressivo das células de melanoma, tornando-as menos capazes de gerar tumores, sejam primários ou secundários. Dessa forma, buscou-se realizar um

ensaio de formação de colônias inseridas em uma matriz 3D de alginato a fim de verificar se após o tratamento das células, a capacidade de gerar colônias a partir de si próprias seria realmente alterada.

Segundo alguns autores, é confiável a correlação entre ensaios de formação de colônias por células tumorais tratadas com antitumorais *in vitro* e resultados obtidos utilizando os mesmos tratamentos *in vivo*. (MEYSKENS; SALMON, 1979). Uma característica importante para células cancerígenas é a capacidade de formar agregados junto com moléculas de superfície como as glicoproteínas e assim crescerem em forma de colônias de uma forma que seja independente de ancoragem a um substrato, já que representa de forma mais próxima do real a capacidade dessas células de se proliferar e formar novos tumores em locais distantes da sua origem. (LOTAN; RAZ, 1983). Como o tratamento com Thuya 30CH alterou a capacidade proliferativa das células B16-F10 é esperado que a quantidade de colônias formadas também fosse diminuída, e foi realmente isso que aconteceu, como visto nos resultados. O composto foi capaz de reduzir o número de colônias formadas após o tratamento (FIGURA 13).

Esse resultado é extremamente importante, pois mostra que o composto estudado tem forte ação em uma das características mais marcantes da B16-F10, que é a capacidade tumorigênica. O melanoma é o tipo de câncer de pele com maior facilidade de realizar metástase, e o mais importante disso, é que após metastizar os tratamentos atuais não são suficientes a ponto de evitar a morte dos pacientes. Com o tratamento *in vitro* utilizando Thuya 30CH as células de melanoma apresentaram-se com a proliferação e a produção de moléculas importantes envolvidas nos processos de migração e a invasão diminuídas, contribuindo para que a formação de novos tumores também seja diminuída. Tendo isso em vista e considerando a administração a longo prazo de Thuya 30CH, este composto natural altamente diluído poderia aumentar a sobrevivência dos pacientes que sofrem com esse tipo de câncer.

Uma vez que o tratamento com Thuya 30CH alterou a produção de melanina deixando-a aumentada, aparentemente, através dos resultados obtidos pode-se inferir que a melanogênese é a base para todas as outras mudanças que ocorreram em cascata de respostas devido ao aumento da via melanogênica. A melanina é descrita como a grande defesa fisiológica existente na pele contra a radiação

ultravioleta já que ela possui capacidade fotoprotetora por absorver radicais livres (D'MELLO, et al., 2016). Sendo assim, na tentativa de investigar como o composto induziu ao aumento da produção de melanina, foi realizada uma busca na literatura e observamos que há vários indutores de melanogênese. Dentre essas, o óxido nítrico endógeno é considerado um dos estimulantes dessa via responsável por produzir melanina na célula de melanoma. (VIDEIRA, 2013). O papel do NO na indução da melanogênese foi descrito em 1996 por Roméro-Graillet e colaboradores, que demonstraram que o NO estimula a síntese de cGMP, (um forte estimulador do processo de melanogênese), e após alguns dias com estimulação utilizando NO exógeno a expressão proteica e a atividade da tirosinase foram induzidas em melanócitos humanos. O NO é um radical livre gasoso que difunde na célula, e é conhecido como uma molécula mensageira intracelular, encontrado em grandes quantidades na célula, e que possui diversos efeitos biológicos. Além disso, o NO gerado intracelularmente também já foi descrito como capaz de matar uma série de células tumorais (revisado por XU et al., 2002). Sendo assim, o último passo do estudo em questão foi investigar como o composto induziu ao aumento da produção de melanina, já que esse processo pode estar aparentemente desencadeando as ações seguintes do tratamento. Entretanto, verificou-se que o tratamento com *Thuya 30CH* não aumentou a produção dessa molécula no tempo estudado (FIGURA 14). Uma vez que esse processo deva ser anterior à produção de melanina, mais estudos precisam ser realizados, em tempos anteriores à 72h como, por exemplo, no tempo de 48h, para elucidar essa parte do trabalho. Nos vertebrados, a melanina é formada a partir do precursor fenólico aminoácido L-tirosina por meio de uma série de reações enzimáticas. A L-tirosina serve como material de partida para a biossíntese de melanina e o produto imediato das reações é o dopa que regula positivamente a síntese de melanina (D'MELLO, et al., 2016). Sendo assim, as enzimas responsáveis por essas reações também podem ser alvos do tratamento. Além disso, diversas outras moléculas envolvidas na síntese de melanina podem ainda ser estudadas na tentativa de elucidar o mecanismo de ação responsável pelos efeitos antitumorais de *Thuya 30CH* em células de melanoma.

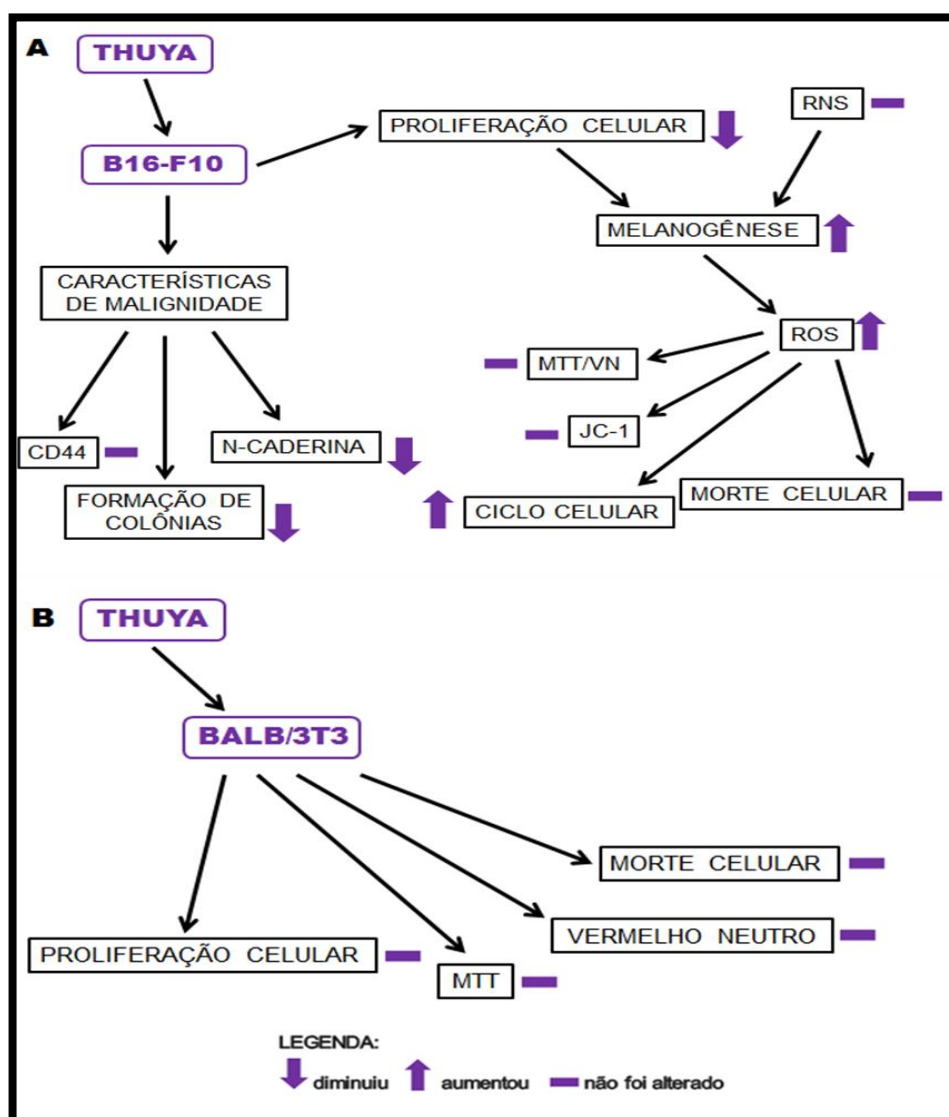
No presente trabalho, nós mostramos que *Thuya occidentalis 30CH* foi eficaz contra células de melanoma B16-F10 *in vitro*. Diluições elevadas têm a vantagem de não serem tóxicas e ainda de ativarem células do sistema imunológico a favor do

organismo. Assim, reduzindo características malignas é possível conduzir a susceptibilidade do melanoma para ocorrer intervenção do sistema imunológico, permitindo a sua eliminação.

Resumo dos resultados obtidos após o tratamento com Thuya 30CH

A partir dos resultados obtidos com a utilização do composto natural altamente diluído Thuya 30CH em células de melanoma B16-F10 e fibroblastos Balb/3T3, foram encontrados os resultados que estão esquematizados na FIGURA 17.

FIGURA 17 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS RESULTADOS OBTIDOS



No esquema A pode-se observar os resultados obtidos do tratamento com Thuya 30CH nas células de melanoma murino B16-F10. No esquema B, os resultados obtidos com o mesmo tratamento de células não tumorais, fibroblasto murino Balb/3T3.

FONTE: o autor (2016).

Em suma, inicialmente verificou-se diminuição da proliferação celular, e aumento de melanogênese. Como a proliferação das células B16-F10 está relacionada com o processo de melanogênese, provavelmente uma é consequência da outra. A partir da análise da literatura, e na tentativa de elucidar esses efeitos, foi realizado um ensaio para verificar a produção de espécies reativas de oxigênio onde o aumento da produção foi encontrado. Na sequência, foram realizados ensaios para verificar a funcionalidade da célula, e tanto a funcionalidade lisossomal quanto a mitocondrial, assim como o potencial de membrana das mitocôndrias mostraram-se inalterados pelo tratamento. Na busca de encontrar uma possível resposta para a menor proliferação celular encontrada anteriormente, seguiu-se para ensaios de detecção de morte celular que por sua vez, não mostraram diferenças significativas. Já no ensaio que avalia o ciclo celular, pôde-se verificar aumento das células na fase S do ciclo celular, possivelmente deixando o processo todo mais lento e conseqüentemente diminuindo a proliferação celular.

Os próximos passos foram verificar se o tratamento alterava também moléculas importantes na progressão do tumor e no processo de metástase, como CD44, o qual não se mostrou alterado com o tratamento, e a N-caderina, molécula que mostrou-se diminuída pelo tratamento com o composto Thuya 30CH. Além disso, a capacidade de formar colônias também foi avaliada, e foi possível observar que um menor número de colônias se desenvolviam após o tratamento com o composto em estudo.

No microambiente tumoral estão presentes células não tumorais como fibroblastos, as quais na maioria das vezes sofrem alterações de comportamento mediante diferentes tipos de tratamento antitumorais, sendo também afetadas pelo tratamento *in vivo* contra o tumor, as quais foram também analisadas neste trabalho. Observou-se que Thuya 30CH não altera a proliferação das células Balb/3T3, um tipo de fibroblasto, não alterando funcionalidades de mitocôndrias e lisossomos, e nem induzindo nenhum tipo de morte nessas células. Esses resultados sugerem que o tratamento com Thuya 30CH é supostamente seguro, uma vez que não afeta a funcionalidade/viabilidade de células consideradas normais/não tumorais.

8 CONCLUSÕES

O tratamento com o composto natural altamente diluído *Thuya occidentalis* 30CH:

- reduziu a proliferação celular de células B16-F10 após 48 e 72h de tratamento;
- não altera a funcionalidade de mitocôndrias e lisossomos das células de melanoma B16-F10;
- aumenta a produção de melanina pelas células B16-F10 após 72h de tratamento;
- não induz morte celular em B16-F10 após 72h de tratamento;
- reduz a porcentagem de células em G1 e aumenta na fase S do ciclo celular após 72h de tratamento;
- aumenta a síntese de ROS intracelular em B16-F10 após 72h de tratamento;
- não altera a expressão de CD44, porém reduz a expressão de N-caderina em células B16-F10 após 72h de tratamento;
- diminui a formação de colônias de B16-F10 após 72h de tratamento;
- não alterou a produção endógena de espécies reativas de nitrogênio (NO) em B16-F10 após 72h de tratamento;
- não altera o padrão de proliferação celular e a funcionalidade de mitocôndrias e lisossomos, bem como a taxa de morte celular em fibroblastos Balb/3T3.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHRENS, T.; ASSMANN, V.; FIEBER, C.; et al. CD44 is the principal mediator of hyaluronic-acid-induced melanoma cell proliferation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 116, n. 1, p. 93– 101. 2001.

ANDRADE, L. F. DE; MOZELESKI, B.; LECK, A. R. Inhalation therapy with M1 inhibits experimental melanoma development and metastases in mice. **Homeopathy**, in press. 2016.

ARMSTRONG, D, Advanced Protocols in Oxidative Stress II, **Methods in Molecular Biology**, vol. 594, p. 57-70, 2010.

ARORA, S.; TANDON, S. DNA fragmentation and cell cycle arrest: a hallmark of apoptosis induced by *Ruta graveolens* in human colon cancer cells. **Homeopathy**, v.104, p. 36-47, 2015.

ARUFFO, A.; STAMENKOVIC, I.; MELNICK, M.; UNDERHILL, C. B.; SEED, B. Cd44 Is the Principal Cell-Surface Receptor for Hyaluronate. **Cell**, v. 61, p. 1303–1313, 1990.

ASHKENAZI, A.; SALVESEN, G. Regulated Cell Death: Signaling and Mechanisms. **Reviews in advance**, 2014.

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

ATAMNA, H. Heme deficiency may be a factor in the mitochondrial and neuronal decay of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 23, p. 14807-14812, 2002.

BALKWILL, F. R.; CAPASSO, M.; HAGEMANN, T. The tumor microenvironment at a glance. **Journal of cell science**, v. 125, n. Pt 23, p. 5591–5596, 2012.

BALLOW, M.; NELSON, R. Immunopharmacology: immunomodulation and immunotherapy. **The Journal of the American Medical Association**, vol. 278(22), p. 2008-2017, 1997.

BELL I. R.; KOITHAN M. A model for homeopathic remedy effects: low dose nanoparticles, allostatic cross-adaptation, and time-dependent sensitization in a complex adaptive system. **BMC Complementary and Alternative Medicine** V. 12 P. 191. 2012.

BELLAVITE P.; MARZOTTO M.; OLIO SO D.; MORATTI E.; CONFORTI A. High-dilution effects revisited. 1. Physicochemical aspects. **Homeopathy**. v. 103, p. 04 – 21. 2014.

BELLAVITE P.; MARZOTTO M.; OLIO SO D.; MORATTI E.; CONFORTI A. High-dilution effects revisited. 2. Pharmacodynamic mechanisms. **Homeopathy**. v. 103, p. 22 – 43. 2014.

BETTI, L.; TREBBI, G.; OLIO SO, D.; MARZOTTO, M.; & BELLAVITE, P. Basic research in homeopathy and ultra-high dilutions: what progress is being made?. **Homeopathy**, v. 102, n. 2, p. 151-154, 2013.

BHATIA, S; TYKODI, S.; THOMPSON, J. Treatment of metastatic melanoma: an overview. **Oncology (Williston Park, NY)**, v. 23, n. 6, p. 488, 2009.

BISWAS R. Thujone-Rich Fraction of Thuja occidentalis Demonstrates Major Anti-Cancer Potentials: Evidences from In Vitro Studies on A375 Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. V. 2011, 2011.

BLAGOSKLONNY, V. Cell senescence and hypermitogenic arrest. **EMBO reports**, v. 4, n. 4, p. 358-362, 2003.

BLANKENBERG, F. G., KATSIKIS, P. D., TAIT, J. F., DAVIS, R. E., NAUMOVSKI, L., OHTSUKI, K., MAECKER, H. T. In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95(11), p. 6349-6354. 1998.

BONNEKOH B., WEVERS A., JUGERT F., MERK H., MAHRLE G. Colorimetric growth assay for epidermal cell cultures by their crystal violet binding capacity. **Archives of Dermatological Research**, v. 281, p. 487–490, 1989.

BORENFREUND E; PUERNER A. J. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicology Letters**, v. 24 p.119-124, 1985.

BRASIL. RESOLUÇÃO CFM Nº 1000/1980, de 04 de junho de 1980. Acrescenta na relação de especialidades reconhecidas pelo CFM, para efeito de registro de qualificação de especialistas a hansenologia e a homeopatia. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 21 Jul 1980, Seção 1, p. 2.

BRASIL. RESOLUÇÃO Nº 371, DE 14 DE JUNHO DE 2007. Institui a Comissão Intersetorial de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - CIPICSUS. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 21, 30 Jan 2008, Seção 1, pg 110.

CASCIOLA-ROSEN, L.; ROSEN, A. Ultraviolet light-induced keratinocyte apoptosis: a potential mechanism for the induction of skin lesions and autoantibody production in LE. **Lupus**, v. 6, n. 2, p. 175-180, 1997.

CERDEIRA, C.R.; VILA, A.M. News perspectives of ``omics`` Applications in melanoma research. **The Open Biochemistry Journal**, v.5, p.60-66, 2011.

CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Metastasis: dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 8, p. 563-572, 2002.

CHANG L. C.; SONG L. L; PARK E. J; LUYENGI L; LEE K. J; FARNSWORTH N. R; PEZZUTO J. M.; KINGHORN A. D. Bioactive Constituents of *Thuja occidentalis*. **J. Nat. Prod.**, V.63 (9), p. 1235–1238, 2000.

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.

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

CLAUSEN J.; VAN WIJK R.; ALBRECHT H. Geographical and temporal distribution of basic research experiments in homeopathy. **Homeopathy**. V. Jul 103(3) p. 193-7. 2014.

COONS H. A., J. CREECH J. H., JONES N. R. Immunological Properties of an Antibody containing a Fluorescent Group. **Exp Biol Med (Maywood)** 1941.

CZABOTAR, P.E.; LESSENE, G.; STRASSER, A.; ADAMS, J.M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Cell death and autophagy**, v.15, p.49-63, 2014.

DANCIU, C; OPREAN, C. Behaviour of four different B16 murine melanoma cell sublines: C57BL/6J skin. **International journal of experimental pathology**. 2015.

DANIAL, N.; KORSMEYER, Stanley J. Cell death: critical control points. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 205-219, 2004.

DE BOER, F. Early apoptosis largely accounts for functional impairment of CD34+ cells in frozen-thawed stem cell grafts. **Journal of hematotherapy & stem cell research**, v. 11, n. 6, p. 951-963, 2002.

DESAGHER, S.; MARTINOU, J. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends in cell biology**, v. 10, n. 9, p. 369-377, 2000.

DIETRICH, A.; TANCZOS, E.; VANSCHIEDT, W.; SCHÖPF, E.; SIMON, J. C. High CD44 surface expression on primary tumours of malignant melanoma correlates with increased metastatic risk and reduced survival. **European Journal of Cancer**, v. 33, n. 6, p. 926– 930, 1997.

D'MELLO, S. A., FINLAY, G. J., BAGULEY, B. C., & ASKARIAN-AMIRI, M. E. Signaling pathways in melanogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17(7), p.1144. 2016.

DOUGLAS R. S., TARSHIS A. D., PLETCHER C. H., NOWELL P. C., MOORE J. S. A simplified method for the coordinate examination of apoptosis and surface phenotype of murine lymphocytes. **Journal of Immunological Methods**. v.188 p.219-228, 1995.

DVIR-GINZBERG M., KONSON A., COHEN S., AGBARIA R. Entrapment of Retroviral Vector Producer Cells in ThreeDimensional Alginate Scaffolds for Potential Use in Cancer Gene Therapy. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, 2007.

Farmacopeia Homeopática Brasileira., v. 3a edição, 2011. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a_edicao.pdf > Acessado: 04 de agosto de 2016.

GONÇALVES, J. P. **COMPLEXOS NATURAIS ALTAMENTE DILUÍDOS ALTERAM PARÂMETROS DE MALIGNIDADE EM MELANOMA MURINO.** 2016. 120 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

GOODISON, S.; URQUIDI, V.; TARIN, D. CD44 cell adhesion molecules. **J Clin Pathol: Mol Pathol**, v. 52, p. 189–196, 1999.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, p. 851–857, 2007.

GREEN R, KROEMER G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**. 305:626-29. 2004.

GRIMALD A. M.; SIMEONE E.; FESTINO L.; PALLA M.; ASCIERTO P. A. Novel mechanisms and therapeutic approaches in melanoma: targeting the MAPK pathway. **Discov Med**. V. 19(107) P. 455-61. 2015.

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

GUIMARÃES, F.S.F; ANDRADE, L.F.; MARTINS, S.T.; ABUD, A.P.; SENE, R.V.; WANDER, C.; TISCORNIA, I.; BOLLATI-FOGOLLIN, M.; BUCHI, D.F.; TRINDADE, E.S. In vitro and in vivo anticancer properties of a *Calcarea carbonica* derivative complex (M8) treatment in a murine melanoma model. **BMC Cancer**, v. 10, 2010.

GUNTER, T. E.; GUNTER, K. K. Uptake of calcium by mitochondria: transport and possible function. **IUBMB life**, v. 52, n. 3-5, p. 197-204, 2001.

GUPTA S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **Int J Oncol**.22:15-20. 2003.

GUPTA, S. No hiding in the dark. **Nature**, v. 515, p. 121–123, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer cell**, v. 21, n. 3, p. 309–322, 2012. Elsevier Inc

HARIKUMAR KB, SUNILA ES, KUTTAN G. Inhibition of chemically induced carcinogenesis by drugs used in homeopathic medicine. **Asian Pac J Cancer Prev**, 8, 98-102. 2007.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407(6805), p. 770-776. 2000.

HOLMES, D. The cancer that rises with the Sun. **Nature**, v. 515, n. 7527, p. S110-S111, 2014.

HomBRex database. The Homeopathic Basic Reserch experiments database. Disponível em: <<http://www.carstens-stiftung.de/hombrex/index.php>>. Acesso em/ 14 de novembro de 2016.

HUANG, H. C., CHOU, Y. C., WU, C. Y., & CHANG, T. M. [8]-Gingerol inhibits melanogenesis in murine melanoma cells through down-regulation of the MAPK and PKA signal pathways. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 438(2), p. 375-381, 2013.

IBRAHIM, N; HALUSKA, G. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. **Annual Review of Pathological Mechanical Disease**, v. 4, p. 551-579, 2009.

INCA, **Tipos de Câncer-Pele Melanoma**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma>. Acesso em: 13 de agosto de 2016.

JEMAL, A. Global cancer statistics. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.

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

JUNCO, J. J., MANCHA-RAMIREZ, A., MALIK, G., WEI, S. J., KIM, D. J., LIANG, H., & SLAGA, T. J. Ursolic acid and resveratrol synergize with chloroquine to reduce melanoma cell viability. **Melanoma research**, v. 25(2), p. 103-112, 2015.

KALEJTA R. F.; SHENK T.; BEAVIS A. J. Use of a Membrane-Localized Green Fluorescent Protein Allows Simultaneous Identification of Transfected Cells and Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry. **Cytometry**, v. 29, n. 4, p. 286-291, 1997.

KANNAN, K.; JAIN, S. K. Oxidative stress and apoptosis. **Pathophysiology**, v. 7, n. 3, p. 153-163, 2000.

KOJIMA H, URANO Y, KIKUCHI K. Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production. **Angew. Chem. Int.** 38, No. 21 1999

KOOPMAN G., REUTELINGSPERGER C. P. M., KUIJTEN G. A. M., KEEHNEN R. M. J., PALS S. T., VAN OERS M. H. J. Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis. **Blood**, v. 84, No 5, p. 1415-1420, 1994.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E.; FISKUM, G. Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition and cytochrome c release via maintenance of reduced pyridine nucleotides. **Cell Death & Differentiation**, v. 7, n. 10, 2000.

KROEMER G, REED JC. Mitochondrial control of cell death. **Nat Med**. 6:513-16. 2000.

KUCZERA, D. **Avaliação da ação antitumoral do complexo natural altamente diluído M1 em células de melanoma humano 1205Lu**, 90f. Tese (Doutorado em Biologia Celular)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

LI,G.; SATYAMOORTHY, K.; HERLYN, M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. **Cancer Research**, v. 61, n. 9, p. 3819–3825, 2001.

LO, J. A.; FISHER, D. E. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. **Science**. V. 346(6212): P. 945–949. 2014.

LOEFFLER M, KREMER G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. **Exp Cellular Res**. 256:19-26. 2000.

LOTAN, R.; RAZ, A. Low Colony Formation in Vivo and in Culture as Exhibited by Metastatic Melanoma Cells Selected for Reduced Homotypic Aggregation. **Cancer Research**, v. 43, n. May, p. 2088–2093, 1983.

MARTÍ, R. M.; SOROLLA, A.; YERAMIAN, A. Nuevas dianas terapéuticas en el melanoma. **Actas dermo-sifiliograficas**, v. 103, n. 7, p. 579-590, 2012.

MARTIN, S. J.; GREEN, D. R. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?. **Cell**, v. 82, n. 3, p. 349-352, 1995.

MARZUKA A.; HUANG L.; THEODOSAKIS N.; BOSENBERG M. Melanoma Treatments: Advances and Mechanisms. **J Cell Physiol**. V. Nov; 230(11) P. 2626-33. 2015.

MAVERAKIS E.; CORNELIUS A. L.;BOWEN G. M.; PHAN T.; PATEL F. B.; FITZMAURICE S.; HE Y.; BURRALL B.; DUONG C.; KLOXIN A. M.; SULTANI H.; WILKEN R.; MARTINEZ S. R.; PATEL F. Metastatic Melanoma – A Review of Current and Future Treatment Options. **Acta Derm Venereol**. 95: 516–524. 2015.

MAZZIO E.; BADISA R.; MACK N.; DEIAB S.; SOLIMAN K. F. High throughput screening of natural products for anti-mitotic effects in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells. **Phytother Res.** V. Jun 28(6) p. 856-67. 2014.

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

MEYSKENS, F. L.; SALMON, S. E. Inhibition of Human Melanoma Colony Formation by Retinoids. **Cancer Research**, v. 39, n. October, p. 4055–4057, 1979.

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

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, 65, 55-63, 1983.

MOURDJEVA, M., KYURKCHIEV, D., MANDINOVA, A., ALTANKOVA, I., KEHAYOV, I., & KYURKCHIEV, S. Dynamics of membrane translocation of phosphatidylserine during apoptosis detected by a monoclonal antibody. **Apoptosis**, v. 10(1), p. 209-217, 2005.

MUKHERJEE A.; SIKDAR S.; BISHAYEE K.; PAUL A.; GHOSH S.; BOUJEDAINI N.; KHUDA-BUKHS A.R. Ethanolic extract of *Thuja occidentalis* blocks proliferation of A549 cells and induces apoptosis in vitro. **Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.** V. Dec 10(12) p. 1451-9. 2012.

MUKHERJEE A.; BOUJEDAINI N.; KHUDA-BUKHS A. R. Homeopathic *Thuja* 30C ameliorates benzo(a)pyrene-induced DNA damage, stress and viability of perfused lung cells of mice in vitro. **J Integr Med.** V. Nov 11(6) p. 397-404. 2013.

MUKHERJEE A., SIKDAR S., BISHAYEE K., BOUJEDAINI N., KHUDA-BUKHS A. R. Flavonol isolated from ethanolic leaf extract of *Thuja occidentalis* arrests the cell cycle at G2-M and induces ROS-independent apoptosis in A549 cells, targeting nuclear DNA. **Cell proliferation in basic and clinical sciences.** V. 47 p. 56 – 71. 2014.

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

MUNOZ-MUNOZ, J. L., GARCÍA-MOLINA, F., VARÓN, R., TUDELA, J., GARCÍA-CÁNOVAS, F., & RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N. Generation of hydrogen peroxide in the melanin biosynthesis pathway. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1794(7), p. 1017-1029. 2009.

NARAYANAN, L.; SALADI, N.; FOX, L. Review: Ultraviolet radiation and skin cancer. **International journal of dermatology**, v. 49, n. 9, p. 978-986, 2010.

NASER, B.; BODINET, C.; TEGTMEIR, M.; LINDEQUIST, U. Thuja occidentalis (Arbor vitae): A review of its pharmaceutical, pharmacological and clinical properties. **ECAM**, v.2(1), p. 69-78, 2005.

NATIONAL CANCER INSTITUTE, **Metastatic cancer**, disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/metastatic-cancer>> acessado em 9 de novembro de 2016.

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

NIKOLAOU, V.; STRATIGOS, A J. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. **British journal of dermatology**, v. 170, p. 11–19, 2014.

OLDENBURG, O.; CRITZ, S. D., COHEN, M. V., & DOWNEY, J. M. (2003). Acetylcholine-induced production of reactive oxygen species in adult rabbit ventricular myocytes is dependent on phosphatidylinositol 3-and Src-kinase activation and mitochondrial K ATP channel opening. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 35(6), p. 653-660. 2003.

OLIVEIRA, C. C. DE; OLIVEIRA, S. M. DE; GODOY, L. M. F.; GABARDO, J.; BUCHI, D. 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. DE; OLIVEIRA, S. M. DE; GOES, V. M. Gene expression profiling of macrophages following mice treatment with an immunomodulator medication. **Journal of cellular biochemistry**, v. 104, p. 1364–1377, 2008.

OLIVEIRA, S. M., DE OLIVEIRA C. C. , ABUD A. P. R., GUIMARÃES F. S. F., DI BERNARDI R. P., COLETTI E. L. O., BUCHI D. F. Mercurius solubilis: a promising new immunotherapy acting on macrophages. **Homeopathy**, v. 100, p. 228-236, 2011a.

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

OLIVEIRA, S. M., DE OLIVEIRA C. C. , ABUD A. P. R., GUIMARÃES F. S. F., DI BERNARDI R. P., COLETTI E. L. O., BUCHI D. F. Mercurius solubilis: a promising new immunotherapy acting on macrophages. **Homeopathy**, v. 100, p. 228-236, 2011a.

PALUMBO G.; DI LORENZO G.; OTTAVIANO M.; DAMIANO V. The future of melanoma therapy: developing new drugs and improving the use of old ones. **Future Oncology**. V. 12(22), P. 2531–2534. 2016.

PARK, H. Y., KOSMADAKI, M., YAAR, M., & GILCHREST, B. A. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 66(9), 1493-1506. 2009.

PASCO, S.; RAMONT, L.; MAQUART, F.X.; MONBOISE, J.C. Control of melanoma progression by various matrikines from basement membrane macromolecules. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 49, p. 221 -233, 2004.

PERLUIGI, M., DE MARCO, F., FOPPOLI, C., COCCIA, R., BLARZINO, C., MARCANTE, M. L., & CINI, C. Tyrosinase protects human melanocytes from ROS-generating compounds. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 305(2), p. 250-256. 2003.

PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1644, n. 2, p. 83-94, 2004.

PIEMONTE, M.R.; BUCHI, D.F. Analysis of IL-12, IFN-g and TNF-alpha production, $\alpha 5 \beta 1$ integrins and actin filaments distribution in peritoneal mouse macrophages treated with homeopathic medicament. **Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology**, v. 33, n. 4, p. 255-263, 2002.

POTRICH, F.B. **Complexos naturais altamente diluídos reduzem fenótipo metastático de células de melanoma murino (B16F10)**, tese (doutorado em Biologia Celular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

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, 2011.

PROOST D. I; PINTELON I; BROUNS I. Functional Live Cell Imaging of the Pulmonary Neuroepithelial Body Microenvironment. **American journal of respiratory cell and Molecular biology** V. 39, 2008.

REGAD, T. Molecular and cellular pathogenesis of melanoma initiation and progression. **Cellular and molecular life sciences**, v. 70(21), p. 4055-4065. 2013.

REMYA V.; KUTTAN G. Homeopathic remedies with antineoplastic properties have immunomodulatory effects in experimental animals. **Homeopathy**. V. Jul 104(3) p. 211-9. 2015.

ROMÉRO-GRAILLET, 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.

SAHA, S.; BHATTACHARJEE, P.; MUKHERJEE, S.; MAZUMDAR, M.; CHAKRABORTY, S.; KHURANA, A.; NAYAK, D.; MANCHANDA, R.; CHAKRABARTY, R.; DAS, T.; AS, G. Contribution of the ROS-p53 feedback loop in tuja-induced apoptosis of mammary epithelial carcinoma cells. **Oncology Reports**, v. 31 p. 1589-1598, 2014

SALGAME, P., PRIMIANO, L. L., FINCKE, J. E., MULLER, S., & MONESTIER, M. An ELISA for detection of apoptosis. **Nucleic acids research**, v. 25(3), p. 680-681. 1997.

SAMADI, K. A novel C-terminal HSP90 inhibitor KU135 induces apoptosis and cell cycle arrest in melanoma cells. **Cancer letters**, v. 312, n. 2, p. 158-167, 2011.

SATO, D. Y. O.; WAL, R.; OLIVEIRA, C. C. DE. 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.

SHACKELFORD, R. E.; KAUFMANN, W. K.; PAULES, R. S. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 9, p. 1387-1404, 2000.

SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews Cancer**, 2016.

SHEALY, NORMAN. **Enciclopédia ilustrada de remédios naturais**. Barcelona: editora Konemann, 1999.

SIKDAR S., MUKHERJEE A., GHOSH S., KHUDA-BUKHSH A. R. Condurango glycoside-rich components stimulate DNA damage-induced cell cycle arrest and ROS-mediated caspase-3 dependent apoptosis through inhibition of cell-proliferation in lung cancer, *in vitro* and *in vivo*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. V. 37, p. 300 – 314, 2014.

SIRONEN, R. K.; TAMMI, M.; TAMMI, R. Hyaluronan in human malignancies. **Experimental cell research**, v. 317, p. 383–391, 2011.

STEWART, B. World cancer report 2014. **World**, 2015.

SUNILA, E. S. Effect of homeopathic medicines on transplanted tumors in mice. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 8, n. 3, p. 390, 2007.

TAKEICHI, M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. **Annual review of biochemistry**, v. 59, p. 237–252, 1990.

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.

TOLEDO, J. A. **Estudiate a ti mismo**. Buenos Aires, Argentina, editora Casa Jacobo Peuser, 1910.; VARGAS Y.; URIBE D.; CARRASCO C.; TORRES C.; ROCHA R.; OYARZÚN C.; SAN MARTÍN R.; QUEZADA C. Pro-apoptotic and anti-angiogenic properties of the α / β -thujone fraction from *Thuja occidentalis* on glioblastoma cells. **J. Neuro. oncol.** May v. 128(1) p. 9-19. 2016.

VEGA-AVILA E.; PUGSLEY M. K. An Overview of Colorimetric Assay Methods Used to Assess Survival or Proliferation of Mammalian Cells. **Proc. West. Pharmacol. Soc.** 54: 10-14, 2011.

VIDEIRA I. F. S.; MOURA D. F. L.; MAGINA S. Mechanisms regulating melanogenesis. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 88, n. 1, p. 76-83, 2013.

VISVADER, E. Cells of origin in cancer. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 314-322, 2011.

WAISSE, S. The science of high dilutions in historical context. **Homeopathy**, v. 101, p. 129–137, 2012.

WALLACE, C. Mitochondrial diseases in man and mouse. **Science**, v. 283, n. 5407, p. 1482-1488, 1999.

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.

WEISSGERBER, T. Beyond bar and line graphs: time for a new data presentation paradigm. **PLoS Biol**, v. 13, n. 4, p. e1002128, 2015.

WHEELLOCK, M. J.; SHINTANI, Y.; MAEDA, M.; FUKUMOTO, Y.; JOHNSON, K. R. Cadherin switching. **Journal of cell science**, v. 121, p. 727–735, 2008.

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.

WHO. Health effects of UV radiation. Disponível em:
<http://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/index1.html>. Acesso em: 18/3/2016

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.

ZHENG, M. Inhibition of nuclear factor- κ B and nitric oxide by curcumin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human melanoma cells. **Melanoma research**, v. 14, n. 3, p. 165-171, 2004.

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.

ZOROV, B. Mitochondria revisited. Alternative functions of mitochondria. **Bioscience reports**, v. 17, n. 6, p. 507-520, 1997.