

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE MIRANDA CRISTAL

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA HEPARINA DE BAIXO
PESO MOLECULAR EM MODELO DE MELANOMA MURINO

CURITIBA

2019

ALINE MIRANDA CRISTAL

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE HEPARINA DE BAIXO
PESO MOLECULAR EM MODELO DE MELANOMA MURINO

Monografia apresentada como requisito parcial
à obtenção do título de Bacharel, Curso de
Graduação em Ciências Biológicas, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coorientador: M.e Daniel de Lima Bellan

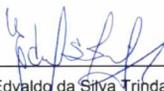
CURITIBA
2019

TERMO DE APROVAÇÃO

ALINE MIRANDA CRISTAL

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA HEPARINA DE BAIXO PESO
MOLECULAR EM MODELO DE MELANOMA MURINO**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Orientador – Departamento Biologia Celular, UFPR



Prof. Dr. Francisco Filipak Neto
Departamento Biologia Celular, UFPR



Prof(a). Dr(a). Sheila Maria Brochado Winnischofer
Departamento Bioquímica, UFPR

Curitiba, 9 de dezembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me sustentou todos os dias com amor, graça e que colocou em mim a paixão pelo estudo da vida. À Jesus por me trazer esperança em situações difíceis.

Já muito antes de ingressar no ensino superior sabia que qualquer trabalho científico nunca é feito sozinho. E de fato se não tivesse tido o auxílio de diversas pessoas em diferentes momentos, esse trabalho jamais teria sido realizado. O auxílio a qual me refiro não foi somente acadêmico ou profissional, mas também das pessoas que me acompanharam todo o processo, amigos, conhecidos, familiares, apoiando-me nos momentos difíceis ou compreendendo minhas ausências. Tenho certeza que é muito difícil enumerar todas essas pessoas, mas algumas delas não poderiam deixar de ser citadas. Portanto, um agradecimento especial:

Aos meus pais Antônio Carlos e Nadienka que me guiaram com todo amor e carinho e sempre apoiaram meus sonhos. Por se dedicarem a me proporcionar uma educação de qualidade, que infelizmente ainda não é uma realidade para todos. A minha irmã Tamiris que sempre foi uma inspiração para mim e que me ajudou nesse processo.

A minha família, que sempre me apoiou nos caminhos que escolhi para minha vida. Especialmente ao meu avô Nery, que com todo amor me incentivou aos estudos, mas infelizmente não irá presenciar o final dessa caminhada comigo. A minha tia Ciomara que sempre foi um exemplo e inspiração a seguir na carreira de pesquisa científica.

Aos meus amigos da família JUNIEQ, aos Pst. Jhow e Rebecca Braghini, Kauanna Sanches, Marina Stemberg, Camila Muraski, Camila Cuduh pelas orações e apoio nesse processo.

Ao meu orientador Profº. Drº. Edvaldo da Silva Trindade que me guiou desde o início a pesquisa, pela confiança a esse projeto para conclusão do curso. Ao meu coorientador M.e. Daniel de Lima Bellan pela imensa ajuda no desenvolvimento dos experimentos, ao projeto de monografia e que me incentivou a seguir com a pesquisa, além da grande amizade.

As professoras Carolina Camargo e Fernanda Simas, que sempre estiveram dispostas a acrescentar neste trabalho e que foram de grande importância para esse trabalho e minha caminhada acadêmica.

Aos meus amigos do laboratório, Anderson Fraga, Açucena Máximo, Jessica Magno, Camila Laís, Camila Araújo, Gabriel Salkovski, Keila Taiana, Odair Braz, Victoria Schmitt, Yasmin Ribeiro, Israel Bini, Maíra Reis, Jenifer Gonçalves, Gustavo Rossi e Stellee Biscaia, pela amizade, pelo apoio nos experimentos *in vivo* e pelas conversas divertidas no trabalho. Ao Anderson Fraga e Açucena Máximo em especial pela amizade sincera que vou levar para vida.

Aos meus amigos do curso, Lucas Rafael, Giuseppe Pasqualato e Bianca Gimenez que sempre estiveram ao meu lado e pela grande amizade.

A Universidade Federal do Paraná e a todos os seus servidores, técnicos e docentes, que sem eles esse trabalho não seria realizado. Ao biotério do Setor de Ciências Biológicas pelo apoio no período de experimentação *in vivo*. Ao Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência (CTAF) por realizaram os escaneamentos das lâminas, especialmente ao Israel Bini. Ao Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná, especialmente para o Odair Carlos Beltrame, que gentilmente realizou os exames clínicos do experimento *in vivo*. Ao Cleber Viera pelo auxílio no processo da histologia. A CAPES, pelo auxílio financeiro.

“E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida! Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo de tentar.”

Veronica Shoffstall

RESUMO

O câncer é um problema de saúde pública mundial, não afetando apenas países desenvolvidos, mas também os em desenvolvimento. Para o ano de 2018 foi esperado 9.6 milhões de mortes pelo câncer. O melanoma é a forma mais agressiva de câncer de pele por possuir alta capacidade metastática e não ser responsivo aos tratamentos convencionais, que provocam vários efeitos colaterais significativos. Assim, é interessante a utilização de compostos que diminuem a atividade invasiva e metastática desse tipo de tumor, mas com mínimos efeitos colaterais para o tratamento do melanoma. A heparina de baixo peso molecular (LMWH) possui atividade antitrombótica, mas com ação anticoagulante reduzida e, por isso, são amplamente utilizadas na prevenção e tratamento de complicações tromboembólicas em pacientes com câncer metastático. Além disso, muitos estudos relatam que são capazes de aumentar a sobrevida dos pacientes, via mecanismos que são diferentes de seu efeito antitrombótico. A fim de analisar possíveis mecanismos pelos quais LMWH atua no processo de metástase, bem como avaliar os efeitos do tratamento terapêutico, realizamos experimentos *in vitro* com células da linhagem B16-F10 (melanoma murino) empregando os ensaios de formação de colônia e de adesão celular, bem como *in vivo* com modelo de metástase experimental, com tratamento terapêutico. As células tratadas com LMWH (100 µg/ml) não apresentaram alteração no número de colônias, nem na área total das mesmas. O tratamento também não alterou a quantidade de células aderidas às moléculas utilizadas como *coats*, tanto pela abordagem de pré-tratamento das células, como no tratamento dos substratos. Com relação ao experimento *in vivo*, foi possível observar que os camundongos que receberam a LMWH (1 mg/kg) 5 dias após a inoculação das células tumorais, apresentaram uma redução dos focos metastáticos no pulmão, além de não apresentarem efeitos colaterais com os parâmetros anatômicos e hematológicos avaliados. Assim, a LMWH apresenta resultados promissores no modelo de metástase experimental, empregando tratamento terapêutico. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para se identificar os mecanismos pelos quais este composto atua.

Palavras-chave: Câncer. Metástase. Melanoma. Heparina de baixo peso molecular.

ABSTRACT

Cancer is a worldwide public health problem, affecting not only developed but also developing countries. For the year 2018 were expected 9.6 million deaths from cancer. Melanoma is the most aggressive form of skin cancer because it has high metastatic capacity and is not responsive to conventional treatments that cause several significant side effects. Thus, it is interesting to use compounds that decrease the invasive and metastatic activity of this type of tumor, but with minimal side effects for treatment of melanoma. Low molecular weight heparin (LMWH) has antithrombotic activity but have reduced anticoagulant action and is therefore widely used in the prevention and treatment of thromboembolic complications in patients with metastatic cancer. In addition, many studies report that it can increase patient survival via mechanisms that are different from its antithrombotic effect. In order to analyze possible mechanisms by which LMWH acts in the metastasis process, as well as to evaluate the effects of therapeutic treatment, we conducted *in vitro* experiments with B16-F10 (murine melanoma) cells using colony formation and cell adhesion assays, as well as *in vivo* experimental metastasis model with therapeutic treatment. LMWH-treated cells (100 µg/ml) showed no change in the number of colonies or in their total area. The treatment also did not alter the amount of cells adhered to molecules used as coats, either by the pretreatment approach of cells or in treatment of substrates. In relation to *in vivo* experiment, it was observed that mice receiving LMWH (1 mg/kg) 5 days after tumor cell inoculation showed a reduction in lung metastatic foci and no side effects in anatomical and hematological parameters evaluations. Thus, LMWH presents promising results in experimental metastasis model, employing therapeutic treatment. However, further studies should be conducted to identify the mechanisms by which this compound acts.

Keywords: Câncer. Metastasis. Melanoma. Low molecular weight heparin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Característica do câncer.....	15
FIGURA 2 – Fases do melanoma.....	19
FIGURA 3 – Esquema metástase experimental.....	29
FIGURA 4 – Esquema análise histológica.....	30
FIGURA 5 – Ensaio clonogênico.....	32
FIGURA 6 – Ensaio adesão.....	34
FIGURA 7 – Análise da área de metástase pulmonar.....	37
FIGURA 8 – Análise histológica da área de metástase pulmonar.....	39
FIGURA 9 – Análise do perfil anatômico, bioquímico e hematológico.....	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	CONTEXTO E PROBLEMA.....	11
1.2	OBJETIVOS.....	12
1.2.1	Objetivo geral.....	12
1.2.2	Objetivos específicos.....	13
1.3	HIPÓTESE.....	13
1.4	JUSTIFICATIVA.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	CÂNCER.....	15
2.2	MELANOMA.....	17
2.3	METÁSTASE.....	19
2.4	TRATAMENTOS PARA MELANOMA.....	21
2.4.1	Heparinas.....	23
2.4.2	Heparina de baixo peso molecular.....	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	CULTIVO CELULAR E ANIMAIS.....	26
3.2	HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR EM ESTUDO.....	26
3.3	ENSAIO CLONOGÊNICO.....	27
3.4	ENSAIO ADESÃO.....	27
3.5	METÁSTASE EXPERIMENTAL.....	28
3.6	HISTOLOGIA.....	29
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	ENSAIO CLONOGÊNICO.....	32
4.2	ENSAIO DE ADESÃO.....	33
4.3	METÁSTASE EXPERIMENTAL.....	36
5	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTO E PROBLEMA

O câncer é um conjunto de doenças e é considerado a segunda maior causa mortes no mundo e, por isso, sendo considerado um problema de saúde pública mundial, não afetando apenas países desenvolvidos, mas também os em desenvolvimento. Para o ano de 2018 foram estimadas mais de 9,6 milhões de mortes pelo câncer (BRAY *et al.*, 2018). Quando os casos de câncer são diagnosticados em um estágio metastático o prognóstico é ruim, levando a morbidade dos indivíduos e a grande dificuldade para o tratamento na clínica (STEEG, 2016). O melanoma, câncer desenvolvido em melanócitos, é o tipo de câncer de pele mais agressivo, por ter um alto potencial metastático. No Brasil foram previstos 6.260 casos novos para 2019 para este tipo de câncer. Apesar da baixa incidência (4 a 5% do total de câncer de pele), se comparado ao câncer de pele do tipo não melanoma, sua letalidade é elevada devido a sua alta capacidade metastática (INCA, 2017).

Os tratamentos para o melanoma variam desde a remoção cirúrgica - quando o diagnóstico é realizado nos estágios iniciais - quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e terapia alvo. Essas terapias, no entanto, causam muitos efeitos colaterais e ainda alguns pacientes apresentam baixa responsividade (KOZAR *et al.*, 2019). Por isso, é relevante o estudo de outros compostos que apresentam atividade antitumoral, mas com efeitos colaterais amenos ou, de preferência, nulos.

O uso de heparina para tratamento de complicações tromboembólicas associadas ao câncer é amplamente conhecido, desde que foi descoberto a relação entre trombose e câncer por Armand Trousseau. Os dados mostram que o uso de heparina aumenta a sobrevida dos pacientes com câncer e tromboembolismo, como também é capaz de diminuir a progressão metastática em melanoma (BORSIG, 2010). Ainda assim, o tratamento com heparina pode levar a casos de desregulação hematológicas relacionadas com o sistema de coagulação, como por exemplo a trombocitopenia, que é o baixo níveis de plaquetas (GRAY *et al.*, 2008).

Dessa forma, a heparina de baixo peso molecular (LMWH, do inglês *Low Molecular Weight Heparin*), derivada da degradação parcial heparina não

fracionada, ou pela ação enzimática ou química, possui atividade anticoagulante reduzida, o que diminui os efeitos colaterais do uso da heparina não fracionada, e mantém seu efeito antitumoral em melanoma. Os estudos realizados com essa molécula são em sua maioria preventivos, ou seja, seu principal foco de ação na metástase seria impedindo a agregação plaquetária e consequentemente, a formação do escudo plaquetária quando as células tumorais estão na corrente sanguínea e, desta forma, inibindo a colonização em outros órgãos. Além disso, esse anticoagulante é capaz de reduzir o perfil de proliferação, adesão celular, angiogênese, e regulação da transição epitélio mesenquimal (EMT) de células tumorais (ZHANG *et al.*, 2016), sendo, portanto, um composto interessante no tratamento terapêutico do câncer.

No entanto, há uma carência de estudos relacionados aos efeitos de LMWH como tratamento terapêutico no processo na metástase, e esse é o principal motivo pelo qual o presente estudo foi realizado.

Dados recentes do nosso laboratório demonstraram que células da linhagem B16-F10 (melanoma murino), quando expostas à LMWH *in vitro*, não sofrem alteração da capacidade de proliferação celular, bem como não apresentam perda de viabilidade. Mas o tratamento com LMWH foi capaz de diminuir processos de invasão e migração celular, além de levar à diminuição da expressão gênica de diversas moléculas que são importantes para a progressão do melanoma, como por exemplo a metaloprotease MMP-9 e proteoglicanos (SANTI, 2015). Além disso, *in vivo*, a LMWH foi capaz de inibir o crescimento tumoral em animais com tumor subcutâneo previamente estabelecido (COSTA, 2014), no entanto, ainda é desconhecido seu efeito em modelos de metástases do melanoma.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Dado os resultados promissores encontrados no melanoma, em modelo de tumor sólido, o presente projeto tem como objetivo geral avaliar os possíveis efeitos antitumorais da LMWH no modelo de metástase experimental com tratamento terapêutico, bem como, empregar ensaios *in vitro* buscando o entendimento da forma de ação do composto testado.

1.2.2 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral do projeto, o efeito da LMWH será avaliado sobre a linhagem B16-F10 nas seguintes abordagens:

- Avaliar se esse composto modula a formação de colônias *in vitro* em situação de baixa densidade celular;
- Avaliar se a LMWH afeta o processo de adesão celular sobre diferentes substratos;
- Avaliar se a LMWH atua no processo de colonização pulmonar *in vivo* após a estabilização das células de melanoma murino nesse órgão, empregando o modelo de metástase experimental, assim como analisar aspectos morfológicos teciduais do pulmão, quantificando áreas de metástases e análise dos parâmetros anatômicos e hematológicos.

1.3 HIPÓTESE

Dados os resultados encontrados com a LMWH temos como hipótese que este composto atuará reduzindo a formação de colônias, tanto em número quanto em área, bem como levar uma redução na adesão das células sob os substratos de matriz extracelular. E ainda atuará na redução da área de metástase pulmonar.

1.4 JUSTIFICATIVA

Devido ao melanoma ser um câncer agressivo, com prognóstico desfavorável em estágios avançados, dado seu potencial metastático, e, por outro lado, os tratamentos mais utilizados atualmente possuem baixa efetividade, acentuados efeitos colaterais, e não responsivos, é necessário a busca por novos potenciais agentes antitumorais. Há vários trabalhos na literatura que mostram que a LMWH possui atividade antimetastática em melanoma. Esse efeito é ocasionado pela sua ação anticoagulante, inibindo a ligação das células tumorais às plaquetas e vasos sanguíneos, além de facilitar a atividade do sistema imune contra as células tumorais. Os dados da literatura

que mostraram efeito antimetastático são resultantes de ensaios que fizeram sua utilização prévia à inoculação das células tumorais, isto é, mostram que esse composto possui um efeito preventivo. Dados prévios do grupo, utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo* mostraram que a LMWH altera o perfil metastático das células, reduzindo a migração e invasão celular, e reduz o desenvolvimento do tumor sólido, sugerindo ser promissora. Face ao exposto, é necessário avaliar se LMWH pode também ser eficiente em inibir metástase pulmonar com uma abordagem terapêutica, ou seja, atuando após o estabelecimento das células metastáticas sob o órgão.

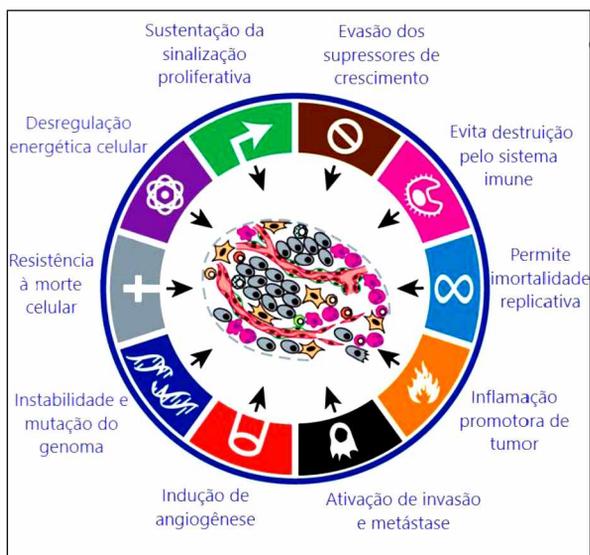
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

A incidência e mortalidade por câncer estão crescendo rapidamente em todo o mundo. Em 2012, mais de 14 milhões de novos casos foram diagnosticados, com aproximadamente 8 milhões de óbitos associadas ao câncer (BERNARD; CHRISTOPHER, 2015). Para os últimos dois anos, foi esperado 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes (BRAY *et al.*, 2018). Além disso, é esperado a incidência de 30 milhões e 16 milhões de mortes pelo câncer para os próximos 20 anos (GCO, 2019).

O câncer é classificado como um conjunto de mais de 200 doenças que apresentam em comum a desregulação dos processos de manutenção tecidual, originando proliferação crônica das células, evasão de supressores de crescimento, resistência a morte celular, permitindo a imortalidade replicativa, indução de angiogênese e ativação de invasão e metástase. Por trás dessas características está a instabilidade do genoma, que gera a diversidade genética que acelera o processo neoplásico (FIGURA 1) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

FIGURA 1: Características do câncer



Fonte: Adaptado Hanahan e Weinberg, 2011

Este surge a partir de um acúmulo de mutações que leva a um quadro de mudanças no DNA de células somáticas, que podem ser causadas por agentes físicos, químicos e/ou biológicos, como radiação ionizante, tabaco e vírus. Além disso, fatores ambientais, como estilo de vida, podem favorecer o desenvolvimento de câncer por atuarem nas pressões seletivas do ambiente tecidual, como alterações na circulação de nutrientes e hormônios podem favorecer a propagação de células cancerosas (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017).

Ainda, a inflamação pode atuar fornecendo moléculas bioativas ao microambiente tumoral, incluindo fatores de crescimento que sustentam sinalização proliferativa, fatores de sobrevivência que limitam a morte celular, fatores pró-angiogênicos, enzimas modificadoras de matriz extracelular que facilitam a angiogênese, invasão e metástase e sinais que levam à ativação da transição epitélio-mesenquimal (EMT) (GRIVENNIKOV *et al.*, 2010).

A proliferação celular crônica, que representa a essência das doenças neoplásicas, envolve não apenas a seleção do fenótipo altamente proliferativo, mas também ajustes correspondentes do metabolismo energético, a fim de estimular o crescimento e a divisão celular. Assim, mesmo na presença de oxigênio, as células cancerosas podem reprogramar o metabolismo da glicose e, portanto, a produção de energia, limitando o metabolismo energético à glicólise, levando a um estado denominado glicólise aeróbica (WARBURG, 1956; DEBERARDINIS *et al.*, 2008; JONES; THOMPSON, 2009).

O sistema imunológico apresenta um papel importante e complexo no controle ou favorecimento dos tumores. Estudos demonstraram que células inatas e adaptativas do sistema imunológico são capazes de contribuir na erradicação do tumor (TENG *et al.*, 2008; TENG *et al.*, 2013). Se por um lado as células imune inata *Neutural Kilers* (NK) e adaptativa *Cytotoxic T Cells* (CTL) atuam diretamente nas células cancerosas por meio da produção de citocinas tóxicas, por outro lado, devido à enorme plasticidade e capacidade de produzir diversas citocinas, quimiocinas, metaloproteinases, espécies reativas de oxigênio, histamina e outras substâncias bioativas mediadores, as células imunes cronicamente ativadas são moduladoras essenciais da sobrevivência celular e vários processos fisiológicos necessários ao desenvolvimento do tumor (DE VISSER *et al.*, 2006; GRIVENNIKOV *et al.*, 2010; VESELY *et al.*, 2011; SCHREIBER *et al.*, 2011).

Ainda, sobre a atuação do sistema imunológico nos tumores, as células cancerosas imunogênicas também podem evitar a eliminação pelo sistema imune, desabilitando os componentes que este sistema proporcionou para tal ação. Por exemplo, as células cancerosas podem impedir a infiltração de CTLs e células NK, secretando fatores imunossupressores (YANG *et al.*, 2010; BÖTTCHER *et al.*, 2018)

Além das células cancerosas os tumores apresentam outras células recrutadas criando o microambiente tumoral. Um microambiente tecidual do tumor em desenvolvimento é constituído por células tumorais em proliferação, estroma tumoral, vasos sanguíneos, células inflamatórias infiltrantes e uma variedade de células teciduais associadas, como fibroblastos, pericitos e células tronco cancerosas (WHITESIDE, 2008; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Essas células estromais podem estar atuando a favor ou contra o tumor, influenciando os processos de proliferação, angiogênese, metástase e balanço energético, por exemplo (HANAHAN; COUSSENS, 2012).

O câncer pode ser classificado em dois graus de agressividade. O tumor é considerado benigno quando o crescimento é local e não apresenta invasão para outros tecidos, e maligno quando apresenta invasão em tecidos próximos e metástases em outros órgãos do organismo (SUDHAKAR, 2009).

Dentre os tipos de câncer mais incidentes no mundo, não considerando o câncer de pele não melanoma, o câncer de pulmão é o mais frequente em ambos os sexos (11.6%) e para os homens (14.5%), e o câncer de mama é o mais prevalente nas mulheres (24.2%) (BRAY *et al.*, 2018; WHO, 2018). No Brasil, para 2019, estima-se 600 mil novos casos de câncer, sendo o câncer de próstata e mama mais ocorrentes para homens e mulheres, respectivamente (INCA, 2017).

O câncer de pele é um dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil e pode ser classificado de duas formas, como melanoma e não melanoma. Estima-se 85.170 casos novos de câncer de pele não melanoma entre homens e 80.410 nas mulheres para 2019, para o Brasil. Quanto ao melanoma, modelo experimental do projeto, apesar da sua baixa incidência (2.920 casos novos em homens e 3.340 casos novos em mulheres) sua letalidade é elevada devido a sua alta capacidade metastática (INCA, 2017).

2.2 MELANOMA

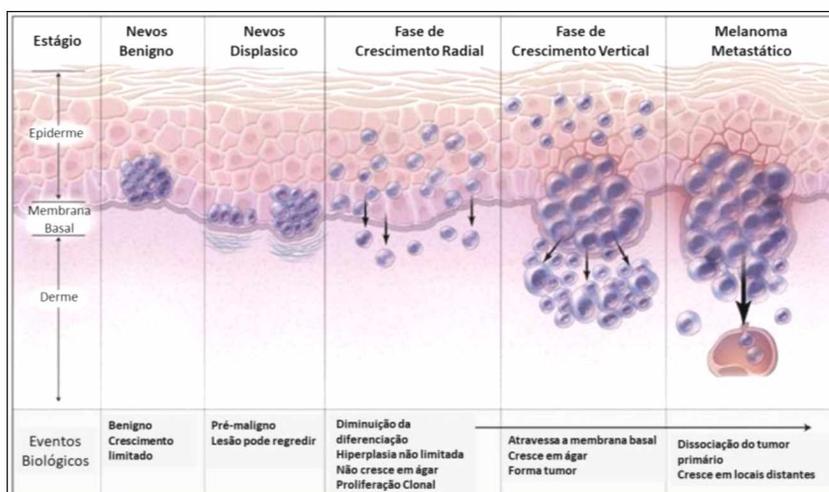
O melanoma é um tipo de câncer que surge a partir dos melanócitos. Estas são células especializadas na produção de melanina e são originadas a partir das células da crista neural, sendo encontradas predominantemente na camada basal da epiderme. A melanina é um pigmento responsável pela coloração da pele e proteção contra radiação ultravioleta (CICHOREK *et al.*, 2013).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma são exposição à radiação ultravioleta (UV), histórico familiar, imunossupressão, presença de múltiplos nevus e apresentar a pele clara (WHITEMAN *et al.*, 2001). A intensa exposição à radiação UV causa danos ao DNA através do estresse oxidativo, gerando mutações genéticas e imunossupressão, além de induzir respostas inflamatórias que afetam a atividade dos melanócitos podendo levar à transformação maligna dessas células (GORDON, 2013; CHHABRA *et al.*, 2017).

Esse tipo de câncer, quando metastático, é um dos mais heterogêneos e altamente mutados dentre os tipos de câncer. O melanoma apresenta cerca de 0.1 mutações por 100 mega base (MB) e, dentre essas estão mutados principalmente os genes BRAF (50%), NRAS (25%), e NF1 (14%), sendo todos relacionados com o aumento da proliferação e sobrevivência celular, etapas importantes para desenvolvimento primário do tumor (SHAIN *et al.*, 2015; DAVIS *et al.*, 2018; KOZAR *et al.*, 2019).

O melanoma é um dos tipos de câncer mais agressivos por apresentar uma série de características que o capacita a realizar metastase. As células do melanoma apresentam aumento de expressão de moléculas de adesão na superfície celular que permitem a intravação e extravasão em vasos sanguíneos; indução de produção de metaloproteinases; migração e plasticidade celular. Isso permite que os tumores de melanoma sejam altamente angiogênicos e utilizam o microambiente tumoral para promover a proliferação celular e o crescimento do tumor (FIGURA 2) (THOMPSON *et al.*, 2005; BRAEUER *et al.*, 2013).

FUGURA 2: Fases do melanoma



FONTE: Adaptado de MILLER; MIHRM, 2006

LEGENDA: Os melanócitos alterados podem apresentar um crescimento limitado e ainda aprisionado, não atravessando a membrana basal, como também um crescimento desordenado, que pode ser radial e/ou vertical. Quando essas células alcançam vasos sanguíneos ou linfáticos podem se espalhar pelo corpo e colonizar outros tecidos (metástase).

O melanoma primário pode disseminar-se tanto pela via linfática como pela via sanguínea, sendo a primeira a via mais frequente de metástase nas fases iniciais. Desse modo, é frequente o surgimento de metástases nos gânglios próximos ao tumor primário. Outras regiões onde comumente encontram-se metástases são nos pulmões, fígado, cérebro e ossos (VILLALOBOS LEÓN *et al.*, 2013). Atualmente, com os avanços do tratamento do melanoma em pacientes com diagnóstico de metástase levou uma melhora significativa na sobrevida desses, com taxas de sobrevida de 1 e 2 anos de aproximadamente 70 e 50-60%, respectivamente (ROZEMAN *et al.*, 2017)

2.3 METÁSTASE

Metastase é o processo de disseminação de células cancerosas de tumores primários e a subsequente formação de novas colônias tumorais em tecidos distantes. Quando os pacientes apresentam metástase acaba-se levando a morbidade desses indivíduos como também é de grande dificuldade para o tratamento na clínica. Este é um processo complexo que necessita de uma série de etapas e ao final, poucas das células que deixaram o tumor

primário e foram transportadas pela corrente sanguínea conseguirão invadir e colonizar novos tecidos e órgãos (FIDLER, 2003; GEIGER; PEEPER, 2009).

Esta sequência de eventos envolve a invasão local de células tumorais primárias em tecidos próximos; intravasamento dessas células no sistema circulatório e sobrevivência durante o trânsito pelas vias linfática e sanguínea; adesão e extravasamento através das paredes vasculares no parênquima de tecidos distantes; formação de colônias micrometastáticas neste parênquima; e a proliferação de colônias microscópicas, sendo este último processo denominado colonização (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017).

De maneira geral, as células cancerosas de certos tipos de câncer apresentam uma preferência sobre qual órgão irá se estabelecer no processo da metástase. Como por exemplo, as células do câncer de mama têm preferência por realizar metástases no fígado do que no baço (GEIGER; PEEPER, 2009). Devido a várias observações como esta, Stephen Paget em 1889 formulou a hipótese da semente e do solo, em que a célula (a semente) necessita de um órgão (o solo) propício para se estabelecer e proliferar. Esse processo não depende apenas das características da célula, mas também das características que o órgão apresenta. Uma dessas seria a forma dos capilares presentes nos órgãos onde, no fígado os capilares são sinusoides com espaços entre as células endoteliais e membrana basal descontínua, o que facilitaria a extravasão de células cancerosas circulantes. Já no pulmão, os capilares apresentam capilares e membrana basal justas, impedindo o extravasamento (MASSAGUÉ; OBENAU, 2016).

O crescimento de uma colônia, que passou por todos os processos da cascata de metástase, é a fase final e mais fatal da progressão de um tumor. A ativação do programa de transição epitelio-mesenquimal (EMT), que é capaz de conduzir a disseminação física de células de câncer para regiões anatômicas distantes, também pode conferir a essas células importantes traços de células-tronco (denominadas *câncer stem cells*) altamente relevante para a colonização metastática. (MANI *et al.*, 2008; ELSHAMY; DUHÉ, 2013; WELCH; HURST, 2019).

Além disso, muitos estudos demonstraram que as células disseminadas sofrem o processo reverso do EMT em algum momento após a invasão tecidual, ou seja, elas passam por um processo de transição mesenquima-epitelial (MET). Esta reversão para um estado epitelial restaura

muitas das características celulares epiteliais que foram perdidas durante a passagem pela EMT e possibilita a reconstrução de organizações celulares hierárquicas semelhantes às presentes nos tumores primários iniciais, que é essencial para a colonização metastática. De fato, tais reversões podem, na verdade, ser essenciais para a colonização metastática (KALLURI; WEINBERG, 2009; DEL POZO MARTIN *et al.*, 2015; MASSAGUÉ; OBENAU, 2016).

Portanto, a colonização metastática depende em parte das células disseminadas possuírem a capacidade de iniciar tumores como também devem de alguma forma possuir programas adaptativos que lhes permitem prosperar no microambiente presente no parênquima de tecidos diferentes do tumor primário (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017).

2.4 TRATAMENTOS PARA MELANOMA

O tratamento mais usual para melanoma em estágios iniciais consiste na remoção cirúrgica, sendo esta a abordagem mais efetiva para extinguir tumores primários, consistindo em uma excisão local com diferentes margens de segurança dependendo da classificação de Breslow (THOMAS *et al.*, 2004).

O melanoma quando diagnosticado em um estágio avançado apresenta prognóstico ruim, sendo a quimioterapia muito utilizada na clínica separadamente ou em combinação com outras drogas, apesar de sua baixa eficácia. A Dacarbazina e seu análogo, Temozolomida, são os principais quimioterápicos utilizados no tratamento do melanoma atualmente. No entanto, muitos estudos demonstraram que ambos apresentam baixa eficácia, com mediana de duração de resposta de 5-6 meses e menos de 2% de sobrevivência dos pacientes 6 anos depois do início do tratamento (MISHRA *et al.*, 2018).

Nas últimas décadas vem sendo estudados inibidores de *checkpoint* imunológico e terapia direcionada no tratamento do melanoma metastático. Devido à alta resistência das células do melanoma tem sido buscado tratamentos direcionados a biomarcadores específicos que levam a progressão desse câncer. Os inibidores de BRAF (oncogene mutado mais comum no melanoma) e de MEK (gene presente na mesma cascata de sinalização de BRAF) são os tratamentos mais utilizados e apresentaram uma potencial

redução de metástases e na progressão de tumores sólidos em pacientes. E ainda sim apresentam efeitos colaterais, como pirexia, calafrios, dor de cabeça, diarreia, náusea e vômito (ROZEMAN *et al.*, 2017; MISHRA *et al.*, 2018; SCHADENDORF *et al.*, 2018).

Além disso, a epidemiologia clínica também apoia cada vez mais a existência de respostas imunes antitumorais em algumas formas de câncer humano (NELSON, 2008; BINDEA *et al.*, 2010; FERRONE; DRANOFF, 2010). Por exemplo, pacientes com tumores de cólon e ovário que são fortemente infiltrados com CTLs e células NK têm um prognóstico melhor do que aqueles que não as possuem abundantemente (NELSON, 2008; PAGÈS *et al.*, 2010). Desta forma grande relevância tem sido dada à imunoterapia, que aumenta o potencial da resposta imune contra tipos de câncer de pele altamente imunogênicos, como o melanoma, assim como aumenta a remoção de células cancerosas danificadas pela citotoxicidade das drogas. Interleucina IL2, Interferon alfa, ipilimumab e timosina alfa 1 são as principais imunoterapias utilizadas no tratamento de melanoma. Com a introdução da imunoterapia outros efeitos adversos relacionados à resposta imune vêm sendo descritos, como diarreia e dores articulares, demonstrando que a certo nível a imunoterapia pode ser tóxica ao paciente (ROZEMAN *et al.*, 2017; MISHRA *et al.*, 2018; DOMINGUES *et al.*, 2018;).

As opções de tratamento para pacientes com melanoma avançado aumentaram na última década e a introdução de terapia direcionada e imunoterapia levou a uma melhora significativa na sobrevida dos pacientes, com taxas de sobrevida de 1 e 2 anos de aproximadamente 70 e 50-60%, respectivamente (ROZEMAN *et al.*, 2017), em comparação a quinze anos atrás em que a sobrevida de pacientes com melanoma metastático era de 7 a 10 meses quando tratados com quimioterapia (EIGENTLER *et al.*, 2003).

O desafio no tratamento do melanoma é a baixa taxa de resposta com as modalidades de tratamento existentes. A quimioterapia não consegue tratar o melanoma devido à sua resistência e, em vez disso, mata as células normais do corpo, gerando efeitos colaterais tóxicos. A imunoterapia e a terapia direcionada, apesar de apresentarem uma excelente resposta contra o melanoma, ainda assim apresentam efeitos colaterais significantes, o que afeta a qualidade de vida dos pacientes, além de apenas aumentarem a sobrevida (HODI *et al.*, 2010; SHARMA *et al.*, 2017). Diante disso, ainda é necessária a

busca por terapias que sejam eficazes no combate do melanoma e apresentem baixos efeitos colaterais para os pacientes.

2.4.1 Heparinas

A heparina é um heteropolissacarídeo, da família dos glicosaminoglicanos, formada por dissacarídeos repetitivos, onde uma das duas unidades é um ácido urônico (D-Glucurônico ou L-Idurônico) e outra é um aminoaçúcar N-acetilado (D-Glucosamina), contendo grupamento sulfato em diversas posições. Mais especificamente é composta por unidades hexassacarídicas octossulfatadas repetitivas, constituída essencialmente de dois tipos de dissacarídeos: um trissulfatado e outro dissulfatado, respectivamente na proporção 2:1. Fisiologicamente a heparina é encontrada principalmente em mastócitos com função que ainda não é muito bem determinada. No entanto, é conhecida principalmente devido sua função farmacológica, pois é um agente terapêutico com capacidade de inibir a coagulação sanguínea, principalmente pela sua capacidade de se ligar a antitrombina (uma molécula que atua como inibidor de várias fatores da coagulação), que por sua vez se liga a trombina (e outros fatores), uma protease essencial para a coagulação do sangue (MUÑOZ; LINHARDT, 2004; NADER *et al.*, 2004; SAMPAIO *et al.*, 2006).

A trombose associada ao câncer é uma complicação frequente associada à progressão tumoral (RICKLES; FALANGA, 2001). Essa relação entre trombose e câncer é amplamente conhecida desde que Armand Trousseau, em 1865, descreveu que pacientes com câncer podem apresentar a formação de trombos para eventos trombóticos que precedem o diagnóstico de uma malignidade visceral oculta ou que aparecem simultaneamente com o tumor. A essa patologia foi nomeada como Síndrome de Trousseau (VARKI, 2007), que em um contexto tumoral é caracterizada pela capacidade das células tumorais de ativar constitutivamente a cascata de coagulação, por meio de uma cisteína proteinase, levando a ativação de fator Xa, fator VIIa, trombina e fibrina, moléculas relacionadas ao crescimento tumoral, angiogênese, invasão e metástases (VARKI, 2007; FALANGA *et al.*, 2009; BORSIG, 2010). Além disso, animais que apresentam fenótipo pró-trombótico estão mais

susceptíveis a colonização por metástase do que os que apresentam um fenótipo hemofílico (BRÜGGEMANN *et al.*, 2008).

Por isso, a heparina é comumente utilizada para a prevenção ou tratamento de complicações tromboembólicas em pacientes com câncer (ZACHARSKI, L.R e ORNSTEIN, D.L. 1998; FALANGA; MARCHETTI, M. 2007), levando a uma melhor sobrevida, como observado em muitos estudos clínicos (KUDERER *et al.*, 2007). Atualmente sabe-se que a heparina é capaz de diminuir a progressão dos cânceres metastáticos de diversos tipos, como carcinoma mamário, de cólon, pulmão, bem como em melanoma (BORSIG, 2010).

No entanto, o tratamento com heparina é muito restrito, pois em alguns casos pode levar a hemorragia, bem como trombocitopenia, necrose da pele e osteoporose (GRAY *et al.*, 2008). Diante disso, foram sintetizadas outras moléculas derivadas de heparinas que tivessem seu potencial biológico anticoagulante reduzido, afim de que um uso crônico fosse possível (reduzindo seus efeitos colaterais), bem como manter seu potencial antitumoral.

2.4.2 Heparina de baixo peso molecular - LMWH

A heparina de baixo peso molecular (LMWH), composto de estudo do presente projeto, é derivada da hidrólise parcial ou ação enzimática das moléculas de heparina, possuindo atividade anticoagulante reduzida e é amplamente utilizada na prevenção e tratamento de complicações tromboembólicas em pacientes com câncer metastático (HIRSH *et al.*, 2001; KLERK *et al.*, 2005; VAN DOORMAAL *et al.*, 2011). Estudos mostram que LMWH podem melhorar a sobrevida em pacientes com câncer com mecanismos que são diferentes de seu efeito antitrombótico, estando ligados à capacidade de influenciar diretamente na biologia do tumor, como no caso de reduzir a proliferação, adesão celular, angiogênese e na regulação da EMT de células cancerígenas (BOBEK; KOVAŘÍK, 2004; ZHANG *et al.*, 2016).

Um dos principais efeitos anti-metastáticos estudados com este composto é a capacidade de interferir na interação das células metastáticas com as plaquetas (MOUSA, 2002; MOUSA, 2004). Essa interação auxilia a sobrevivência das células no trânsito na via sanguínea e instalação no novo órgão em que irá se instalar. Assim, uma ruptura nessa interação reduz a

formação de colônias metastáticas, em modelo experimental de metástase pulmonar com células de melanoma murino, por exemplo (IM *et al.*, 2004).

Como consequência do exposto, a maioria dos estudos realizados *in vivo* em modelo de metástase experimental murino com LMWH, modelo experimental desse trabalho, são por meio de tratamentos preventivos, em que os animais são previamente ou logo em seguida a inoculação das células expostas a este anticoagulante (AMIRKHOSRAVI *et al.*, 2003; MOUSA *et al.*, 2006). Há na literatura um estudo realizado por Ono *et al.* (2002), empregando LMWH derivada da degradação alcalina de uma heparina não fracionado e posteriormente ligada a poliestireno, a qual reduziu os focos de metástase no pulmão em experimento de metástase experimental com início do tratamento intravenoso um dia após a inoculação das células B16-F10, seguido por tratamento diário por 7 dias. Apesar desta metodologia ter um intuito terapêutico, objetivo deste trabalho de monografia, a LMWH do presente estudo não apresenta nenhuma ligação ao composto como também o tempo de início de tratamento é mais tardio e por via intraperitoneal. Assim, foi possível analisar se este composto apresentasse alguma influência no estágio em que as células já se estabeleceram e colonizaram o pulmão.

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a LMWH apresenta uma atividade em células de melanoma murino B16-F10, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Santi (2015) demonstrou que a LMWH não induz citotoxicidade, como também não leva essas células à apoptose, porém o tratamento gera uma redução nos processos de migração e invasão celular, acompanhado de diminuição da atividade gelatinolítica, da expressão gênica das metaloproteinases 2 e 9 e da quantidade de ácido hialurônico. Costa (2014) evidenciou que o tratamento terapêutico com LMWH em camundongos C57BL/6 diminui o volume tumoral no modelo de tumor sólido.

Diante dos dados da literatura que evidenciam a atividade antitumoral da heparina de baixo peso molecular, bem como os resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a LMWH apresenta-se como agente antitumoral promissor para melanoma. No entanto, pouco é evidenciado sob a ação deste composto no processo de colonização da metástase, como um tratamento terapêutico para este tipo de câncer de pele altamente metastático.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTIVO CELULAR E ANIMAIS

A linhagem empregada foi a B16-F10 de melanoma murino, advinda do Banco de Células do Rio de Janeiro, BCRJ. As células foram cultivadas em garrafas de cultivo de 75cm² (Sarstedt), com meio DMEM (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 0,25µg/mL de antibióticos penicilina-estreptomicina (Gibco) em 0,85% de solução salina. Estas foram mantidas em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C, em atmosfera úmida.

Os animais utilizados foram camundongos C57BL/6, com idades entre 8 e 12 semanas, os quais foram adquiridos do Instituto Carlos Chagas, Fiocruz, e mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas, UFPR. O pedido de uso dos animais ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR (CEEAF-UFPR) já foi submetido e aprovado em (CEUA/931b). Ressaltasse que foram respeitados e seguidos todos os regimentos da Lei Nacional nº 6.638, de 5 de novembro de 1979, para o manejo científico dos animais.

3.2 HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR EM ESTUDO

No presente trabalho foi utilizada uma enoxaparina sódica com peso médio de 4.500 dáltons, obtida comercialmente como Clexane®. Essa heparina de baixo peso molecular é derivada heparina da mucosa intestinal suína por meio da despolimerização alcalina do éster benzil. Sua estrutura apresenta um grupo ácido 2-O-sulfo-4-enepiranosurônico no final não redutor da cadeia e um 2-N, 6-O-dissulfo-D-glicosamina no final redutor da cadeia. Cerca de 20% (variando entre 15% e 25%) da sua estrutura contêm um derivado 1,6 anidro no final redutor da cadeia polissacarídica (CLEXANE,2014).

A diluição da LMWH foi realizada em dois veículos: em meio DMEM (Gibco) sem soro fetal bovino para experimentos *in vitro* e, em solução salina tamponada com fosfato (PBS) para experimento *in vivo*. Para os experimentos *in vitro* a dose utilizada foi 100 µg/ml, conforme previamente realizado por Santi (2015).

Para o modelo *in vivo* a dose utilizada foi 1 mg/kg, conforme descrito previamente por Fukuda et al. (2013), como dose eficiente e segura para uma

atividade antitrombótica em camundongos. Como também evidenciado por Merli et al. (2001) como uma dose segura e efetiva para tratamento de tromboembolismo venoso na clínica, assim como por Meyer et al. (2002) em casos de pacientes com câncer e tromboembolismo venoso.

3.3 ENSAIO CLONOGÊNICO

Este ensaio foi realizado conforme descrito por Franken et al. (2006), com adaptações. 500 células B16-F10 foram plaqueadas em uma placa de 6 poços (Sarstedt) e após 24h foi realizado o tratamento com LMWH (100 µg/ml) ou não (veículo), que posteriormente ficou incubada por 96h. Ao final desse tempo de incubação o sobrenadante dos poços foi descartado e as células foram fixadas com Etanol 50% : Água ultra pura 48% : Ácido acético glacial 2% por 20 min, seguido da remoção e lavagem dos poços 1x com água ultra pura. As colônias foram coradas com 1ml de solução de Cristal Violeta (0.25 mg/ml) por 20 minutos. Depois a solução foi retirada e os poços lavados novamente 1x com água ultra pura. As colônias formadas foram fotografadas e contadas utilizando o software ImajeJ Fiji.

3.4 ENSAIO DE ADESÃO

O ensaio foi baseado no protocolo formulado por Rocha et al. (2005) com modificações. Duas abordagens foram empregadas. A primeira realizada com o pré-tratamento das células B16-F10, em que 12000 células foram plaqueadas em placas de 6 poços (Sarstedt) e após 24h foram tratadas com LMWH a 100 µg/ml ou não (veículo). Após 72h, as células foram desaderidas com EDTA 2 mM e centrifugadas em tubos de 15 ml (Sarstedt) por 5 min a 1800 rpm, e posteriormente contadas e ressuspensas em DMEM com soro fetal bovino. Em seguida 24 000 células tratadas foram plaqueadas na placa de 96 poços em cada poço, a qual terá os poços previamente cobertos overnight em refrigerador com 50µl de Colágeno I (London Resin), ou Fibronectina (BD) ou Matrigel (BD), todos na concentração de 20 µg/ml em PBS. Após 2h30 min de adesão foi retirado o meio cautelosamente e depois os poços foram lavados com PBS a 37°C. As células foram fixadas com solução 50% Etanol: 49% água destilada: 1% Ácido Acético Glacial por 20 minutos, lavadas 1x com PBS,

coradas com 100 µL da solução de cristal violeta 0.2% (Sigma) em etanol 5%, durante 5 minutos, e então lavadas 1x com PBS. Então o corante foi eluído com 100 µL da solução ácido acético (Dinâmica) 33% em água ultra pura (15 minutos), procedendo-se então para a leitura da absorbância em leitora de microplacas em 570nm (Biotek Epoch).

A outra abordagem é com o pré-tratamento dos *coats*, em que células B16-F10 foram mantidas em cultura na garrafa de 25cm² (Sarstedt) por 72h sem nenhum tratamento incluindo o veículo. Como descrito anteriormente, os poços de uma placa de 96 poços (Sarstedt) serão cobertos com 50µl de Colágeno I (London Resin), ou Fibronectina (BD) ou Matrigel (BD), todos na concentração de 20 µg/ml em PBS e deixada no refrigerador *overnight*, seguido do tratamento com LMWH a 100 µg/ml ou não (veículo) dos *coats*. Após 24h de tratamento dos *coats*, as células mantidas em cultura foram desaderidas com EDTA 2 mM e centrifugadas em tubos de 15 ml (Sarstedt) por 5 min a 1800 rpm, e posteriormente contadas e ressuspendidas em DMEM com soro fetal bovino. Assim 24 000 células foram plaqueadas na placa de 96 poços por poço. Após 2h30 min foi retirado o meio cautelosamente e depois os poços foram lavados com PBS a 37°C. As células foram fixadas com solução 50% Etanol: 49% água destilada: 1% Ácido Acético Glacial por 20 minutos, lavadas 1x com PBS, coradas com 100 µL da solução de cristal violeta 0.2% (Sigma) em etanol 5%, durante 5 minutos, e então lavadas 1x com PBS. Então o corante será eluído com 100 µL da solução ácido acético (Dinâmica) 33% em água ultra pura (15 minutos), procedendo-se então para a leitura da absorbância em leitora de microplacas em 570nm (Biotek Epoch).

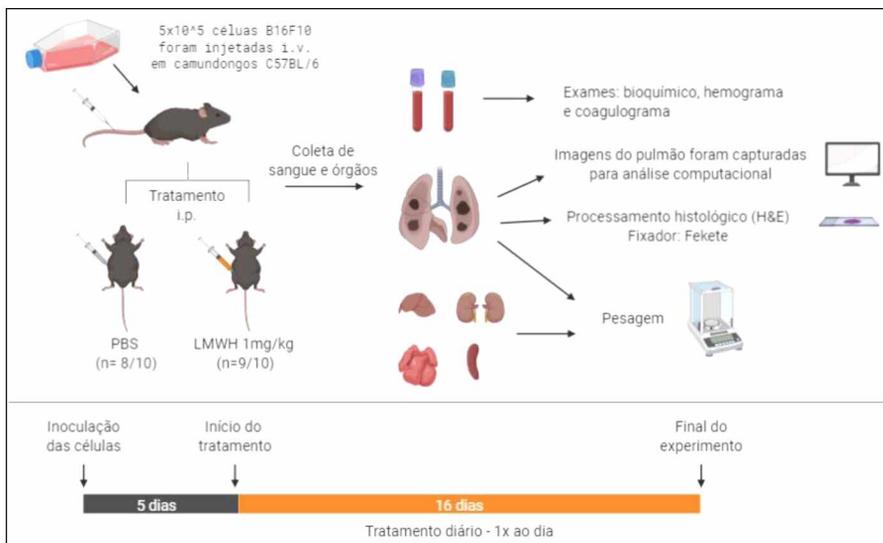
3.5 METÁSTASE EXPERIMENTAL

O modelo de metástase pulmonar *in vivo* foi baseado no protocolo descrito por Guimarães et al, (2010) com modificações. Células B16-F10 foram desaderidas das garrafas de cultura após atingir de 70 a 80% da confluência das mesmas, através da incubação por 5 minutos com Tripsina (1%) em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4, ressuspendidas em DMEM, centrifugadas e lavadas duas vezes em PBS, para então a realização de contagem diferencial em Câmara de Neubauer empregando o corante Azul de Tripán. O experimento foi realizado apenas com garrafas que possuíam

viabilidade celular igual ou maior a 90%. 5×10^5 células em 0,1ml de PBS foram inoculadas na veia caudal dos animais.

Após 5 dias de inoculação, os animais foram tratados diariamente com heparina de baixo peso molecular a 1 mg/kg, ou não (grupo com veículo) por via intraperitoneal, por 16 dias. No final do experimento os animais foram anestesiados com Cetamina 100mg/Kg e Xilazina 20mg/kg para coleta de sangue para realização de testes Bioquímicos e Hemograma (Tubo de coleta a vácuo com EDTA K3) e, Coagulograma (Tubo de coleta a vácuo com 3,2% de citrato de sódio) pelo Hospital Veterinário – UFPR, e posteriormente eutanasiados por deslocamento cervical para coleta dos órgãos, os quais foram pesados e fixados com solução Fekete (58% de etanol 95%; 8% de formaldeído 37%; 4% de ácido acético glacial; 22% de água destilada) para posterior processamento histológico. Os pulmões foram fotografados, tanto a região ventral quanto dorsal, para posterior análise de área de metástase utilizando o software Photoshop e ImageJ Fiji (FIGURA 3).

FIGURA 3: Esquema metástase experimental



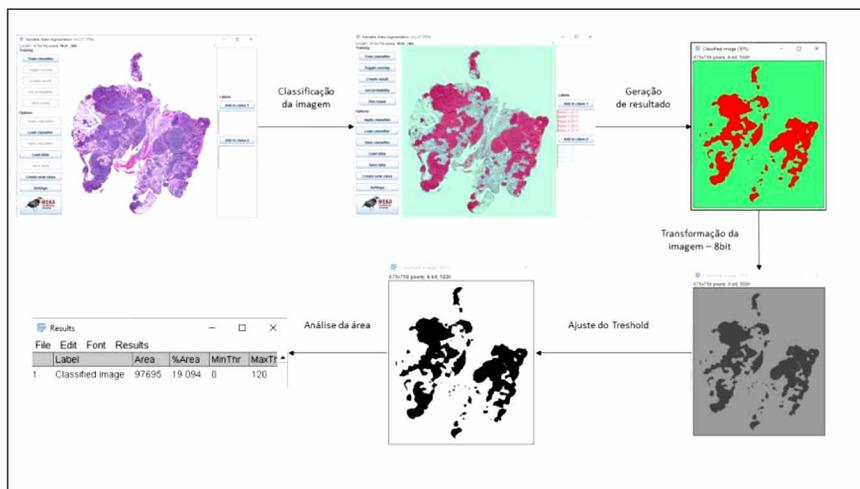
FONTE: O autor (2019)

LEGENDA: O esquema acima da linha representa todos os passos do experimento de metástase pulmonar experimental, desde o início da inoculação, período de tratamento, coleta de sangue e órgãos para posteriores processamentos. O esquema abaixo da linha é uma representação cronológica do experimento.

3.6 HISTOLOGIA

Para as análises histológicas foi utilizada a metodologia previamente adotada pelo grupo e publicado por Ferrari de Andrade e colaboradores (2016) com algumas modificações. Brevemente, os tecidos tumorais foram fixados em solução Fekete. Essas amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, diafanizadas em xilol, incluídas em parafina, cortadas em micrótomo e depositadas em lâminas para a realização da técnica de coloração hematoxilina e eosina (HE). O material foi fotografado utilizando o Scanner de Lâminas Histológicas (modelo Vslider, Carl Zeiss/Metasystems). A análise da área de metástase foi realizada utilizando o plugging Trainable Weka Segmentation do ImageJ Fiji (FIGURA 4).

FIGURA 4: Esquema da análise histológica



FONTE: O autor (2019)

LEGENDA: O esquema representa os passos para análise histológica da área de tumor no pulmão de camundongo pelo plugging Trainable Weka Segmentation do programa ImageJ Fiji.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPad Prism V.6.01. Quando o N amostral for grande o suficiente, o teste de normalidade D'Agostino-Pearson foi empregado para verificar a normalidade ou não da distribuição dos dados. Em presença de normalidade, o teste T pareado foi empregado. Em ausência de normalidade ou em impossibilidade de realização do teste de normalidade, os dados foram admitidos como possuindo

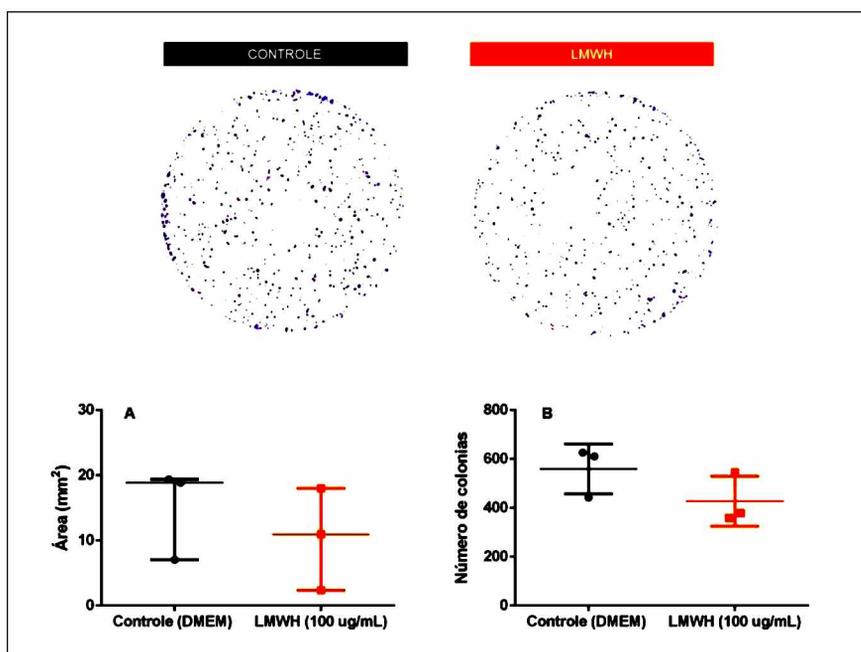
distribuição não normal, e o teste T não pareado (Mann Whitney) foi empregado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ENSAIO CLONOGÊNICO

O intuito do ensaio clonogênico é verificar a capacidade de uma célula crescer e formar uma colônia. Para este estudo, essa técnica foi utilizada para avaliar se o tratamento das células com LMWH fosse capaz de interferir na formação de colônias. A FIGURA 5 apresenta os resultados do presente ensaio que não se verificou uma alteração estatisticamente significativa na capacidade de formação de colônias, tanto na área, quanto no número, quando comparados com o grupo controle.

FIGURA 5: Ensaio clonogênico



FONTES: O autor (2019)

LEGENDA: A figura acima representa os resultados obtidos com o ensaio clonogênico. As imagens acima indicam poços representativos de cada grupo. (A) O gráfico indica área total (mm²) formadas pelas colônias. (B) O gráfico indica o número de colônias formadas. Estes dados representam o resultado de três experimentos independentes, demonstrados por mediana com intervalo interquartil. A análise estatística foi feita através do teste de Mann Whitney.

Na literatura, estudos utilizam o ensaio de colônia como um dos parâmetros avaliados das atividades antitumorais de heparinas. Em um estudo

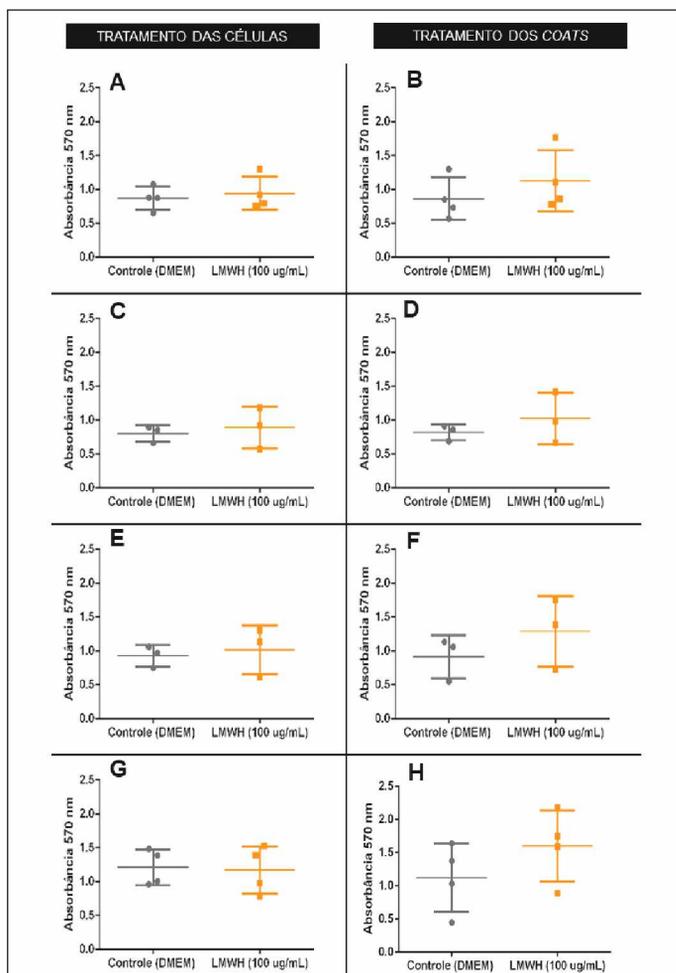
recente desenvolvido por Brito et al. (2018), um composto similar a heparina/heparan sulfato extraído do crustáceo *Litopenaeus vannamei* reduziu significativamente a formação de colônias com células B16-F10 plaqueadas na confluência de 100 células por poço, tratadas após 24h e incubadas por 10 dias. Além disso, Niu et al. (2012) demonstraram que a LMWH reduz a formação de colônias, nas mesmas condições do trabalho citado anteriormente, em células tronco de câncer de pulmão resistentes a terapia mais comum, a cisplatina. Diferente dos relatos na literatura, os resultados do presente trabalho não demonstraram uma redução estatística da formação de colônias. A realização de um quarto experimento será feita visando avaliar se o N amostral está interferindo ou não no resultado.

4.2 ENSAIO DE ADESÃO

A FIGURA 6 demonstra que o tratamento com LMWH resultou num aumento da adesão das células sobre três substratos utilizados como *coats*, ou mesmo na placa sem qualquer *coat*, quando comparado com o controle, com exceção para as células pré-tratadas foram depositadas sob matrigel (FIGURA 6 – G). Quando comparamos as abordagens de tratamento aplicadas, houve uma maior adesão celular nos *coats* tratados (FIGURA 6 – B, D, F e H). No entanto, não houve uma evidência estatística desse aumento da adesividade celular.

A adesão célula a célula e com a matriz extracelular (MEC) determina a polaridade das células e participa na manutenção dos tecidos. Nos tumores, adesão célula-célula é geralmente reduzida o que permite as células cancerígenas burlarem o sistema tecidual normal, resultando na destruição da estrutura histológica, que é a marca morfológica de tumores malignos. A adesividade com a MEC reduzida também é indispensável para invasão do câncer e metástase. Além disso, as interações diretas das células tumorais com plaquetas, leucócitos e componentes do sangue contribuem significativamente para a adesão de células cancerosas, extravasamento e o estabelecimento de lesões metastáticas (HIROHASHI; KANAI, 2004; KUMAR; WEAVER, 2009; BENDAS; BORSIG, 2012).

FIGURA 6: Ensaio de adesão



FONTE: O autor (2019)

LEGENDA: A figura representa os resultados obtidos no ensaio de adesão. (A e B) Os gráficos representam as duas abordagens de tratamento realizados sob a placa. (C e D) Os gráficos representam as duas abordagens de tratamento realizados sob colágeno I. (E e F) Os gráficos representam as duas abordagens de tratamento realizados sob Fibronectina. (G e H) Os gráficos representam as duas abordagens de tratamento realizados sob Matrigel. Os gráficos indicam a média das leituras de absorbância (a 570 nm), obtidas por quadruplicatas de 3 ou 4 experimentos biológicos independentes, demonstrados por mediana com intervalo interquartil. A análise estatística foi feita através do teste de Mann Whitney.

Visto a grande importância da adesão celular com a progressão tumoral e metástase, o ensaio de adesão desenvolvido neste trabalho teve como objetivo analisar se a LMWH interfere na adesividade da célula de melanoma com a matriz extracelular, tanto por meio de uma modulação direta na célula ou pela interação com a MEC *in vitro*. Para isso as células previamente tratadas,

ou não, foram acomodadas em uma camada formada por Matrigel, colágeno I, Fibronectina, ou sem a presença destes, como descrito anteriormente em Material e Métodos. Vale destacar que o Matrigel é composto pelas principais moléculas encontradas na matriz extracelular, como a laminina, colágeno IV, heparan sulfato e fatores de crescimento. Assim, este reagente é amplamente utilizado para mimetizar a MEC (KLEINMAN; MARTIN, 2005). Para complementar a análise, a Fibronectina compõe a matriz extracelular e também está relacionada com o processo de progressão do tumor e metástase (RUOSLAHTI, 1999). O Colágeno I é um dos principais tipos de colágeno encontrados no pulmão e também importante no processo de metástase (DUNSMORE; RANNELS, 1996; HOTARY *et al.*, 2000).

Por outro lado, já foi relatado por Pross *et al.* (2003), que um tipo de LMWH, a Reviparin, foi capaz de reduzir a quantidade de células de adenocarcinoma aderidas sob colágeno I e matrigel, quando tratadas e deixadas incubando por 30 min em poços previamente recobertos pelos *coats*. Em um outro estudo realizado por Chalkiadaki *et al.* (2011), outro tipo de LMWH, a enoxaparina (100 µg/ml) (mesmo tipo utilizado no presente trabalho), reduziu o número de células de melanoma humano M5 aderidas sob uma camada de fibronectina, em um contexto onde as células foram pré-tratadas por 48h com LMWH e posteriormente depositadas sobre a camada de fibronectina por 30 minutos.

Com relação a interação com a matriz extracelular, segundo Bendas; Borsig (2012) e Schmitz *et al.* (2013), LMWH podem interferir na ligação de células do melanoma com componentes da MEC por meio da VLA-4. Um dos principais componentes em que essa integrina se liga é a fibronectina (IMA *et al.*, 2010). No presente trabalho demonstramos que as células expostas aos *coats* com a presença da LMWH apresentaram diferença na mediana com relação ao controle, indicando um aumento. No entanto, esse resultado não foi estatisticamente significativo. Assim, estes dados não corroboram com a análise feita na literatura, e pode ser devido a influência das repetições experimentais, como também na variância observada entre os experimentos. Sob outra perspectiva, um aumento da adesão de células tumorais seria relevante para conter os processos iniciais da metástase, em que estas células perdem sua capacidade de adesão facilitando sua motilidade.

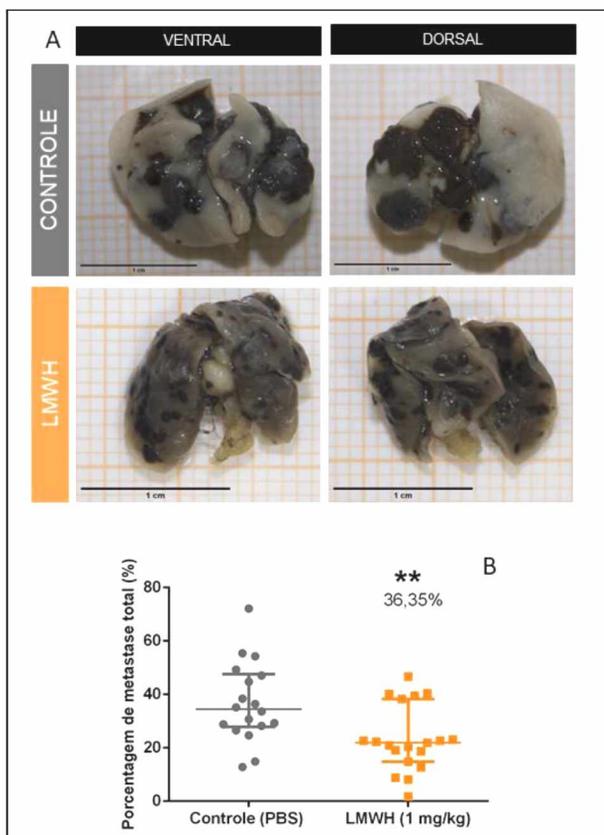
4.3 METÁSTASE EXPERIMENTAL

A FIGURA 7 ilustra os resultados obtidos pela análise da área de foco metastático das imagens capturadas dos pulmões, tanto em vista ventral, quanto dorsal. É possível inferir que os camundongos que receberam o tratamento com a LMWH apresentaram uma redução significativa de, em média, 36,35% no total de área de metástase para dois experimentos biológicos independentes, quando comparados com o controle (FIGURA 7-B).

O câncer metastático apresenta um alto índice de mortalidade dos pacientes. Este é um processo complexo e sistêmico, em que as células do tumor primário devem ter a capacidade de invadir tecidos próximos, seguirem e sobreviverem pelo sistema circulatório, se aderirem e extravasarem pelas paredes vasculares no parênquima de tecidos distantes, se adaptarem e formarem colônias micrometastáticas com posterior proliferação destas. Além disso, o desencadeamento da inflamação, a modulação do microambiente tumoral, e a infiltração de células do sistema imune, também influenciam o processo metastático (CHAFFER; WEINBERG, 2011; WELCH; HURST, 2019)

O modelo de metástase experimental tem como objetivo analisar os processos da metástase a partir da fase em que as células tumorais estão circulantes na corrente sanguínea, bem como se estabelecem em outros órgãos. Como já discutido, este trabalho avaliou o efeito de LMWH na fase de desenvolvimento dos nódulos pulmonares. Por isso que o tratamento foi iniciado após 5 dias da inoculação das células. Vale ressaltar que, se por um lado já era conhecido que a LMWH possuem ação antitumoral, tanto "*in vitro*" quanto "*in vivo*", até então, os ensaios de metástase experimental conduzidos em animais foram realizados utilizando a administração deste composto horas antes da inoculação das células, ou concomitante ou, ainda, iniciada no dia seguinte (ONO *et al.*, 2002; AMIRKHOSRAVI *et al.*, 2003; MOUSA *et al.*, 2006). Contudo justifica-se o caráter inédito do presente estudo, pois é um tratamento terapêutico e não preventivo, como os demais já realizados.

FIGURA 7: Análise da área de metástase pulmonar



Fonte: o autor (2019)

LEGENDA: A figura acima representa os resultados obtidos *in vivo* sobre o modelo de metástase pulmonar. (A) Imagens dos pulmões dos animais tratados ou não (controle), exibindo os focos de metástase pulmonar no sentido ventral e dorsal. (B) O gráfico representa a porcentagem de metástase do somatório dos dois planos dos pulmões (ventral e dorsal) dos dois experimentos (Controle n=18 ; LMWH n=19) realizados independentes. O gráfico demonstra a mediana com intervalo interquartil. A análise estatística foi feita através do teste de Mann Whitney (** p<0,005).

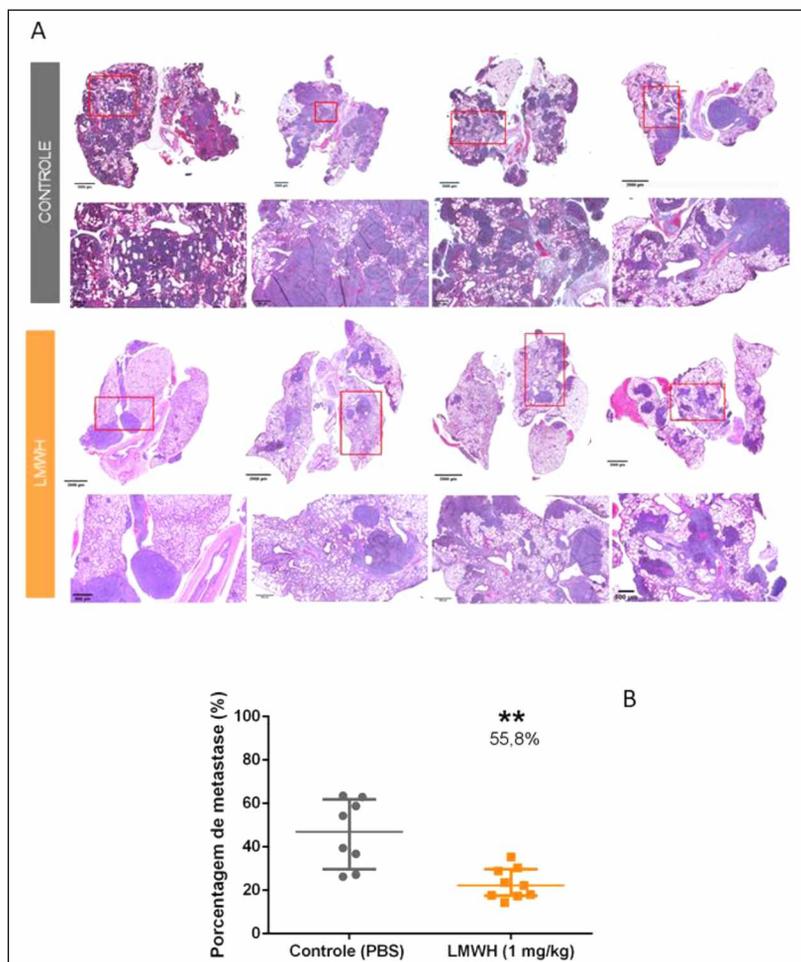
O próximo passo foi analisar a histologia dos pulmões. A FIGURA 8 apresenta os resultados da análise histológica pela coloração HE. É possível observar uma redução de 55,8% da área de metástase no grupo tratado em relação ao controle (FIGURA 8 – B). Também podemos observar, de maneira qualitativa um parênquima bronco alveolar mais estruturado e menos danoso nos cortes histológicos do grupo exposto à LMWH (FIGURA 8 - A).

Com base nesses achados, observa-se que é recorrente a menção na literatura relacionada ao fato que LMWH apresenta atividade que previne a formação de metástase, em modelo semelhante ao realizado neste trabalho,

porém com tratamentos realizados em momentos, doses e via de administração diferentes (ONO *et al.*, 2002; AMIRKHOSRAVI *et al.*, 2003; MOUSA *et al.* 2006; MOUSA; PETERSEN, 2009; CHEN *et al.*, 2015). Vale ressaltar que o principal intuito de realizar o tratamento com LMWH horas antes da inoculação das células, concomitante, ou iniciada no dia seguinte é pela interação desse composto com selectinas e integrinas, responsáveis pela ancoragem das células tumorais com células endoteliais, plaquetas e leucócitos, como P-selectinas, L-selectina, E-selectina, VLA-4. Essa interação reduz a associação de células metastáticas com essas outras células e isso leva uma redução do número de focos de metástase no pulmão (LUDWIG *et al.*, 2004; LUDWIG *et al.*, 2006; BENDAS; BORSIG, 2012).

Já no tratamento terapêutico, com base nos resultados obtidos neste trabalho, notou-se a redução da área de metástase no pulmão, a qual pode estar correlacionada com os resultados *in vitro*, observados por Santi (2015), em que a LMWH levou à redução da atividade gelatinolítica, da expressão gênica das metaloproteinases 2 e 9, sendo diretamente ligada a diminuição da atividade de degradação de MEC, e da quantidade de ácido hialurônico em células B16-F10. Sabe-se que o ácido hialurônico, um glicosaminoglicano, promove a adesão e a migração de células tumorais, e seus pequenos fragmentos estimulam a angiogênese (LOKESHWAR *et al.*, 1997). Por outro lado, entende-se que a expressão de metaloproteinases são importantes para o processo de invasão quando do estabelecimento em outros órgãos (DERYUGINA; QUIGLEY, 2006). No entanto, serão necessárias outras análises para confirmar esses dados.

FIGURA 8: Análise histológica da área de metástase pulmonar



FORNTE: O autor (2019)

LEGENDA: A figura representa os resultados obtidos da análise histológicas (HE) dos pulmões dos animais do primeiro experimento. (A) A prancha de imagens apresenta pulmões representativos próximos da mediana de cada grupo. (B) O gráfico representa a porcentagem de metástase no pulmão por meio da análise realizada no plugin Trainable Weka Segmentation do programa ImageJ Fiji. (Controle n=8 ; LMWH n= 9). O gráfico demonstra a mediana com intervalo interquartil. A análise estatística foi feita através do teste de Mann Whitney (** p<0,005).

Sobre outra perspectiva, essa redução pode ser devida a modulação do microambiente tumoral, como redução do processo inflamatório pela

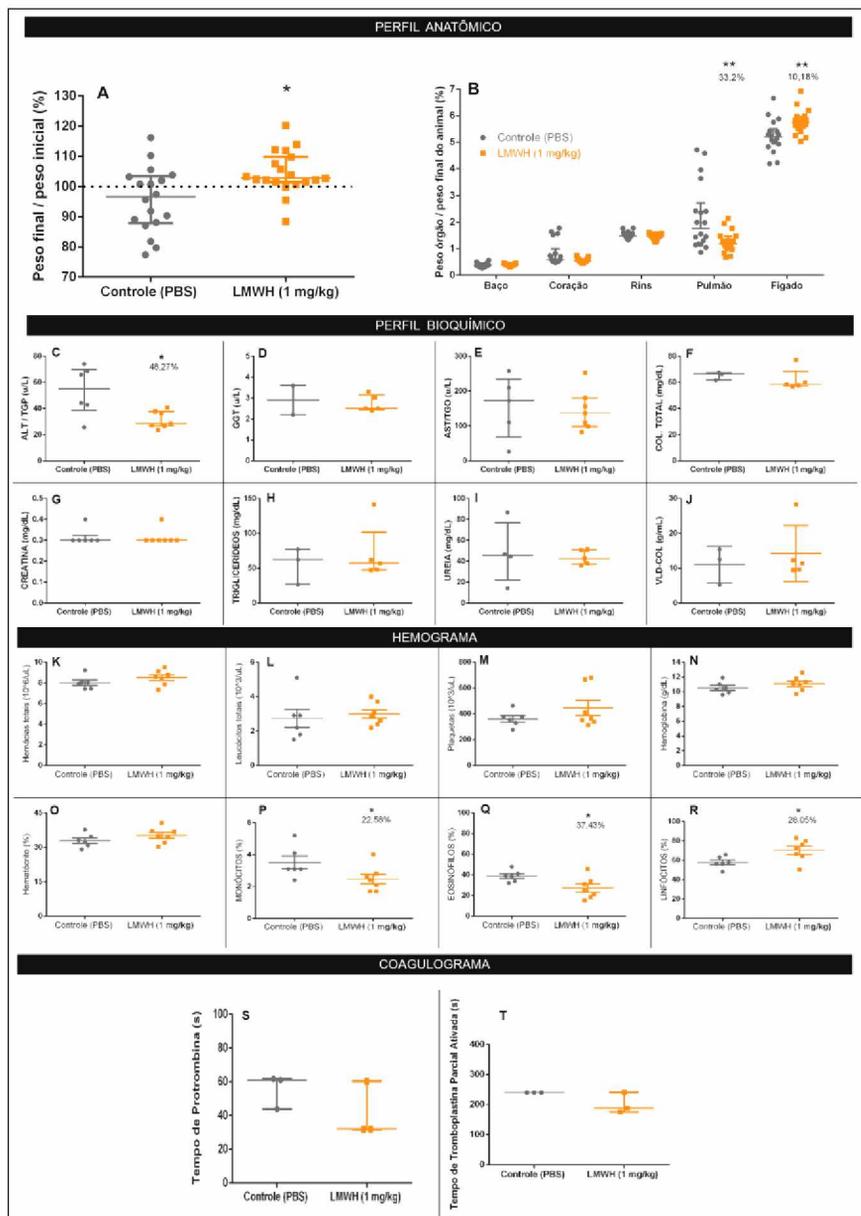
interferência na ligação de L-selectina, ativando fator de necrose tumoral (TNF) e interferons (INF), como também reduzindo o processo neoangiogênico importante para manter-se no novo órgão colonizado (SYLVESTER *et al.*, 1990; TYRRELL *et al.*, 1999; BOBEK; KOVAŘÍK, 2004; BOCHENEK *et al.*, 2013).

Já a análise dos parâmetros anatômicos e hematológicos estão apresentados na FIGURA 9. Nesta podemos observar que os animais que receberam o tratamento mantiveram ou ganharam peso ao longo do tempo de tratamento (FIGURA 9 – A). Podemos observar uma diferença significativa no peso relativo do pulmão e fígado dos animais tratados, em que houve uma redução de 33,2% no peso relativo do pulmão e um aumento de 10,18% no fígado (FIGURA 9 – B). Vale ressaltar que as análises do perfil anatômico foram realizadas com dados dos dois experimentos biológicos independentes. Com relação ao perfil bioquímico, dados do segundo experimento, verificou-se que houve uma redução significativa no exame da alanina aminotransferase (ALT/TGP) do grupo tratado em relação ao controle (FIGURA 9 – C). Já no hemograma podemos afirmar que houve uma redução na porcentagem dos monócitos e eosinófilos e um aumento na porcentagem de linfócitos do grupo tratado em relação ao controle (FIGURA 9 – P, Q e R). Ainda, não se verificou alteração no tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativa (TTPA) entre os grupos de tratamento ou não (FIGURA 9 – S e T). Vale salientar que esse resultado está de acordo com o que se espera para ação da heparina de baixo peso molecular (Gray *et al.*, 2008)

A redução dos efeitos colaterais das terapias para o câncer é relevante na análise do estudo, uma vez que visa o alcance do bem estar dos pacientes. Como já discutido anteriormente, os tratamentos para o melanoma apresentam efeitos colaterais significantes o que afeta a qualidade de vida dos pacientes (MISHRA *et al.*, 2018; SHARMA *et al.*, 2017). Aqui demonstramos que os camundongos mantiveram ou aumentaram seu peso durante o tratamento, como também não apresentaram alterações significativas nos parâmetros hematológicos em sua maioria, o que é muito interessante, pois monitoramento da homeostasia é necessário para pacientes que utilizam anticoagulantes regularmente. De forma interessante, foi observado que os animais tratados cronicamente com LMWH não apresentaram alterações no exame TP e TTPA em relação ao controle. Vale ressaltar que estes exames são utilizados na

clínica avaliar os fatores de coagulação II, V, VII e X da via extrínseca (TP) e fatores da via intrínseca (fatores VIII, IX, XI e XII) e comum (fibrinogênio, protrombina, fatores V e X) da cascata da coagulação (TTPA) (FRANCO, 2001).

FIGURA 9: Análise do perfil anatômico, bioquímico e hematológico



FONTE: O autor (2019)

LEGENDA: A figura representa os resultados obtidos da análise dos parâmetros anatômicos e fisiológicos. No caso da análise do perfil anatômico, os dados representam o somatório dos animais do primeiro e do segundo experimento. Já para a análise do perfil bioquímico, hemograma e coagulograma, foram avaliados os animais do segundo experimento. (A) O gráfico representa a perda ou ganho de peso dos animais no primeiro e segundo experimento. (B) O gráfico representa a porcentagem do peso dos órgãos – Baço, coração, rins, pulmão e fígado – em relação ao peso final do camundongo do primeiro e segundo experimento. (C – J) Os gráficos representam o perfil bioquímico – ALT/TGP, GGT, AST/TGO, COL. Totais, Creatina, Triglicerídeos, Ureia, VLD-COL - da análise do sangue. (K - R) Os gráficos representam o hemograma – Hemácias totais, Leucócitos, Plaquetas, Hemoglobina, hematócrito, monócitos, eosinófilo, linfócitos- da análise do sangue. (S e T) Os gráficos representam o resultado do coagulograma com tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativa (TTPA), respectivamente. Os gráficos demonstram a mediana com intervalo interquartil. A análise estatística foi feita através do teste de Mann Whitney (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; * $p < 0,0005$).**

Outro efeito causado pelo uso de anticoagulantes é a trombocitopenia, que apesar da LMWH apresentar seus efeitos anticoagulantes reduzidos, ainda há casos dessa anomalia em alguns pacientes (GRAY *et al.*, 2008). No entanto, não houve uma redução no número de plaquetas nos camundongos que receberam o tratamento (FIGURA 9 – M).

Uma observação relevante obtida neste estudo seria o aumento do peso relativo do fígado dos animais tratados com LMWH em ambos os experimentos realizados. No entanto, não foi observada nenhuma alteração nos parâmetros que avaliam enzimas hepáticas relacionadas a lesão, como alanina aminotransferase (ALT/TGP), gama glutamil transferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST/TGO) (FIGURA 9 – C, D e E).

Vale ressaltar que os resultados bioquímicos e hematológicos foram comparados de acordo com os trabalhos de Paula *et al.* (2012), Spinelli *et al.* (2012) e Santos *et al.* (2016), ou seja, os parâmetros analisados neste trabalho

também foram comparados com padrões de animais C57BL/6 machos saudáveis (sem indução de tumores e/ou tratamento).

Além disso, a LMWH possivelmente pode reduzir a progressão dos focos de metástase por meio da modulação das células do sistema imune, ativando células NK e Linfócitos-T, por exemplo, como já relatado por CHRISTOPHERSON *et al.*, 2002; BOBEK *et al.*, 2005. Vale ressaltar que a LMWH proporcionou um aumento na porcentagem de linfócitos nos animais que foram expostos a este composto (FIGURA 9 – R), indicando uma possível ativação destes levando a contenção do desenvolvimento de focos metastáticos. Assim como uma perspectiva para complementar este trabalho seria avaliar a formação de novos vasos sanguíneos no pulmão, como também avaliar o infiltrado de células do sistema imune no pulmão, esperando visualizar uma redução na formação de vasos e um maior infiltrado de linfócitos e/ou células NK nos animais tratados com LMWH.

Esses dados em conjunto sugerem que as características metastáticas no processo de colonização foram modificadas pelo tratamento por LMWH *in vivo*, embora não foram significativamente alteradas nos ensaios *in vitro* realizados. Desta forma, esses resultados são muito promissores, porém mais estudos são necessários para entender o mecanismo pelo qual essa heparina atua nas células de melanoma e/ou modulando o microambiente tumoral, que resulta no desenvolvimento dos nódulos tumorais pulmonares.

5 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que LMWH não interfere nas características metastáticas analisadas em células de melanoma murino *in vitro*, mas reduz os focos metastáticos de melanoma nos pulmões *in vivo*. Assim, conclui-se que o tratamento com este composto:

- A LMWH não reduz a formação de colônias *in vitro* em situação de baixa densidade celular;
- A LMWH não interfere no processo de adesão celular sobre diferentes substratos;
- A LMWH atua no desenvolvimento dos nódulos de colonização pulmonar *in vivo* após a estabilização das células de melanoma murino nesse órgão, reduzindo a quantidade os focos de metástase, alterando aspectos anatômicos e hematológicos sem induzir efeitos colaterais detectáveis pelos parâmetros bioquímicos analisados.

REFERÊNCIAS

AMIRKHOSRAVI, A.; MOUSA, S. A.; AMAYA, M.; FRANCIS, J. L. Antimetastatic effect of tinzaparin, a low-molecular-weight heparin. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. v. 1, n. 9, p. 1972–1976, 2003.

BENDAS, G.; BORSIG, L. Cancer cell adhesion and metastasis: Selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. **International Journal of Cell Biology**. v. 2012, 2012.

BERNARD W. STEWART; CHRISTOPHER P. WILD. World Cancer Report 2014. **WHO**. 2015.

BINDEA, G.; MLECNIK, B.; FRIDMAN, W. H.; PAGÈS, F.; GALON, J. Natural immunity to cancer in humans. **Current Opinion in Immunology**. v. 22, n. 2, p. 215–222, 2010.

BOBEK, V.; BOUBELIK, M.; FIŠEROVÁ, A.; L'UPTOVCOVÁ, M.; VANNUCCI, L.; KACPRZAK, G.; KOLODZEJB, J.; MAJEWSKI, A.M.; HOFFMAN, R. M. Anticoagulant drugs increase natural killer cell activity in lung cancer. **Lung Cancer**. v. 47, n. 2, p. 215–223, 2005.

BOBEK, V.; KOVAŘÍK, J. Antitumor and antimetastatic effect of warfarin and heparins. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. v. 58, n. 4, p. 213–219, 2004.

BOCHENEK, J.; PÜSKÜLLÜOĞLU, M.; KRZEMIENIECKI, K. The antineoplastic effect of lowmolecularweight heparins literature review. **Wspolczesna Onkologia**. v. 17, n. 1, p. 6–13, 2013.

BORSIG, L. Antimetastatic activities of heparins and modified heparins. Experimental evidence. **Thrombosis Research**. v. 125, p. S66–S71, 2010.

BÖTTCHER, J. P.; BONAVIDA, E.; CHAKRAVARTY, P.; BLEES, H.; CABEZA-CABRERIZO, M.; SAMMICHEL, S.; ROGERS, N. C.; SAHAI, E.; ZELENAY, S.; REIS E SOUSA, C. NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. **Cell**. v. 172, n. 5, p. 1022- 1037, 2018.

BRAEUER, R. R.; WATSON, I. R.; WU, C.J.; MOBLEY, A. K.; KAMIYA, T.; SHOSHAN, E.; BAR-ELI, M. Why is melanoma so metastatic? **Pigment Cell e Melanoma Research**, 27(1), 19–36. 2013.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: **A Cancer Journal for Clinicians**, 2018.

BRITO, A. S.; CAVALCANTE, R. S.; CAVALHEIRO, R. P.; PALHARES, L. C. G. F.; NOBRE, L. T. D. B.; ANDRADE, G. P. V.; NADER, H.B.; LIMA, M.A.; CHAVANTE, S. F. Anti-Ila activity and antitumor properties of a hybrid heparin/heparan sulfate-like compound from *Litopenaeus vannamei* shrimp. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 118, p. 1470–1478, 2018.

BRÜGGEMANN, L. W.; VERSTEEG, H. H.; NIER, T. M.; REITSMA, P. H.; SPEK, C. A. Experimental melanoma metastasis in lungs of mice with congenital coagulation disorders. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v. 12, n. 6B, p. 2622–2627, 2008.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. **Science**. v. 331, n. 6024, p. 1559–1564, 2011.

CHALKIADAKI, G.; NIKITOVIC, D.; KATONIS, P.; BERDIKI, A.; TSATSAKIS, A.; KOTSIKOGIANNI, I.; KARAMANOS, N.K.; TZANAKAKIS, G. N. Low molecular weight heparin inhibits melanoma cell adhesion and migration through a PKCa/JNK signaling pathway inducing actin cytoskeleton changes. **Cancer Letters**. v. 312, n. 2, p. 235–244, 2011.

CHEN, Y.; PENG, J.; HAN, M.; OMAR, M.; HU, D.; KE, X.; LU, N. A low-molecular-weight heparin-coated doxorubicin-liposome for the prevention of melanoma metastasis. **Journal of Drug Targeting**. v. 23, n. 4, p. 335–346, 2015.

CHHABRA, G.; NDIAYE, M. A.; GARCIA-PETERSON, L. M.; AHMAD, N. Melanoma Chemoprevention: Current Status and Future Prospects. **Photochemistry and Photobiology**, 93(4), 975–989.2017.

CHRISTOPHERSON, K. W.; CAMPBELL, J. J.; TRAVERS, J. B.; HROMAS, R. A. Low-molecular-weight heparins inhibit CCL21-induced T cell adhesion and migration. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 302,

n. 1, p. 290–295, 2002.

CICHOREK, M.; WACHULSKA, M.; STASIEWICZ, A.; TYMIŃSKA, A. Skin melanocytes: biology and development. **Advances in Dermatology and Allergology**, [S.l.], v1, n.30, p. 30-41, 2013.

CLEXANE/enoxaparina sódica: solução. Responsável técnico Silvia Regina Brollo. Local: Maisons-Alfort - França, Sanofi Winthrop Industrie, 2014. 1 bula de remédio.

COSTA, Cleber Rafael Viera. **Avaliação do mecanismo de ação antitumoral de polissacarídeos sulfatados em camundongos portadores de melanoma**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná.

DAVIS, E. J.; JOHNSON, D. B.; SOSMAN, J. A.; CHANDRA, S. Melanoma: What do all the mutations mean? **Cancer**. v. 124, n. 17, p. 3490–3499, 2018.

DEBERARDINIS, R. J.; LUM, J. J.; HATZIVASSILIOU, G.; THOMPSON, C. B. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. **Cell Metabolism**, 7(1), 11–20. 2008

DEL POZO MARTIN, Y.; PARK, D.; RAMACHANDRAN, A.; OMBRATO, L.; CALVO, F.; CHAKRAVARTY, P.; SPENCER-DENE, B.; DERZSI, S.; HILL, C.S.; SAHAI, E.; AND MALANCHI, I. Mesenchymal cancer cell-stroma crosstalk promotes niche activation, epithelial reversion, and metastatic colonization. **Cell Rep**. 13, 2456–2469. 2015.

DERYUGINA, E. I.; QUIGLEY, J. P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**. v. 25, n. 1, p. 9–34, 2006.

DE VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature Reviews Cancer**, 6(1), p. 24–37. 2006.

DOMINGUES, B.; LOPES, J.; SOARES, P.; POPULO, H. Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and Therapy**, v 7, 35–49. 2018.

SHAIN, A. H.; YEH, I.; KOVALYSHYN, I.; SRIHARAN, A.; TALEVICH, E.; GAGNON, A.; DUMMER, R.; NORTH, J.; PINCUS, L.; RUBEN, B.; RICKABY, W.; CORRADO D'ARRIGO, C.; ROBSON, A. BASTIAN, B. C. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. **The New England journal of medicine**, Volume 373.p 1926-1936. 2015.

DUNSMORE, S. E.; RANNELS, D. E. Extracellular matrix biology in the lung. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**. v. 270, n. 1 p.14-1. 1996

EIGENTLER T.K; CAROLI U. M; RADNY P.; GARBE C. Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials. **Lancet Oncol**. v.4, p. 748–59.2003.

ELSHAMY, W. M. e DUHÉ, R. J. Overview: Cellular plasticity, cancer stem cells and metastasis. **Cancer Letters**. v. 341, n. 1, p.2–8. 2013.

FALANGA, A.; MARCHETTI, M. Heparin in tumor progression and metastatic dissemination. **Semin Thromb Hemost**. v. 33, p.688–94. 2007

FALANGA, A.; PANOVA-NOEVA, M.; RUSSO, L. Procoagulant mechanisms in tumour cells. **Best Practice and Research: Clinical Haematology**. v. 22, n. 1, p. 49–60, 2009.

FERRARI DE ANDRADE, L.; MOZELESKI, B.; LECK, A.R.; ROSSI, G.; COSTA, C.R.V.; GUIMARÃES, F.S.F.; ZOTZ, R.; NASCIMENTO, K.F.; OLIVEIRA, C.C.; BUCHI, D.F.; TRINDADE, E.S. Inhalation therapy with M1 inhibits experimental melanoma development and metastases in mice. **Homeopathy**. v. 105, p. 109-118. 2016.

FERRONE, C.; DRANOFF, G. Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers. **Journal of Clinical Oncology**. v. 28, n. 26, p. 4045–4051, 2010.

FIDLER, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer*. v. 3, p.453–458. 2003.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina**. v. 34, n. 3–4, p. 229–237, 2001.

FRANKEN, N. A. P.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; VAN BREE, C. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature protocols**. v. 1, n. 5, p. 2315, 2006

FRIEDL, P.; LOCKER, J.; SAHAI, E.; SEGALL, J.E. Classifying collective cancer cell invasion. *Nat. Cell Biol*. v. 14, p. 777–783. 2012.

FUKUDA, T.; KAMISATO, C.; HONDA, Y.; MATSUSHITA, T.; KOJIMA, T.; FURUGOHRI, T.; MORISHIMA, Y.; SHIBANO, T. Impact of antithrombin deficiency on efficacy of edoxaban and antithrombin-dependent anticoagulants, fondaparinux, enoxaparin, and heparin. **Thrombosis Research**. v. 131, n. 6, p. 540–546. 2013.

GCO. Global Cancer Observatory. IARC. França. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-line?type=0epopulation=900emode=populationesex=0ecancer=39eage_group=valueeapc_male=0eapc_female=0> Acesso em 29 set. 2019.

GEIGER, T. R.; PEEPER, D. S. Metastasis mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**. v. 1796, n. 2, p. 293–308. 2009.

GORDON, R. Skin Cancer: An Overview Of Epidemiology And Risk Factors. **Seminars In Oncology Nursing**, Alabama. v. 29, n. 3, p.160-169. 2013.

GRAY, E.; MULLOY, B.; BARROWCLIFFE, T. W. Heparin and low-molecular-weight heparin. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 99, n. 5, p. 807–818, 2008

GRIVENNIKOV S.I.;GRETEN F.R.;KARIN M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**; 140: 883-899. 2010.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. 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.

HIROHASHI, S.; KANAI, Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. **Gann Monographs on Cancer Research**. v. 52, n. 7, p. 13–26. 2004.

HIRSH, J.; WARKENTIN, T. E.; SHAUGHNESSY, S. G.; et al. Heparin and Low-Molecular- Weight Heparin Mechanisms of Action, Pharmacokinetics, Dosing, Monitoring, Efficacy, and Safety. **Chest**. v. 119, p. 64–94. 2001.

HODI F.S; O'DAY S.J; MCDERMOTT D.F; *et al.* Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **N Engl J Med**. 363:711–23. 2010.

HOTARY, K.; ALLEN, E.; PUNTURIERI, A.; YANA, I.; WEISS, S. J. Regulation of Cell Invasion and Morphogenesis in a Three-dimensional Type I Collagen Matrix by Membrane-type Matrix Metalloproteinases 1 , 2 , and 3. . v. 149, n. 6, p. 1309–1323. 2000.

HUMPHRIES, M. J. Cell-Substrate Adhesion Assays. **Current Protocols in Cell Biology**. v. 00, n. 1, p. 9.1.1-9.1.11. 1998.

IM, J. H.; FU, W.; WANG, H.; et al. Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. **Cancer Research**. v. 64, n. 23, p. 8613–8619. 2004.

IMAI, Y.; SHIMAOKA, M.; KUROKAWA, M. Essential roles of VLA-4 in the hematopoietic system. **International Journal of Hematology**. v. 91, n. 4, p. 569–575. 2010.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância estimativa 2018: Estimativa/2018 Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro, (2017).

JONES, R. G.; THOMPSON, C. B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. **Genes e Development**. v. 23(5), 537–548. 2009.

KALLURI, R.; WEINBERG, R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J. Clin. Invest.** 119, 1420–1428. 2009.

KLEINMAN, H. K.; MARTIN, G. R. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. **Seminars in Cancer Biology**. v. 15, n. 5 SPEC. ISS., p. 378–386, 2005.

KLERK, C. P. W.; SMORENBURG, S. M.; OTTEN, H. M.; et al. The effect of low molecular weight heparin on survival in patients with advanced malignancy. **Journal of Clinical Oncology**. v. 23, n. 10, p. 2130–2135, 2005.

KOZAR, I.; MARGUE, C.; ROTHENGATTER, S.; HAAN, C.; KREIS, S. Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**. v. 1871, n. 2, p. 313–322, 2019.

KUDERER, N. M.; KHORANA, A. A.; LYMAN, G. H.; FRANCIS, C. W. A meta-analysis and systematic review of the efficacy and safety of anticoagulants as cancer treatment: Impact on survival and bleeding complications. **Cancer**. v. 110, n. 5, p. 1149–1161, 2007.

KUMAR, S.; WEAVER, V. M. Mechanics, malignancy, and metastasis: The force journey of a tumor cell. **Cancer and Metastasis Reviews**. v. 28, n. 1–2, p. 113–127, 2009.

LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**. v. 168, n. 4, p. 670–691. 2017.

LOKESHWAR, V. B.; ÖBEK, C.; SOLOWAY, M. S.; BLOCK, N. L. Tumor-associated hyaluronic acid: A new sensitive and specific urine marker for bladder cancer. **Cancer Research**. v. 57, n. 4, p. 773–777. 1997.

LUDWIG, R. J.; ALBAN, S.; BISTRAN, R.; et al. The ability of different forms of heparin to suppress P-selectin function in vitro correlates to their inhibitory capacity on blood-borne metastasis in vivo. **Thromb. Haemostasis**. v. 95, p. 535–540. 2006.

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

MANI, S.A., GUO, W., LIAO, M.J., EATON, E.N., AYYANAN, A., ZHOU, A.Y., BROOKS, M., REINHARD, F., ZHANG, C.C., SHIPITSIN, M., et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell**. v.133, p. 704–715. 2008.

MERLI, G.; SPIRO, T. E.; OLSSON, C. G.; et al. Subcutaneous enoxaparin once or twice daily compared with intravenous unfractionated heparin for treatment venous thromboembolic disease. **Annals of Internal Medicine**. v. 134, n. 3, p. 191–202. 2001.

MASSAGUÉ, J.; OBENAUF, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour

cells. **Nature**. v. 529, n. 7586, p. 298–306. 2016.

MEYER, G.; MARJANOVIC, Z.; VALCKE, J.; et al. Comparison of low-molecular-weight heparin and warfarin for the secondary prevention of venous thromboembolism in patients with cancer: A randomized controlled study. **Archives of Internal Medicine**. v. 162, n. 15, p. 1729–1735. 2002.

MILLER, A. J.; MIHRM, M. C. Melanoma. **The New England Journal of Medicine**. v. 355, p. 51–65. 2006.

MISHRA, H.; MISHRA, P. K.; EKIELSKI, A.; JAGGI, M.; IQBAL, Z.; TALEGAONKAR, S. Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. v. 144, p. 2283–2302. 2018.

MOUSA, S. A. Anticoagulants in thrombosis and cancer: The missing link. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**. v. 28, n. 1, p. 45–52. 2002.

MOUSA, S. A. Low-molecular-weight heparin in thrombosis and cancer. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**. v. 30, n. SUPPL. 1, p. 25–30. 2004.

MOUSA, S. A.; LINHARDT, R.; FRANCIS, J. L.; AMIRKHOSSRAVI, A. Anti-metastatic effect of a non-anticoagulant low-molecular-weight heparin versus the standard low-molecular-weight heparin, enoxaparin. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 96, n. 6, p. 816–821. 2006.

MUÑOZ, E. M.; LINHARDT, R. J. Heparin-Binding Domains in Vascular Biology. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v.24, p.1549-1557. 2004.

NADER, H. B.; LOPES, C. C.; ROCHA, H. A. O.; SANTOS, E. A.; DIETRICH, C. P. Heparins and heparinoids: occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities. **Current Pharmaceutical Design**. v. 10, p. 1-15. 2004.

NIU, Q.; WANG, W.; LI, YONG; et al. Low molecular weight heparin ablates lung cancer cisplatin-resistance by inducing proteasome-mediated ABCG2 protein degradation. **PLoS ONE**. v. 7, n. 7, p. 1–9. 2012.

ONO, K.; ISHIHARA, M.; ISHIKAWA, K.; et al. Periodate-treated, non-anticoagulant heparin-carrying polystyrene (NAC-HCPS) affects angiogenesis and inhibits subcutaneous induced tumour growth and metastasis to the lung. **British Journal of Cancer**. v. 86, n. 11, p. 1803–1812. 2002.

PAGÈS, F.; GALON, J.; DIEU-NOSJEAN, M. C.; et al. Immune infiltration in human tumors: A prognostic factor that should not be ignored. **Oncogene**. v. 29, n. 8, p. 1093–1102. 2010.

PAULA, A.; L, S. C.; PG, S.; et al. Avaliação dos parâmetros bioquímicos em soro de camundongos tratados com Garcinielliptona FC. **Sociedade Brasileira de Bioquímica**. p. 1980. 2012.

PROSS, M.; LIPPERT, H.; MISSELWITZ, F.; et al. Low-molecular-weight heparin (reviparin) diminishes tumor cell adhesion and invasion in vitro, and decreases intraperitoneal growth of colonadeno-carcinoma cells in rats after laparoscopy. **Thrombosis Research**. v. 110, n. 4, p. 215–220. 2003.

RICKLES F. R; FALANGA A. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. **Thromb Res**. v. 102, p.215-224. 2001.

ROZEMAN, E. A.; DEKKER, T. J. A.; HAANEN, J. B. A. G.; BLANK, C. U. Advanced Melanoma: Current Treatment Options, Biomarkers, and Future Perspectives. **American Journal of Clinical Dermatology**. v. 19, n. 3, p. 303–317. 2017.

RUOSLAHTI, E. Fibronectin and its integrin receptors in cancer. **Advances in Cancer Research**. v. 76, p. 18–20. 1999.

SAMPAIO, L.O. *et al.* Heparins and heparan sulfates. Structure, distribution and protein interactions.In: VERLI, H. Insights into carbohydrate structure and biological function. Kerala: **Transworld research network**, p. 1-19. 2006.

SANTI, Flávia Crystina. **AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MOLECULARES CAUSADAS POR POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EM MODELO DE MELANOMA IN VITRO**. 2015. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Celular e Molecular, Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

SANTOS, E. W.; DE OLIVEIRA, D. C.; HASTREITER, A.; *et al.* Valores de referência hematológicos e bioquímicos para camundongos das linhagens C57BL/6, Swiss Webster e BALB/c. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 53, n. 2, p. 138–145. 2016.

SCHADENDORF, D., VAN AKKOOI, A. C. J., BERKING, C., GRIEWANK, K. G., GUTZMER, R., HAUSCHILD, A., STANG, A., ROESCH, A., UGUREL, S. Melanoma. **The Lancet**. v. 392, p. 971–984. 2018.

SINGH, A., e SETTLEMAN, J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. **Oncogene**. v. 29, p. 4741–4751. 2010

SCHMITZ, P.; GERBER, U.; SCHÜTZE, N.; *et al.* Cyr61 is a target for heparin in reducing MV3 melanoma cell adhesion and migration via the integrin VLA-4. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 110, n. 5, p. 1046–1054. 2013.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**. v. 331, n. 6024, p. 1565–1570. 2011.

SHARMA, P.; HU-LIESKOVAN, S.; WARGO, J. A.; RIBAS, A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. **Cell**. v. 168, n. 4, p. 707–723. 2017.

SPINELLI, M. O.; CRUZ, R. J.; GODOY, C. M. S.; MOTTA, M. C. Comparação

dos parâmetros bioquímicos de camundongos criados em diferentes condições sanitárias. **Scientia Plena**. v. 8, p. 1–8. 2012.

STEEG, P. S. Targeting metastasis. **Nature Reviews Cancer**. v. 16, n. 4, p. 201–218, 2016.

SUDHAKAR, Akulapalli. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. **Journal Of Cancer Science e Therapy**. p. 1-4. 2009.

SYLVESTER, D. M.; LIU, S. Y.; MEADOWS, G. G. Augmentation of antimetastatic activity of interferon and tumor necrosis factor by heparin. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**. v. 12, n. 2, p. 161–180. 1990.

TENG, M. W. L.; KERSHAW, M. H.; SMYTH, M. J. Cancer Immunoediting: From Surveillance to Escape. **Cancer Immunotherapy: Immune Suppression and Tumor Growth: Second Edition**, p. 85–99. 2013.

TENG, M. W. L.; SWANN, J. B.; KOEBEL, C. M.; SCHREIBER, R. D.; SMYTH, M. J. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 84, n. 4, p. 988–993, 2008.

THOMAS J. M; NEWTON-BISHOP J.; A'HERN R.; *et al.* Excision margins in high-risk malignant melanoma. **N Engl J Med**. v. 350, p. 757–66. 2004.

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

TYRRELL, D. J.; HORNE, A. P.; HOLME, K. R.; PREUSST, J. M. H.; PAGEL, C. P. Heparin in Inflammation: Potential Therapeutic Applications beyond Anticoagulation. v. 46. 1999.

VAN DOORMAAL, F. F.; DI NISIO, M.; OTTEN, H. M.; *et al.* Randomized trial of the effect of the low molecular weight heparin nadroparin on survival in patients with cancer. **Journal of Clinical Oncology**. v. 29, n. 15, p. 2071–2076. 2011.

VARKI, A. Trousseau's syndrome: Multiple definitions and multiple mechanisms. **Blood**. v. 110, n. 6, p. 1723–1729. 2007.

VESELY, M. D.; KERSHAW, M. H.; SCHREIBER, R. D.; SMYTH, M. J. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. **Annual Review of Immunology**. v. 29, n. 1, p. 235–271. 2011.

VILLALOBOS LEÓN, M.L. *et al.* Melanoma. **Medicine**. v. 11, n. 26, p. 1602. 2013.

WARBURG, O. On the Origin of Cancer Cells. **Science**. v. 123, p. 309–314. 1956.

WELCH, D. R.; HURST, D. R. Defining the Hallmarks of Metastasis Neoplastic progression Hallmarks of cancer. , , n. 13, p. 3011–3028. 2019.

WHITEMAN, D. C; WHITEMAN, C. A; GREEN, A.C. Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. **Cancer Causes Control**, v 12, 69-82. 2001.

WHITESIDE, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**. v. 27, n. 45, p. 5904–5912. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Health Observatory. Geneva: **World Health Organization; 2018**. Disponível em: <who.int/gho/database/en/> Acesso em: 20/07/2019.

YANG, L.; PANG, Y.; MOSES, H. L. TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. **Trends in Immunology**. v. 31, n. 6, p. 220–227. 2010.

ZACHARSKI LR, ORNSTEIN DL. **Heparin and cancer**. *Thromb Haemost*.80: 10–23. 3.1998.

ZHANG, N., LOU, W., JI, F., QIU, L., TSANG, B. K., e DI, W. Low molecular weight heparin and cancer survival: clinical trials and experimental mechanisms. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. v. 142, n. 8, p. 1807–1816. 2016.