

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
ASSOCIAÇÃO AMPLA UEPG/UNICENTRO

JULIANA BERTON

**ESTUDO DO PAPEL DA HISTIDINA, HISTAMINA E ANTAGONISTAS  
HISTAMINÉRGICOS NA PROGRESSÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM UM  
MODELO DE MELANOMA MURINO**

PONTA GROSSA

2015

JULIANA BERTON

**ESTUDO DO PAPEL DA HISTIDINA, HISTAMINA E ANTAGONISTAS  
HISTAMINÉRGICOS NA PROGRESSÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM UM  
MODELO DE MELANOMA MURINO**

Defesa de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa em Associação Ampla com Universidade Estadual do Centro-Oeste como requisito ao Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Favero.

PONTA GROSSA

2015

**Ficha Catalográfica**  
**Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG**

Berton, Juliana

B547      Estudo do papel da histidina, histamina e antagonistas histaminérgicos na progressão e diferenciação celular em um modelo de melanoma Murino/ Juliana Berton. Ponta Grossa, 2015.  
89f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Favero.

1.melanoma, histidina,B16F10.  
2.histidina. 3.B16F10. I.Favero, Giovani Marino. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. III. T.

CDD: 615



## Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a  
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a  
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Ata nº. 06/2015

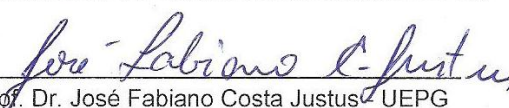
**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO – NÍVEL DE MESTRADO, DA PÓS-GRADUANDA JULIANA BERTON, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, REALIZADA NO DIA 26 DE FEVEREIRO DE 2015, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.**

Ao vigésimo sexto dia do mês de fevereiro de dois mil e quinze, às 14h00min, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Sala M 115 da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Prof. Dr. Giovani Marino Fávero, em sessão pública, reuniu-se a banca examinadora para a defesa de dissertação da pós-graduanda Juliana Berton. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia. Linha de Pesquisa: Avaliação Clínico/Laboratorial de Processos Fisiopatológicos. A banca foi constituída pelos pesquisadores: Prof. Dr. Giovani Marino Fávero (Presidente) / UEPG, Prof. Dr. José Fabiano Costa Justus / UEPG e Profa. Dra. Claudinéia Conatoni da Silva Franco / UEM, indicados pelo egrégio colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – nível de Mestrado Acadêmico, desta Universidade, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem a defesa de dissertação e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para a arguição. O trabalho analisado foi **“ESTUDO DO PAPEL DA HISTIDINA, HISTAMINA E ANTAGONISTAS HISTAMINÉRGICOS NA PROGRESSÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM UM MODELO DE MELANOMA MURINO”**. Encerrada a defesa de dissertação, procedeu-se o julgamento, tendo sido a candidata APROVADA (Aprovada/Reprovada). Foi dada ciência à mestranda que, de acordo com o Art. 34 do Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UNICENTRO/UEPG, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, o aluno tem o prazo de 30 (trinta) dias após esta defesa para entregar as cópias da versão definitiva, que devem ser aprovadas pelo orientador e homologadas pelo Colegiado de curso. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se à presente ata que vai assinada pelos membros da banca examinadora e por mim, Jessica Leme Cano, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela UEPG.

Ponta Grossa, 26 de fevereiro de 2015

Observação (se necessária):

  
Prof. Dr. Giovani Marino Fávero – UEPG

  
Prof. Dr. José Fabiano Costa Justus – UEPG

  
Profa. Dra. Claudinéia Conatoni da Silva Franco - UEM

***À DEUS.***

***Aos meus pais, José Antonio e Vera, por  
terem proporcionado sempre  
oportunidade para meus estudos.***

***Ao meu esposo Paulo, pelo incentivo e  
auxílio oferecido em todos os momentos.***

***À minha filha Paula, pela compreensão da  
utilização do tempo dedicado ao estudo.***

## AGRADECIMENTOS

Ao professor **Dr. Giovani Marino Favero**, pela orientação, disposição e amizade.

Ao professor **Dr. Fabio André**, por sua prontidão e boa vontade sempre.

À professora **Dra. Kátia Sabrina Paludo**, pela colaboração em todo o andamento do trabalho.

Ao professor **Dr. Daniel Fernandes**, por proporcionar os primeiros contatos com os animais.

À professora **Dra. Iriane Eger**, pela colaboração e apoio.

Aos membros da banca de defesa, **Dr. José Fabiano Costa Justus e Dra. Claudinéia Franco Conationi da Silva Franco** pelo aceite e disponibilidade.

À doutoranda e amiga **Camila Guimarães Ferreira** pelo auxílio nos experimentos e materiais.

À colega e amiga **Priscila Pawloski**, pelo auxílio nos experimentos.

Aos colegas **Tamara Nascimento Ferreira, Bruna Carletto, Murilo Delgobo, Daiana Milena Bronoski e Monalisa Simionato Gomes, Thiana de Quadros** pelo apoio e auxílio.

À **Camila Audrey dos Reis**, por ajudar com os cortes histológicos.

À **Maria e Marilene** que cuidaram dos camundongos com dedicação.

Aos demais colegas de turma, pela companhia e amizade.

Às colegas e amigas **Lorena Britto e Christiane Gonçalves**, que auxiliaram no trabalho para que eu pudesse me ausentar para assistir as aulas.

À minha irmã **Mariana** que sempre dedicou suas orações ao bom andamento desse trabalho.

À minha professora de artes **Rosane Volpi Santos** que me ensinou que tudo se alcança com paciência e boa vontade.

À minha avó **Luíza**, que sempre me ensinou ter curiosidade e vontade de aprender.

Aos demais amigos e colegas que torcem por mim e pelo meu desenvolvimento intelectual.

À **CAPES** que proporcionou o auxílio financeiro.

Às demais pessoas que de alguma forma contribuíram com esse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Cada pessoa deve trabalhar para o seu  
aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo,  
participar da responsabilidade coletiva  
por toda a humanidade.

**Marie Curie**

## RESUMO

A histidina é um aminoácido importante fator na diferenciação de alguns tipos celulares, como hepatócitos, por exemplo. A histamina, sintetizada a partir da histidina, está presente em muitos tipos de câncer, entre eles o melanoma. Esse tipo de câncer tem como características a não diferenciação celular e a produção de grande quantidade de histamina. O propósito deste trabalho foi estudar os efeitos de uma suplementação de histidina sobre a diferenciação e progressão tumoral. Os ensaios *in vitro* de viabilidade celular MTT e vermelho neutro foram realizados com histidina nas concentrações 0,01, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10 e 20 mM, cimetidina nas concentrações 0,01, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10 mM, associação histidina 10 mM + cimetidina 0,01 mM e associação de cimetidina 10 mM + histidina 0,01 mM e avaliados após 24, 48 e 72 horas utilizando-se células B16F10 e adicionalmente realizada a análise morfológica. Histamina nas concentrações 0,01, 0,1, 1 e 10 mM, terfenadina nas concentrações 1, 10, 100 nM e 1  $\mu$ M e tioperamida nas concentrações 1, 10, 100 nM e 1  $\mu$ M também foram avaliadas pelo MTT utilizando-se células B16F10. Foi realizado teste de ELISA para quantificação de histamina com sobrenadante de cultura celular tratada com histidina, histamina, terfenadina, cimetidina e tioperamida. Para o ensaio *in vivo* foram utilizados camundongos C57BL6/J, submetidos ao implante de células tumorais e posteriormente tratados com solução de histidina na dose de 21,4 mg/kg, cimetidina na dose de 343,3 mg/kg e associação entre ambas e avaliados por 11 dias quanto ao crescimento tumoral. Avaliações hematológicas, determinações bioquímicas e análise histológica também foram realizadas. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística ANOVA 1-VIA, e pos-test Tukey. Como resultados no teste de viabilidade MTT, a histidina diminuiu a viabilidade celular na concentração de 0,01 mM em 72 horas, da cimetidina nas concentrações de 3 e 10 mM em 48 e 72 horas e da associação cimetidina 10 mM/histidina 0,01 mM em 48 e 72 horas, resultados também encontrados no vermelho neutro. A histamina diminuiu a viabilidade celular das células B16F10 em 48 h na concentração de 20 mM e em 72 horas nas concentrações de 1 e 10 mM, a terfenadina diminuiu a viabilidade celular em todas as concentrações testadas em 24 h, permanecendo a de 10 nM até 72 horas e a tioperamida diminuiu a viabilidade celular em todas as concentrações testadas em 72 horas no ensaio de MTT. Na análise morfológica observou-se que nas menores concentrações de histidina ocorreu discreto arredondamento celular e aparecimento de “blebs” e nas concentrações maiores vacuolização de citoplasma. As células tratadas com cimetidina apresentaram indícios de apoptose. A associação histidina 0,01 mM/cimetidina 10 mM provocou morte celular. O teste de ELISA para histamina revelou que o tratamento com o antagonista  $H_1$  de histamina pode aumentar a produção de histamina ou diminuir sua receptação e o tratamento a tioperamida levou a uma menor produção de histamina ou o bloqueio dos receptores  $H_3$  permitindo uma maior recaptação de histamina. Na experimentação *in vivo* os

tratamentos com histidina e cimetidina inibiram o crescimento tumoral até o sétimo dia de tratamento. As determinações bioquímicas das enzimas transaminase oxalacética e transaminase pirúvica revelaram que não houve toxicidade após os tratamentos. Nas avaliações histológicas, o grupo tratado com histidina apresentou áreas necróticas e o grupo cimetidina apresentou infiltrado leucocitário e promoveu estímulo da angiogênese. Metástases não foram encontradas nos órgãos analisados de nenhum dos grupos. Concluiu-se que a histidina tem um papel importante na progressão tumoral sendo inibitório ou estimulante dependendo da dosagem/dias de tratamento.

**Palavras-chave:** melanoma, histidina, B16F10

## ABSTRACT

Histidine is an important amino acid in the differentiation of some cell types, such as hepatocytes, for example. Histamine is synthesized from histidine and is present in many cancer types, including melanoma. This cancer has as characteristics no differentiated cell and the production a high amount of histamine. The purpose of this work was to study the effects of a histidine supplementation on differentiation and tumor progression. *In vitro* cell viability were performed by neutral red and MTT assays with histidine at 0,01, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10 and 20 mM cimetidine at 0,01, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10 mM, 10 mM histidine association cimetidine + 0,01 mM and 10 mM cimetidine association + 0,01 mM histidine and evaluated after 24, 48 and 72 hours using B16F10 cells and morphological analysis additionally performed. Histamine at 0,01, 0,1, 1 and 10 mM, terfenadine at concentrations 1, 10, 100 nM and 1  $\mu$ M and thioperamide at concentrations 1, 10, 100 nM and 1  $\mu$ M were also assessed by using the MTT cell B16F10. ELISA was performed to quantify histamine with cell culture supernatant treated with histidine, histamine, terfenadine, cimetidine, and thioperamide. For *in vivo* assays were used C57BL6/J mice underwent implantation of tumor cells and subsequently treated with histidine solution at a dose of 21.4 mg/kg cimetidine 343.3 mg/kg and association between both and evaluated for 11 days as the tumor growth were used. Histological analysis, hematological and biochemical determinations were also performed. Data were analysed by ANOVA One-Way, and Tukey post-test. The results of the MTT viability test, showed cell viability decreased histidine at a concentration of 0,01 mM in 72 hours, cimetidine in concentrations 3 to 10 mM at 48 and 72 hours and cimetidine 10 mM /histidine 0,01 mM association in 48 and 72 hours, results also found in neutral red. Histamine decreased the cell viability of B16F10 cells at 20 mM concentration in 48 h and concentrations 1 and 10 mM at 72 hours, terfenadine decreased cell viability at all concentrations tested at 24 h and stayed up to 10 nM 72 hours and thioperamide decreased the cell viability at all concentrations tested 72 hours MTT assay. In the morphological analysis it was observed that at lower concentrations of histidine discrete cell rounding occurred and the appearance of "blebs" and the highest concentrations of vacuolated cytoplasm. Cimetidine treated cells showed characteristics of apoptosis. The association histidine 0,01 mM/cimetidine 10 mM caused cell death. The histamine ELISA test showed that the treatment with the histamine H<sub>1</sub> antagonist may increase or decrease production of histamine and its receiving treatment led to thioperamide produce less or blocking of histamine H<sub>3</sub> receptors allows a greater uptake of histamine. In experiments *in vivo* treatments with histidine and cimetidine inhibited tumor growth by the seventh day of treatment. Biochemical determinations of AST, ALT showed no toxicity after treatment. The histological findings, the group treated with histidine showed necrotic areas and the cimetidine group showed leukocyte infiltration and promoted stimulation of angiogenesis. Metastases were not found in any of the organs analyzed groups. It

was concluded that histidine plays an important role in tumor progression and stimulating or inhibitory depending on the dosage/day of treatment.

**Key-words:** melanoma, histidine, B16F10

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                 |                                                    |
|-----------------|----------------------------------------------------|
| A375            | Linhagem celular de melanoma humano                |
| ALT             | Alanina aminotransferase                           |
| AMPc            | Adenosina monofosfato cíclico                      |
| AST             | Aspartato aminotransferase                         |
| ATCC            | <i>American Type Culture Collection</i>            |
| B16F10          | Linhagem celular de melanoma murino                |
| B16BL6          | Linhagem celular de melanoma murino                |
| C57BL6/J        | Camundongos isogênicos                             |
| CAM             | Moléculas de adesão celular                        |
| CIM             | Cimetidina                                         |
| CM-PLH          | Nanopartícula policarboxymetil-(L-histidina)       |
| CMT93           | Linhagem celular epitelial de rato                 |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de Carbono                                 |
| CTL             | Grupo Controle                                     |
| CTLP            | Grupo Controle Portador de melanoma                |
| CTLS            | Grupo Controle Sadio                               |
| DU-145          | Linhagem celular de câncer de próstata             |
| DNA             | Ácido desoxirribonucleico                          |
| EDTA            | Ácido etilenodiaminotetracético                    |
| HDC             | Histidina Descarboxilase                           |
| HE              | Hematoxilina/Eosina                                |
| HEPES           | Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico |
| HIS             | Histidina                                          |
| HIS/CIM         | Associação Histidina/Cimetidina                    |
| HIV             | Vírus da Imunodeficiência Humana                   |
| H <sub>1</sub>  | Receptor histamínico tipo 1                        |
| H <sub>2</sub>  | Receptor histamínico tipo 2                        |
| H <sub>3</sub>  | Receptor histamínico tipo 3                        |
| H <sub>4</sub>  | Receptor histamínico tipo 4                        |
| HRG             | <i>(Histidine-rich Glycoprotein)</i>               |

|                 |                                                                    |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------|
| HPRG            | <i>(Histidine-proline-rich Glycoprotein)</i>                       |
| IC 50           | Metade da Concentração máxima inibitória                           |
| (IP-10)         | Proteína de Interferon-gama indutível 10                           |
| MGC-803         | Linhagem celular de câncer gástrico                                |
| NCBI            | <i>National Center for Biotechnology Information</i>               |
| PBS             | Tampão Fosfato Salino                                              |
| P(His)          | Poli-L-Histidina                                                   |
| PHSCNK          | N-acetil-prolina-histidina-serina-asparagina-cisteína-amida        |
| SFB             | Soro Fetal Bovino                                                  |
| RPMI            | Meio de cultivo celular ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> ) |
| SGC-7901        | Linhagem celular de câncer gástrico humano                         |
| T98G            | Linhagem celular de glioblastoma humano                            |
| TGO             | Transaminase Oxalacética                                           |
| TGP             | Transaminase Pirúvica                                              |
| Vermelho Neutro | 2-amino-3-metil-7dimetil-amino-cloreto de fenazina                 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>FIGURA 1</b> - Teste de viabilidade MTT com células B16F10 após 24, 48 e 72 horas de tratamento utilizando histidina e cimetidina e associação.....                      | 47 |
| <b>FIGURA 2</b> - Teste da viabilidade MTT com células B16F10 após 24, 48 e 72 horas de tratamento utilizando histamina, tioperamida e terfenadina .....                    | 49 |
| <b>FIGURA 3</b> - Análise da viabilidade celular das células B16F10 pelo método vermelho neutro após 24, 48 e 72 horas de tratamento.....                                   | 53 |
| <b>FIGURA 4</b> - Microscopias da análise morfológica de células B16F10 tratadas com solução de histidina 0,01 mM, 0,1 mM e 0,3 mM.....                                     | 55 |
| <b>FIGURA 5</b> - Microscopias de análise morfológica de células B16F10 tratadas com solução de histidina 3 mM, 10 mM e associação de histidina 10/ cimetidina 0,01 mM..... | 56 |
| <b>FIGURA 6</b> - Microscopias da análise morfológica de células B16F10 tratadas com solução de cimetidina 0,01 mM, 0,1 mM, 0,3 mM.....                                     | 57 |
| <b>FIGURA 7</b> - Microscopia da análise morfológica de células B16F10 tratadas com solução de cimetidina 3 mM, 10 mM e associação de cimetidina 10/histidina 0,01 mM.....  | 58 |
| <b>FIGURA 8</b> - Quantificação para histamina em sobrenadante de cultura celular B16F10 (Histidina e Histamina).....                                                       | 59 |
| <b>FIGURA 9</b> - Quantificação para histamina em sobrenadante de cultura celular B16F10 (Terfenadina, Cimetidina e Tioperamida).....                                       | 60 |
| <b>FIGURA 10</b> - Avaliação do Volume tumoral após tratamentos.....                                                                                                        | 62 |
| <b>FIGURA 11</b> - Gráfico das concentrações de creatinina plasmática em camundongos C57BL6/J.....                                                                          | 64 |
| <b>FIGURA 12</b> - Gráfico das concentrações de transaminase oxalacética (TGO) plasmática em camundongos C57BL6/J.....                                                      | 65 |
| <b>FIGURA 13</b> - Gráfico das concentrações de transaminase pirúvica (TGP) plasmática em camundongos C57BL6/J.....                                                         | 66 |

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>FIGURA 14</b> - Gráficos da avaliação do eritrograma.....                                | 68 |
| <b>FIGURA 15</b> - Cortes histológicos de cérebros de camundongos tratados.....             | 71 |
| <b>FIGURA 16</b> - Cortes histológicos de fígados de camundongos tratados.....              | 71 |
| <b>FIGURA 17</b> - Cortes histológicos de pulmões de camundongos tratados.....              | 72 |
| <b>FIGURA 18</b> – Cortes histológicos de baços de camundongos tratados.....                | 72 |
| <b>FIGURA 19</b> – Cortes histológicos de melanomas B16F10 quanto à inflamação.....         | 74 |
| <b>FIGURA 20</b> – Cortes histológicos de melanomas B16F10 quanto aos vasos sanguíneos..... | 74 |

## SUMÁRIO

|                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                     | <b>18</b> |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>                                          | <b>20</b> |
| 2.1 HISTIDINA E HISTIDINA DESCARBOXILASE.....                                | 20        |
| 2.2 HISTAMINA.....                                                           | 23        |
| 2.3 TERFENADINA.....                                                         | 26        |
| 2.4 CIMETIDINA.....                                                          | 27        |
| 2.5 TIOPERAMIDA.....                                                         | 28        |
| 2.6 MELANOMA.....                                                            | 30        |
| 2.7 DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....                                               | 33        |
| <b>3 OBJETIVOS.....</b>                                                      | <b>36</b> |
| 3.1 OBJETIVO GERAL.....                                                      | 36        |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                               | 36        |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODO.....</b>                                             | <b>37</b> |
| 4.1. CULTURA DE CÉLULAS.....                                                 | 37        |
| 4.2. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR (MTT).....                                 | 37        |
| 4.3 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR POR VERMELHO NEUTRO.....                    | 38        |
| 4.4 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DE CÉLULAS B16F10.....                             | 40        |
| 4.5 QUANTIFICAÇÃO DE HISTAMINA.....                                          | 40        |
| 4.6 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS.....                                              | 41        |
| 4.7 IMPLANTE DAS CÉLULAS TUMORAIS.....                                       | 41        |
| 4.8 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....                                              | 42        |
| 4.9 PARÂMETROS MACROSCÓPICOS DO CRESCIMENTO TUMORAL.....                     | 43        |
| 4.10 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS.....                                             | 43        |
| 4.10.1 Determinações Bioquímicas.....                                        | 43        |
| 4.10.2 Determinação do Hemograma.....                                        | 44        |
| 4.11 PREPARAÇÃO DOS TECIDOS PARA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA...                  | 45        |
| 4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....                                              | 46        |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                         | <b>46</b> |
| 5.1. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM B16F10<br>UTILIZANDO MTT..... | 46        |

|                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.2 ENSAIO DE TOXICIDADE DA LINHAGEM B16F10 UTILIZANDO VERMELHO NEUTRO.....                               | 51        |
| 5.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DA LINHAGEM B16F10.....                                                           | 54        |
| 5.4 QUANTIFICAÇÃO DE HISTAMINA POR ELISA.....                                                             | 58        |
| 5.5 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....                                                                            | 61        |
| 5.5.1 Volume Tumoral.....                                                                                 | 61        |
| 5.5.2 Determinações Bioquímicas.....                                                                      | 63        |
| 5.5.2.1 Análise do perfil de Creatinina dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos.....        | 63        |
| 5.5.2.2 Análise do perfil de Enzimas Hepáticas dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos..... | 64        |
| 5.5.3 Estudo dos Parâmetros Hematológicos.....                                                            | 66        |
| 5.5.3.1 Avaliação da Série Vermelha.....                                                                  | 66        |
| 5.5.3.2 Avaliação da Série Branca.....                                                                    | 69        |
| 5.5.4 Análise Histopatológica dos tecidos dos camundongos tratados.....                                   | 70        |
| <b>6 CONCLUSÕES.....</b>                                                                                  | <b>76</b> |
| <b>7 REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                 | <b>78</b> |
| <b>8 ANEXO.....</b>                                                                                       | <b>89</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença resultante do crescimento desordenado de células, em função do desvio de mecanismos de controle que conduzem a proliferação e diferenciação celular (OLIVEIRA e ALVES, 2002). Esse processo origina a produção de clones celulares com ampla capacidade proliferativa e com diferenciação incompleta (NAVES e MORENO, 2000).

O processo de desenvolvimento neoplásico envolve mutações genéticas que além da proliferação, possuem capacidade de invasão e metástase. A alteração em uma única célula causa proliferação anormal, aumentando a população e formando uma massa tumoral que permanece progredindo, contraindo mutações adicionais (COOPER, 2001).

As neoplasias primárias que mais frequentemente originam metástases são a leucemia, o câncer de mama, linfoma e melanoma maligno (WANG *et al.*, 2014).

O melanoma cutâneo é considerado o mais grave de câncer de pele. É uma neoplasia letal e altamente invasiva, representando menos de 5% de todos os casos de câncer da pele. Embora tenha baixa incidência, é considerado um problema de saúde pública (JEMAL *et al.*, 2010).

As células de melanoma maligno apresentam uma ampla capacidade de sobrevivência e proliferação. Uma das razões mais importantes para a isso é capacidade antiapoptótica, que resulta na tolerância à drogas quimioterápicas (CANDIDA *et al.*, 2014). Nesse sentido, existe a busca por agentes diferenciadores que possam inibir a rápida proliferação.

Nas neoplasias malignas há elevado número de células em divisão, sendo o ciclo celular, durante as mitoses alvo da atuação dos agentes quimioterápicos (OLIVEIRA e ALVES, 2002). Estudos na área da biologia celular e molecular e o conhecimento de mecanismos de várias substâncias têm revelado que pequenas moléculas podem ser muito importantes na diferenciação celular. Há evidências que os aminoácidos individualmente parecem regular importantes vias metabólicas na saúde e na doença (LETZIEN *et al.*, 2014). O aminoácido semi-essencial histidina está sendo alvo de pesquisas, nesse sentido.

A histidina através da enzima histidina descarboxilase é convertida em histamina, então, entre diversos aspectos da fisiopatologia do câncer, a presença

elevada de histamina no processo sugere seu envolvimento e possibilita investigação do seu papel, bem como da enzima na proliferação e diferenciação celular.

No processo do desenvolvimento do tumor, a histamina e os mastócitos parecem ter um papel importante, pois tem sido observada uma acumulação local de mastócitos no ambiente tumoral, e a expressão aumentada de histidina descarboxilase em uma ampla variedade de tumores, incluindo os do cólon, da mama, do estômago, câncer de pulmão, leucemia (FALUS e GILICZE, 2014) e no melanoma (HAAK-FRENDSCO *et al.*, 2000).

A enzima histidina descarboxilase tem sido indicada como um novo marcador para tumores altamente malignos, indicando um papel na proliferação celular. (MATSUKI *et al.*, 2003) Alguns autores sugerem considerar os níveis de histamina dos pacientes com câncer para monitorar a evolução do tumor (PREVIATI *et al.*, 2002).

Baseado em recentes estudos, a expressão da enzima histidina descarboxilase, a quantidade de histamina e a relação entre receptores histamínicos (estímulo pró e anti-histamínico) na proliferação celular em melanoma não está claramente elucidado.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 HISTIDINA E HISTIDINA DESCARBOXILASE

A histidina é um dos vinte aminoácidos presentes nas proteínas. Em humanos, ela é considerada um aminoácido semi-essencial, sendo essencial somente em crianças. Pode estar em duas formas isoméricas, L-histidina e D-histidina, sendo a L-histidina a forma ativa e que pode converter-se em histamina (MENEZES, 2006).

A histamina, pertence à classe das aminas biogênicas, e é sintetizada a partir da histidina sob a ação L-histidina descarboxilase (HDC), a qual contém piridoxal fosfato (vitamina B<sub>6</sub>). A histamina é um potente regulador de numerosas reações fisiológicas (CRIADO *et al.*, 2010).

Em vários animais, incluindo seres humanos e em ratos experimentais em crescimento, a síntese endógena de histidina não é suficiente, de modo que a ingestão de alimentos é a mais importante fonte deste aminoácido (BENDER, 1985).

A produção de L-histidina é baixa no corpo humano e a deficiência resulta em atraso do crescimento e eczemas na pele. A L-histidina é utilizada para artrite reumatóide e ela é encontrada em frutas como banana, além de carne, peixe, leite e derivados do leite. Ela também é encontrada em vegetais verdes, embora em quantidades menores (MENEZES, 2006).

Agentes diferenciadores, como a histidina, podem ser importantes na diferenciação celular. Desse ponto de vista, o câncer pode ser visto como uma falha no processo, já que suas células não chegaram ao final do processo de diferenciação (SCOTT, 1997).

A caracterização do grau de diferenciação de células tumorais em comparação com a célula precursora foi o objeto de estudos no início do século passado. Os vínculos entre nutrientes, vitaminas, medula óssea e o sangue normal tornaram-se evidentes para a maturação das células hematológicas. Com a descoberta que a dieta deficiente em ferro, por volta de 1920, causava anemia ferropriva; a falta de vitamina B<sub>12</sub>, em 1926 levou a descoberta da anemia perniciosa; bem como o ácido fólico estudado em 1928, que promovia a divisão celular sendo

essencial ao DNA, essa relação deficiência/doença tornou-se estabelecida (MUKHERJEE, 2012).

Um pouco mais tarde, em 1947, iniciaram-se os tratamentos de leucemia, por Sidney Farber, com os antifolatos. Ele acreditava que se as “vitaminas” restauravam as células sanguíneas, as “antivitaminas” poderiam desacelerar a produção excessiva dessas células e assim, conseguiu diminuir significativamente o número de células leucêmicas em seus tratamentos com crianças (MUKHERJEE, 2012).

No câncer, ao analisar a concentração sérica de aminoácidos, observa-se um desequilíbrio no metabolismo das proteínas, tanto por interações hospedeiro-tumor quanto por necessidades metabólicas do tumor por aminoácidos específicos (DOLS *et al.*, 2006). Um acréscimo significativo na concentração de aminoácidos no soro de pacientes com tumores ósseos, em comparação com os pacientes controles, foi encontrado em serina, lisina, glutamina, leucina, isoleucina, arginina e histidina (MÄSIAR e MEDEKOVÁ, 1988).

Embora a hipótese de que a histamina possa estar relacionada à carcinogênese, é a estrutura molecular da histidina descarboxilase (HDC), única enzima responsável pela síntese de histamina, que auxiliou no conhecimento das relações entre a histamina e o câncer. Acumuladas evidências indicam uma relação direta entre a regulação positiva da enzima HDC e crescimento de vários tipos de tumores humanos (CIANCHI, VINCHI, MASINI, 2008).

A histamina e os seus receptores desempenham um papel fundamental no desenvolvimento dos tumores (FRANCIS *et al.*, 2009). O aumento da atividade de HDC e o crescimento de vários tipos de câncer podem estar relacionados, adicionalmente as enzimas responsáveis pela síntese de histamina estão desreguladas em muitos tumores (CIANCHI, VINCI, MASINI, 2008) e tem sido a HDC proposta como um novo marcador para tumores altamente malignos, indicando envolvimento na proliferação celular (MATSUKI *et al.*, 2003).

Portanto, em vários tumores a atividade endógena de HDC, sustenta o efeito trófico autócrino da histamina na progressão do câncer. As drogas com direcionamento de HDC podem ser importantes para o tratamento de doenças como o câncer, neste caso o colangiocarcinoma (FRANCIS *et al.*, 2012).

A expressão de HDC é significativa em vários tipos de câncer (FRANCIS *et al.*, 2012) e foi demonstrada em melanoma (HAAK-FRENDSCHO *et al.*, 2000), vários tipos de tumores neuroendócrinos (TANIMOTO *et al.*, 2004, MATSUKI *et al.*,

2003), carcinoma do pulmão (GRAFF *et al.*, 2002), e condrócitos de cartilagem artrítica (TETLOW e WOOLLEY, 2004). Trabalhos demonstram que a HDC encontra-se superexpressa em linfoblastos de leucemia mielóide, mastocitose grave e mastocitomas (OHMORI *et al.*, 1990; VALENT *et al.*, 2004). Portanto, HDC tem sido sugerido como um novo marcador de diferenciação neuroendócrino (TANIMOTO *et al.*, 2004); um recurso importante no tratamento de inúmeras doenças hepáticas, como cirrose biliar primária e colangite esclerosante primária (GRAF *et al.*, 2014); e como uma ferramenta auxiliar no diagnóstico para doenças inflamatórias e tumores altamente malignos (MATSUKI *et al.*, 2003; HAAK-FRENDSCHO *et al.*, 2000).

A HDC está presente em mastócitos, basófilos, células enterocromafins, nos núcleos túbero-mamílares do cérebro e macrófagos. A fonte mais importante de HDC na pele são os mastócitos (KOARAI *et al.*, 2003).

Foi relatado que as culturas de queratinócitos, murino e humanas, também expressam HDC (INAMI *et al.*, 2013). No entanto, a comparação entre as proteínas da HDC de diferentes espécies de mamíferos (camundongos, ratos e humanos) não tinha sido realizada anteriormente, e observaram-se diferenças entre elas. Há diferenças no tipo e espécies de células usadas em estudos experimentais e aumentam às evidências as linhagens celulares podem produzir diferentes isoformas, indicando que determinado processo pode envolver diferentes locais ou enzimas dependendo da espécie (FENELL e FLEMING, 2014).

Os estudos envolvendo a histidina também estão sendo desenvolvidos na terapia genética, o que representa a possibilidade de novos e efetivos agentes anticâncer. Com o desenvolvimento da nanopartícula carboxymethyl poly (L-histidine), CM-PLH, obteve-se significativo efeito antitumoral em células B16F10 (GU *et al.*, 2014). Adicionalmente, desde a descoberta do gen FHIT (tríade de histidina frágil), várias linhas de pesquisas evidenciam tratar-se de um gene supressor de tumor. Esse gene inibiu o crescimento celular *in vitro* e suprimiu o tumor e a tumorigenicidade *in vivo* (JI *et al.*, 1999).

Em recentes estudos que relacionam doenças de pele e melanoma estão o peptídeo N-acetil-prolina-histidina-serina-asparagina-cisteína-amida (PHSCNK), como um antagonista de integrina  $\alpha_5\beta_1$ , o qual está atualmente em ensaios clínicos de fase II para várias terapias do câncer, mostrou inibição do tumor e aumento de sobrevida em camundongos C57BL6/J implantados com células B16F10 (DAI *et al.*,

2012) e a *Histidine-proline Rich Glycoprotein* (HPRG) é uma proteína do plasma de vertebrados, que possui propriedades antiangiogênicas e de normalização de vasos tumorais. Através do controle da expressão de HPRG, o crescimento do tumor diminuiu significativamente, conferiu maior período de sobrevivência à ratos com melanoma B16F10 e suprimiu o crescimento de metástases (CHENG *et al.*, 2014).

Na dermatite atópica os queratinócitos expressam significativamente a proteína HDC e os fatores que desencadeiam a inflamação e a alergia (citocinas, lipopolissacarídeos), o que promove maior secreção de histamina nessas células. A histamina produzida influencia a diferenciação dos queratinócitos, sugerindo importância na dermatite atópica (GUTOWSKA-OWSIK *et al.*, 2014).

Os queratinócitos expressam receptores  $H_1$ ,  $H_2$  e  $H_4$  e produzem abundante quantidade de histamina após exposição a estímulos adequados, sugerindo que as organelas e vias metabólicas dessas células pode possuir essa função (GUTOWSKA-OWSIK *et al.*, 2014).

Adicionalmente, o papel da histidina em vias metabólicas tem sido avaliado. As histidina-quinases são uma classe de proteínas celulares de mamíferos que contribuem com a sinalização do câncer e estão relacionadas com genes supressores de tumores (STEEG *et al.*, 2003).

Os níveis de *Histidine-rich Glycoprotein* (HRG) estão diminuídos em hepatocarcinoma e alguns tumores sólidos, seu papel está ligado à remoção de células necróticas, complexos imunes e micro-organismos. Também está envolvida na angiogênese (DEUSCHLE *et al.*, 2014). Os hepatócitos produzem a HRG e através da circulação é levada aos tecidos (TUGUES *et al.*, 2014).

A composição de micropartículas de um peptídeo ligado a um polímero tem sido utilizada em formulações por conseguir controlar a cinética de degradação de moléculas no interior de células. A poli-L-Histidina (PHis), é um exemplo dessa composição (GUNAWAN *et al.*, 2014).

## 2.2 HISTAMINA

A histamina foi identificada no início de 1900 como regulador de funções biológicas por Henry Dale e colegas de trabalho e as drogas que tem como alvo o

receptor histamínico tiveram início de uso a mais de 60 anos. A síntese de histamina foi descoberta por Windaus e Vogt em 1907 (SHAHID *et al.*, 2010).

A histamina é sintetizada e liberada por diferentes células humanas, especialmente basófilos, mastócitos, plaquetas, linfócitos e neurônios histaminérgicos, sendo estocada em vesículas ou grânulos que são liberados sob estimulação (JUTEL, BLASER, AKDIS, 2005; MAINTZ e NOVAK, 2007).

A histamina também é conhecida por ser um modulador de crescimento de tumor maligno e tem sido evidenciado ser um fator de crescimento potencial para o câncer de mama, células de melanoma e cólon linhagens cancerígenas (ADAMS *et al.*, 1994).

Adicionalmente, a histamina desempenha um papel central em várias respostas fisiológicas, incluindo a resposta imune, neurotransmissão, secreção gástrica, entre outros (GARCIA-CABALLERO *et al.*, 1988). Recentemente, tem sido demonstrado que a histamina, liberada em processos inflamatórios, estimula a osteoclastogênese (LONGUINI *et al.*, 2013). Além disso, a histamina foi estudada em cultura de fibroblastos, como parcialmente responsável pela estimulação da proliferação, migração e produção aumentada de colágeno (LEONARDI *et al.*, 1999).

A constante revelação das novas relações multifatoriais no estudo de processos de reparação, regeneração e na atividade oncogênica, não tem explicado satisfatoriamente a capacidade notavelmente alta de formação de histamina que está presente nos tecidos de rápido crescimento, como no processo de reparo, fígado em regeneração, tecidos embrionários, medula óssea, tecidos de granulação e de feridas e tumores malignos (KOZLOWSKI e MATTOS FILHO, 1995; SCHNEIDER *et al.*, 1993). A descoberta de receptores histamínicos intracelulares, o aumento da biossíntese do autacóide experimentalmente e verificado em neoplasias, a atividade inibidora de antagonistas histamínicos (RIVERA *et al.*, 1993) suportam a participação e o envolvimento da histamina na proliferação celular.

Os efeitos da histamina são mediados pela sua ligação direta com quatro subtipos de receptores de histamina H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub> (JUTEL *et al.*, 2005). Todos esses receptores pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G (CRIADO *et al.*, 2010).

A descoberta do receptor histamínico H<sub>4</sub> em humanos em diferentes tecidos tem colaborado para o entendimento do papel da histamina em várias condições fisiológicas e patológicas, revelando novas e complexas funções para histamina e

abrindo novas perspectivas na investigação da farmacologia da histamina (MEDINA e RIVERA, 2010).

No entanto, evidências continuam sendo descobertas para o envolvimento direto de histamina na progressão do câncer. Isto se deve principalmente aos diferentes efeitos, e às vezes contraditórios, que a histamina pode causar sobre o crescimento de células tumorais devido à ativação de seus quatro receptores específicos de membrana (CIANCHI, VINCHI, MASINI, 2008).

Os receptores de histamina têm sido por muitos anos, importante alvo de drogas para regulação de diversas doenças. Sua relevância na distribuição fisiológica e patológica em vários tecidos está sendo elucidada, enquanto que o papel exato dos receptores de histamina em imunobiologia ainda é incerto (SHAHID *et al.*, 2010).

Segundo Medina e Rivera (2010), evidências consideráveis têm sido coletadas indicando que a histamina pode modular a diferenciação e proliferação de células normais e malignas. Biossíntese de grande quantidade de histamina agindo em conjunto com os receptores da histamina têm sido relatadas em diferentes neoplasias humanas, incluindo o melanoma, o câncer de mama e do cólon, e também em tumores experimentais.

A presença nestes tumores de uma concentração elevada de histamina faz com que a resposta vasodilatadora e inflamatória positiva favoreça a progressão tumoral. Estudos mostram também a presença de receptores de histamina presentes na superfície celular de melanoma e outros tipos tumorais (PÓS *et al.*, 2005; TILLY *et al.*, 1990).

Podem ser encontrados efeitos diretos da histamina no tumor, principalmente autócrinos, entretanto os efeitos parácrinos de liberação histamina por células tumorais tenham sido considerados influenciadores da resposta imune e promotores da estimulação na angiogênese (FALUS e GILICZE, 2014). A histamina afeta consideravelmente o equilíbrio de citocinas, através de mudanças na produção (IDZKO *et al.*, 2002). A produção local de histamina pode formar uma expressão anormal no padrão de citocinas via receptores de  $H_2$ , o que pode resultar na supressão da imunidade do tumor (KUBECOVA *et al.*, 2011).

Marks *et al.* (1986) utilizando antagonistas e agonistas específicos para receptores histaminérgicos comprovaram o efeito mitogênico da histamina, fato observado por TILLY *et al.* (1990) que confirmaram a capacidade da histamina de

divisão celular e de estimular a síntese de DNA, bem como promover resposta quimiotática para células malignas. A histamina pode atuar regulando o turnover do tecido epidermal abaixo das condições fisiológicas (LI *et al.*, 2005).

### 2.3 TERFENADINA

A terfenadina é um anti-histamínico de receptor H<sub>1</sub> de segunda geração que é pouco absorvido pelo sistema nervoso central (SIMONS, 2004).

Vários anti-histamínicos H<sub>1</sub>, incluindo terfenadina, loratadina e difenidramina, têm sido estudados nas atividades anticâncer. Esses antagonistas têm demonstrado exercer efeitos inibitórios ao crescimento celular e apoptose em mastócitos neoplásicos (HADZIJUSUFOVIC *et al.*, 2010), e células de melanoma (JANGI *et al.* 2008) através de via metabólicas que envolvem distúrbios na homeostase do cálcio intracelular e ativação de caspases (WANG *et al.*, 2014).

Os antagonistas H<sub>1</sub> induzem a apoptose e danos ao DNA em diversas linhagens celulares humanas de tumor (JIANG *et al.*, 2006). No estudo de Jangi *et al.* (2008) para que as células de melanoma fossem avaliadas quanto ao efeito da histamina na viabilidade celular, utilizou-se a terfenadina, e observou-se que o fármaco induz a tirosina-quinase e apoptose nestas células.

A terfenadina mostrou-se efetiva em linhagens celulares de câncer de próstata PC-3 e DU-145, induzindo a ativação da cascata das caspases, e posteriormente resultando em dano ao DNA e apoptose celular (WANG *et al.*, 2014).

A terfenadina age como um potente agente indutor de apoptose em células de melanoma, devido à modulação da homeostase do cálcio, o que demonstra o potencial desse fármaco para inibir células de melanoma através de diferentes vias de sinalização celular, como ativação de caspases, e poderia contribuir para a definição de novas estratégias terapêuticas em melanoma (NICOLAU-GALMÉS *et al.*, 2011).

## 2.4 CIMETIDINA

A cimetidina, um antagonista do receptor  $H_2$ , é conhecida por inibir o crescimento de vários tumores em humanos e em animais, no entanto, o mecanismo de ação responsável por esse efeito permanece, em grande parte, desconhecido (ZHENG *et al.*, 2013).

A intrigante relação da cimetidina com o câncer não é recente. Elder *et al.*, (1979) descreveram a cimetidina como uma droga que mascarava o câncer gástrico. A cimetidina é usada para tratar pacientes com úlceras pépticas, estados de hipersecreção e refluxo ácido (WELAGE, 2005) e tem sido confirmado ter efeitos anticancerígenos em vários tipos de malignidades (JIANGI *et al.*, 2010) e parece inibir a evolução de processos inflamatórios (LONGUINI *et al.*, 2013).

Algumas evidências sugerem que as funções imunomoduladoras são a causa da ação antitumoral da cimetidina. Era inicialmente postulado que a cimetidina atuava reforçando o sistema imune, embora estudos mais recentes tenham mostrado que a cimetidina atua através de várias vias diferentes, tais como antiadesão e antiangiogênese, para inibir a propagação de células de tumores e metástases (KUBECOVA *et al.*, 2011).

Estudos apontam que os antígenos Sialil Lewis<sup>X</sup> possam estar associados ao tumor. Quando há expressão desses antígenos, a progressão do tumor é mais rápida, bem como o aparecimento de metástases (HAKOMORI, 1996; TAKADA *et al.*, 1993). Os antígenos Sialil Lewis<sup>X</sup> são reconhecidos por E-selectina, presente no endotélio vascular e estão presentes também nas células tumorais (VARKI, 1994). É possível que a cimetidina seja um inibidor da selectina-E (KOBAYASHI *et al.*, 2000). De acordo com estes estudos, não há razão para suspeitar que a cimetidina possa oferecer o benefício de aumento moderado da sobrevivência de pacientes com câncer (KUBECOVA *et al.*, 2011), como comprovado com o melanoma, câncer colorretal, e câncer de células renais (TANG *et al.*, 2004).

A histamina - exógena e endógena - tem capacidade de estimular o crescimento do melanoma maligno oriundo de implantes em ratos via receptores  $H_2$ . Além disso, o implante B16BL6 estimulado por histamina teve seu crescimento suprimido por coadministração de cimetidina de um modo dependente da dose (TOMITA, NAKAMURA, OKABE, 2005).

Estudos clínicos e pré-clínicos têm apontado propriedades anticancerígenas e antitumorais de cimetidina. Estes atributos são mediados por inibição da adesão de células tumorais, ativação do sistema imunitário e antiangiogênese (KUBECOVA *et al.*, 2011).

A cimetidina está sendo proposta como adjuvante na terapia do câncer. Mackenzie *et al.* (2013) observaram após a síntese do ácido fosfo-valpróico, um derivado do ácido valpróico (PV; MDC-1112) a inibição do crescimento de xenoinxertos humanos em camundongos por 60%-97%, e 100% quando combinado com a cimetidina no controle do câncer pancreático. A cimetidina foi também avaliada na evolução da periodontite e inibição do processo de reabsorção óssea (CERRI, 2013), na angiogênese de câncer de cólon (NATORI *et al.*, 2005) e na inibição da imunossupressão no pós-operatório (KUBECOVA *et al.*, 2011).

Entretanto os corretos mecanismos pelos quais a cimetidina afeta o crescimento e a progressão tumoral continuam incompreendidos (ZHENG *et al.*, 2013). Algumas atividades já foram provadas, como inibição da proliferação de células tumorais (REYNOLDS *et al.*, 1996) e melhora da atividade imunológica (ADAMS *et al.*, 1994).

Em camundongos C57BL6/J portadores de tumor de pulmão a cimetidina exibe um efeito supressor. Curiosamente a cimetidina não mostrou efeitos inibidores diretos sobre a proliferação, sobrevivência, migração e invasão nas células de tumor pulmonar *in vitro* (ZHENG *et al.*, 2013).

Além disso, o efeito observado de cimetidina em células imunitárias do hospedeiro é possível que seja independente do seu efeito antitumoral, por isso, o seu benefício potencial na terapia do sistema imune pode não ser específico para um tipo de tumor (ZHENG *et al.*, 2013).

Em se tratando dos antagonistas de receptores H<sub>2</sub>, a cimetidina não mostrou-se capaz de induzir à diferenciação as células supressoras mielóide-derivadas (ZHENG *et al.*, 2013).

## 2.5 TIOPERAMIDA

A tioperamida é um antagonista seletivo e potente de receptor H<sub>3</sub> de histamina que atravessa a barreira hematoencefálica. O maleato de tioperamida

atua no sistema histaminérgico central e minimiza o tempo dos ataques e convulsões em ratos. Também melhora déficit de aprendizagem induzida por drogas, como exemplo a escopolamina (SIGMA-ALDRICH CO., 2015).

A tioperamida é tida como um agonista inverso dos receptores  $H_3$ , e também é descrita por atuar como um agonista inverso no receptor  $H_4$  (PINTO, 2012).

O receptor histamínico  $H_3$  foi identificado como receptor pré-sináptico que libera e regula a síntese da histamina no sistema nervoso central. Segundo Arrang *et al.* (1987) a tioperamida foi descrita como o primeiro antagonista seletivo de receptor  $H_3$  e a afinidade por esse receptor pode ser identificada em escala nanomolar (JANSEN *et al.*, 1994).

Fármacos que possuem afinidade pelo receptor  $H_3$  da histamina são sugeridos como benéficos para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer. O receptor  $H_3$  ativa a proteína G, para inibir a atividade da adenilciclase e modular a fosfolipase A (BONGERS, 2007).

Após a clonagem do receptor de histamina  $H_3$ , tornou-se possível avaliar que, ao lado de receptores  $H_2$ , os receptores  $H_3$  podem ativar as vias de transdução intracelular relacionadas com o estímulo da atividade mitogênica (MORINI *et al.*, 2002).

As recentes descobertas fornecem evidências farmacológicas que na mucosa gástrica de rato, a proliferação celular, diferenciação e migração, são susceptíveis à regulação de receptores de histamina  $H_3$ . Nesse estudo, as ações de  $\alpha$ -metilhistamina, agonista do receptor  $H_3$  tem capacidade para estimular a proliferação celular, sendo este efeito inibido pelo antagonista de receptor  $H_3$  ciproxifan. A metilhistamina apresenta-se de modo dose-dependente na proliferação celular (MORINI *et al.*, 2002).

Em células da mucosa gástrica de rato, a incidência de apoptose não aumentou com 24 h após a administração de  $\alpha$ -metilhistamina, agonista de receptor  $H_3$  (MORINI *et al.*, 2002).

A proliferação e migração de células desenvolvida por agonistas de receptores  $H_3$  de histamina sugere ser uma resposta mediada de forma direta ou ser o resultado de complexas interrelações com hormônios e/ou com mecanismos parácrinos (MORINI *et al.*, 2000).

A proliferação de colangiócitos (em doenças hepáticas colestáticas), é regulada por um minucioso equilíbrio entre o estímulo (pela ativação de receptores

H<sub>1</sub> e receptores H<sub>2</sub>) e inibição (pela ativação de receptores H<sub>3</sub> e receptores H<sub>4</sub>) efeitos da histamina endógena (FRANCIS *et al.*, 2007).

## 2.6 MELANOMA

Apesar dos avanços significativos na pesquisa do câncer, a doença continua sendo um problema de saúde mundial e a mortalidade mantém-se elevada (OZOLS *et al.*, 2007). Entre os tumores malignos, que são altamente nocivos, pouco diferenciados, com crescimento rápido e infiltrativo, tem-se o melanoma (WADE e WHITE, 1986; LITTLE, 1975).

O melanoma, representando cerca de 4% dos tumores de pele, é o mais grave devido ao seu crescimento acelerado e da possibilidade de causar metástase. O rápido crescimento associado à alta produção de melanina faz o melanoma manifestar-se, geralmente, como uma pinta escura (marrom a negra) de bordas irregulares acompanhadas de coceira e descamação (SCHUCHTER, 2001).

Histologicamente os melanomas apresentam anaplasia, ou seja, não são diferenciados, apresentando também pouco estroma e tecido anexo aos melanócitos modificados (WADE e WHITE, 1986).

A progressão do melanoma é afetada por dois fatores: a resposta imune do hospedeiro e os fatores intrínsecos do potencial maligno do tumor (histológicos, clínicos, localização anatômica da lesão) (PHILIPHS *et al.*, 1990).

A melanogênese é um processo que ocorre dentro dos melanócitos, células pigmentares de origem neuroectodérmica, localizadas nas camadas mais internas da epiderme. Os melanócitos liberam grânulos de pigmentos denominados melanossomos, onde a melanina é produzida e levada aos queratinócitos circundantes. O conjunto formado por 36 queratinócitos e um melanócito constitui uma unidade epidérmica de pigmentação (HADLEY, 1996). Os queratinócitos se diferenciam e migram para as camadas mais externas da epiderme, e os melanossomos são degradados e ocorrendo a liberação da melanina, conferindo pigmentação à pele (HOOGDUIJN *et al.*, 2004).

Assim, os melanócitos estão sempre em íntimo contato físico e funcional com outras células epidérmicas, o que poderia auxiliar para o controle do *status* melanogênico de melanócitos devido à secreção de várias citocinas e fatores parácrinos. Nesse sentido, a pele contém uma diversidade de mensageiros químicos

com potencial para afetar a proliferação e diferenciação dos melanócitos (ESPARZA *et al.*, 1996).

Entretanto, o papel e as vias de sinalização da histamina ainda não estão elucidados na melanogênese (LEE *et al.*, 2012). Análises da expressão da HDC no melanoma mostrou que em melanomas primários e em metástases cutâneas, a HDC está presente em índices elevados quando comparados a nevos benignos de pele. Paralelamente, não somente a expressão da HDC, como também a síntese de histamina têm sido marcadamente comprovadas em melanoma (FALUS e GILICZE, 2014).

Histamina pode interferir no *turnover* do tecido epidérmico em condições fisiológicas, entretanto em trauma e inflamação, circunstâncias patológicas da pele, a histamina em altas concentrações pode inibir a diferenciação dos queratinócitos humanos e a regeneração da epiderme (RAN *et al.*, 2005).

A análise histológica de enxertos de melanoma em camundongos, tratados com anti-histamínico, revelaram elevada infiltração de macrófagos para o xenoenxerto de melanoma humano. De acordo com esses dados, foi proposto que, além do efeito direto da histamina sobre o crescimento tumoral (dependendo do tipo de receptores e equilíbrio entre eles nas células de melanoma), a histamina influencia localmente as células imunes competentes (FALUS *et al.*, 2001).

O modelo, linhagem B16F10, foi apresentado pela primeira vez por Fidler, 1973, a partir de um tumor de melanoma espontâneo de camundongos C57BL6/J. Através de seleção progressiva, Fidler isolou variantes com diferentes potenciais metastáticos. A B16F10 é uma dessas linhagens celulares variantes, adequada para ensaios experimentais de metástase (OLIVEIRA FILHO, BEVILACQUA, CHAMMAS, 1997).

O modelo experimental de metástases de melanoma B16F10 é amplamente utilizado em experimentos (RUSCIANO, LORENZONI, BURGER, 1994; WELCH, 1997). Metástases são originárias de câncer que se distanciou a partir de um local principal, tornando-se capaz de formar novos tumores em outros órgãos (CHAMBERS, GROOM, MACDONALD, 2002). Este é um processo que envolve o extravasamento de células a partir de um tumor primário para a circulação, promovendo a sobrevivência da célula, a localização de um novo órgão e alojamento em tecidos, a manutenção do crescimento, e da vascularização do tumor metastático (PANTEL e BRAKENHOFF, 2004).

O melanoma de células B16F10 quando comparado com melanócitos não-cancerosos indica um sistema histaminérgico regulado, o que propicia a utilização de células B16F10 como um modelo para investigar o sistema histaminérgico endógeno na função celular maligna (DAVIS *et al.*, 2011).

Os tumores em diferentes órgãos tendem a ser muito diferentes, não apenas na sua capacidade de proliferação e metástase, como também na influência e controle sobre o status metabólico do hospedeiro (KERN e NORTON, 1988) e, conseqüentemente, em variações no perfil de aminoácidos do soro em relação ao tipo de tumor. Níveis aumentados têm sido detectados por aminoácidos que possuem determinadas especificidades em relação ao tipo específico de tumor (MÄSIAR e MEDEKOVÁ, 1988).

Metástases de melanoma B16F10 em baço de camundongos C57BL/6J foram avaliadas quanto às alterações metabólicas e verificou-se que a taurina, aspartato, glutamato, O-fosfoetanolamina, niacinamida, ATP, lípidos e derivados de glicerol são estatisticamente diminuídos enquanto alanina, malato, xantina, histamina, dCTP, GTP, timidina, 2-desoxiguanosina são estatisticamente elevados (WANG *et al.*, 2014).

Em melanoma *in vitro* e carcinoma celular, as células tumorais podem produzir proteína induzida por interferon (IP-10) em resposta ao interferon- $\gamma$ . Essa proteína inibe a progressão tumoral. A histamina, que se encontra próxima de células tumorais pode sustentar a progressão do tumor e envolvendo receptores  $H_2$  e a fosfoquinase A, consegue inibir a produção de IP-10 (WATANABE e KANDA, 2002).

Além da elevação da histamina, há o envolvimento dos receptores  $H_2$  da histamina, que sozinhos ou em combinação com outros agentes, podem reduzir o melanoma em humanos e em animais. Conforme Uçar (1991) o efeito antitumoral tem sido atribuído à imunomodulação via inibição da atividade de linfócitos supressores. Os receptores  $H_2$  foram demonstrados em células de melanoma e em células supressoras de linfócitos.

Poucos estudos mostram que a histamina estimula a acumulação de AMPc *in vitro* e que os antagonistas  $H_2$  atenuam esse efeito nos melanócitos e células de melanoma, mas a atividade da tirosinase, acumulação de melanina ou proliferação não tem sido associadas às variações nos níveis de AMPc nessas células (WHITEHEAD *et al.*, 1988).

Pesquisas anteriores mostraram que a recorrência de câncer e metástases está fortemente relacionada com a adesão entre células tumorais e células endoteliais. Uma variedade de moléculas de adesão celular (CAM) induzidas por citocinas e liberadas por células tumorais, promovem a adesão (TANG *et al.*, 2004).

## 2.7 DIFERENCIAÇÃO CELULAR

A diferenciação celular é um processo biológico complexo que regula a expressão de um grande número de genes que possuem funções específicas nos tecidos e controla a proliferação celular (NAVES e MORENO, 2000).

A diferenciação celular compreende várias etapas: proliferação de células progenitoras, ativação de resposta favorável à mitose, ativação de genes, expressão de proteínas, desativação ou diminuição de resposta favorável à mitose, e diferenciação terminal, onde perde a capacidade proliferativa (NAVES e MORENO, 2000).

Para o desenvolvimento do câncer a condição anormal necessária é a proliferação contínua e desordenada das células comprometidas. Essas células respondem incorretamente aos sinais que a controlam e, crescem e dividem-se de forma descontrolada, e migram para os tecidos normais adjacentes, posteriormente espalham-se causando a metástase (PEREIRA *et al.*, 2008).

O crescimento descontrolado é resultado das anormalidades acumuladas nos sistemas de que regulam o crescimento celular e o comportamento da célula torna-se alterado, isso distingue as células neoplásicas das células normais (COOPER, 2001).

A hipótese de que a histamina pode estar relacionada à diferenciação e proliferação celular foi proposta na década de 60, e permanece controversa até agora (FALUS e GILICZE, 2014). A administração de histamina exógena, embora administrada em doses fracionadas que, portanto, não mantém o nível constante de concentração, mas fazendo-se picos, modificou o curso da regeneração do fígado (BIONDO-SIMÕES, 2000).

Tem-se que o fígado é um dos órgãos mais complexos do corpo humano e a necessidade da constância de massa hepática dos mamíferos ao longo da vida

exige a manutenção desse tecido (TARLÁ *et al.*, 2006). Para isso, as células ovas (progenitoras e bipotentes) podem diferenciar-se em hepatócitos ou células epiteliais biliares. Um bloqueio irreversível do processo de diferenciação das células ovas acredita-se que origine o hepatocarcinoma, devido à ação de hepatocarcinógenos (NAVES e MORENO, 2000).

O processo de diferenciação celular, os mecanismos e os sinalizadores para a células tornarem-se tumorais não está elucidado. Na regeneração hepática, por exemplo, há o envolvimento de fatores de crescimento e nutrientes (JESUS, WAITZBERG, CAMPOS, 2000). Como exemplo, o  $\beta$ -caroteno (precursor da vitamina A), foi relacionado ao câncer e dito como anticarcinogênico de origem alimentar (NAVES, 1998) e que a suplementação com  $\beta$ -caroteno inibe a tumorigênese em neuroblastoma *in vivo* através da indução de diferenciação neuronal (LIM *et al.*, 2014).

Adicionalmente, Yoshida *et al.* (1995), referem que a glutamina aumentou a taxa de regeneração hepática, por estímulo da síntese de DNA nos hepatócitos. A glutamina é um aminoácido essencial, que estimula o sistema imunológico a combater agentes invasivos (ARDAWI, 1992).

Em contraste, foi relatado que ratos induzidos à hipocalcemia e deficiência de vitamina D, hepatectomizados previamente, tiveram o processo de regeneração hepática prejudicado (GOUPIL *et al.*, 1997), bem como em hepatopatas crônicos, as alterações metabólicas e nutricionais estão relacionadas diretamente com o grau de comprometimento hepatocelular (JESUS, WAITZBERG, CAMPOS, 2000).

A histidina, nos estudos de Letzien *et al.* (2014) também está sendo avaliada quanto ao seu envolvimento no crescimento e diferenciação tumoral, sendo sugerido que o efeito antineoplásico da carnosina ( $\beta$ -alanyl-L-histidina) pode ser atribuído à L-histidina, e a carnosina atuando como um veículo protetor para a L-histidina.

Com a administração exógena de histamina em ratos parcialmente hepatectomizados tem-se um maior número de mitoses (BIONDO-SIMÕES, 2000). A histamina também estimula a proliferação, migração e produção de colágeno em fibroblastos normais e fibroblastos da queratoconjuntivite (LEONARDI *et al.* 1999) e estimula o crescimento biliar, enquanto os mastócitos estacionam a proliferação nas colangiopatias, que são caracterizadas pela perda da regulação entre crescimento e perda biliar (KENNEDY *et al.*, 2014).

Embora os mecanismos de ação não tenham sido esclarecidos, a histamina tem importante envolvimento na regulação da maturação dos mastócitos (HALLGREN e GURISH, 2014; TAKANO *et al.*, 2008).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

- Avaliar o efeito da histidina, histamina, terfenadina, cimetidina, tioperamida e associação histidina/cimetidina e a relação de estímulo pró e anti-histamínico em células B16F10, bem como a resposta tumoral frente aos estímulos em camundongos C57BL6/J portadores de melanoma.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliação da viabilidade celular frente ao estímulo de soluções de histidina, histamina, terfenadina, cimetidina, tioperamida e associação de histidina/cimetidina em células B16F10.

- Avaliação de alterações morfológicas em células B16F10 após tratamento com soluções de histidina, cimetidina e associação de histidina/cimetidina.

- Avaliação tumoral após administração das suspensões de histidina, cimetidina e associação histidina/cimetidina em camundongos C57BL6/J portadores de melanoma.

- Avaliação hematológica dos camundongos e histopatológica do melanoma após tratamento com suspensões de histidina, cimetidina e associação histidina/cimetidina.

## 4 MATERIAIS E MÉTODO

### 4.1 CULTURA DE CÉLULAS

Cultura da linhagem tumoral B16F10, ATCC CRL-6475<sup>®</sup>, adquiridas de ATCC, USA; em meio RPMI 1640 adquiridos de Cultilab<sup>®</sup>, São Paulo; suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10% (v/v) Gibco<sup>®</sup>, adquirido de Invitrogen<sup>®</sup>. As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) em garrafas estéreis de cultivo celular de 125 cm<sup>2</sup>. Para o cultivo, foi utilizada uma mistura de antibióticos a 1% (v/v) de penicilina 10.000 unidades/mL e estreptomicina 10.000 µg/mL adquiridos de Invitrogen<sup>®</sup>. Ao meio foi adicionado tampão HEPES, com a finalidade de correção e manutenção do pH do meio de cultivo.

A substituição do meio foi realizada a cada dois ou três dias, inicialmente, de acordo com a confluência celular, a qual era observada em microscópio invertido e as passagens (subcultivos) eram, então, realizadas. Quando as garrafas atingiram 100% de confluência o meio era aspirado, em fluxo laminar e a camada celular lavada com solução tampão fosfato salino sem cálcio e sem magnésio (PBS). Posteriormente, de acordo com a necessidade, procedia-se o descolamento das células, utilizando-se solução de Tripsina 0,10-0,50% e EDTA 0,01-0,04% com posterior centrifugação e retirada da solução de Tripsina.

Quanto à escolha das células, a linhagem B16 cresce espontaneamente em camundongos C57BL6/J (PETER *et al.*, 2001). A linhagem B16 parece ser menos invasiva que suas sublinhagens B16-F10 e B16-BL6 e a capacidade de formar metástases aumenta segundo a ordem: B16-F0, B16-F1 e B16-F10, que é igual a B16-BL6 (NAKAMURA *et al.*, 2002).

### 4.2 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)

Os ensaios de toxicologia são largamente utilizados em estudos *in vitro*, dentre eles o vermelho neutro e o MTT são os mais comuns para a detecção de citotoxicidade ou de viabilidade celular após a exposição a substâncias tóxicas,

podendo apresentar sensibilidades diferentes para a mesma substância (FOTAKIS e TIMBRELL, 2006).

Esse ensaio de viabilidade celular verifica o potencial de morte celular e a sua proporção, causada pelos tratamentos utilizados. A viabilidade das células após o tratamento com as diferentes concentrações das substâncias histidina, tefenadina, cimetidina, tioperamida e associação de histidina/cimetidina foi determinada utilizando 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazóliobrometo (MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), de acordo com o método de Tada *et al.* (1986).

A quantidade de  $5 \times 10^3$  células foi adicionada em cada poço de uma placa de 96 poços. Após 24 h, as células foram expostas às soluções de concentrações 0,01, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10 e 20 mM de histidina, 0,01, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 e 10 mM de cimetidina, e associação de histidina 10 mM + cimetidina 0,01 mM e associação de cimetidina 10 mM + histidina 0,01 mM por 24, 48 e 72 horas. As concentrações estudadas foram baseadas no trabalho de Jiangi *et al.* (2010).

Adicionalmente as células foram expostas às soluções de concentrações 0,01, 1, 10 e 20 mM de histamina, 1, 10, 100 nM e 1  $\mu$ M de terfenadina e 1, 10, 100 nM e 1  $\mu$ M de tioperamida por 24, 48 e 72 horas. As concentrações estudadas foram baseadas no trabalho de Lukjanov *et al.* (2006).

Da solução de MTT de 0,5 mg/mL, foram adicionados 200  $\mu$ L em cada poço e a viabilidade das células foi então, avaliada em um teste colorimétrico através da atividade da desidrogenase mitocondrial formando o complexo formazan (roxo) após 3 horas de incubação em estufa a 37°C sob tensão de CO<sub>2</sub>.

A absorbância de cada poço foi lida a 570 nm, utilizando um leitor de placas (EL808B, BioTech Instruments®, Inc., Winooski, VT, EUA).

#### 4.3 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR POR VERMELHO NEUTRO

O corante Vermelho Neutro tem sido utilizado como indicador de citotoxicidade em culturas de hepatócitos e em outras linhagens celulares. Caracteriza-se por se acumular nos lisossomos de células viáveis (FOTAKIS e TIMBRELL, 2006).

Este ensaio de viabilidade celular Vermelho Neutro (2-amino-3-metil-7dimetil-amino-cloreto de fenazina) fornece dados sobre as funções metabólicas celulares, especificamente do lisossomo, uma organela que realiza vários processos celulares, inclusive apoptóticos (FRANÇA, 2008).

Muitas substâncias danificam as membranas celulares e lisossomais resultando no decréscimo de captura e internalização do vermelho neutro. O transporte do corante é passivo, através da membrana plasmática das células hígdas, e, armazenado dentro dos lisossomos (DOYLE e GRIFFITHS, 1998). Portanto, é possível a distinção entre células vivas e mortas pela medida da intensidade de cor final (viabilidade celular). Células vivas, porém danificadas, não conseguem reter o corante em seu interior. Assim, esse ensaio é um indicador de danos provocados aos lisossomos (FRANÇA, 2008).

A quantidade de  $5 \times 10^3$  células foi adicionada em cada poço de uma placa de 96 poços. Após 24 h, as células foram expostas às soluções de concentrações 0,01, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10 e 20 mM de histidina, 0,01, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 e 10 mM de cimetidina, e associação de histidina 10 mM + cimetidina 0,01 mM e associação de cimetidina 10 mM + histidina 0,01 mM por 24, 48 e 72 horas. As concentrações estudadas foram baseadas no trabalho de Jiangi *et al.* (2010).

Após o tratamento, o meio de cultura contendo as substâncias a serem testadas será substituído por meio de cultura sem soro contendo 100  $\mu$ L do reagente vermelho neutro 250  $\mu$ mol/L<sup>-1</sup> (previamente incubado a 37 °C e filtrado em membrana de 0,22  $\mu$ m para remoção dos cristais formados). A placa foi incubada a 37 °C (5% CO<sub>2</sub>) por 2 horas para a incorporação do corante pelos lisossomos das células e estas foram lavadas/fixadas com tampão fosfato. A cada cavidade da placa foi adicionado 100  $\mu$ L de ácido acético 1% em etanol a 50% para a solubilização do corante, ou seja, rompimento das células e solubilização do corante “internalizado”. A placa foi agitada por 20 minutos e a absorbância determinada em leitor de placas (EL808B, BioTech Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) (AZEVEDO, 2005) em 540 nm.

#### 4.4 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DE CÉLULAS B16F10

A quantidade de  $5 \times 10^5$  células B16F10 em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB foi adicionada em cada poço de uma placa de 24 poços sobre lâminula redonda. Após 24 horas, as células foram expostas às soluções de concentrações 0,01, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10 e 20 mM de histidina, 0,01, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 e 10 mM de cimetidina, e associação de histidina 10 mM + cimetidina 0,01 mM, associação de cimetidina 10 mM + histidina 0,01 mM. Decorridas 48 horas as células foram submetidas à coloração de May Grunwald-Giemsa, para identificação e quantificação dos diferentes tipos celulares (BORELLI *et al.*, 2009). As lâminas foram confeccionadas e a análise morfológica realizada em microscópio óptico, sendo fotografados vários campos aleatórios. O ensaio foi realizado quatro vezes, sendo que as imagens obtidas são resultantes de dois experimentos independentes.

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO DE HISTAMINA

A quantidade de  $3 \times 10^4$  células B16F10 em meio RPMI suplementado com 10% de SFB foi adicionada em cada poço de uma placa de 6 poços. Após 24 horas de cultivo em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C, as células foram expostas às soluções de Histidina 0,01, 0,1 e 20 mM, Histamina 0,01 mM e 20 mM, Cimetidina 3mM e 10 mM, tioperamida 100 nM, 1 µM e terfenadina 100 nM, 1 µM. Cada concentração foi utilizada em duplicata. Decorridas 72 horas, as células foram tripsinizadas e o conteúdo de cada poço colocado em eppendorf, centrifugado e o sobrenadante separado para realização de ELISA.

O protocolo foi desenvolvido seguindo as especificações do kit para ELISA: Histamine EIA, Demeditec Diagnostics GmbH, Germany. A acilação da amostra foi realizada e posteriormente as amostras transferidas para a placa de ELISA. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 450 nm em leitor de placas.

#### 4.6 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Uso de Animal, processo 002/2014, com protocolo para pesquisa número 765/2014, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, conforme documento anexo.

Foram utilizados camundongos C57BL6/J adultos obtidos de Biotério do Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da UEPG. Os procedimentos seguiram as normas de conduta com pesquisa animal e foram realizados após a autorização do Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

A manutenção dos animais e a experimentação foram realizadas no Biotério do Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da UEPG. Os animais receberam ração e água *ad libitum*, sendo mantidos durante todo o período experimental em uma sala com temperatura ambiente ( $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) sob ciclo de iluminação natural de 12/12 horas, com um número de 4 animais por gaiola.

#### 4.7 IMPLANTE DAS CÉLULAS TUMORAIS

Vários modelos para o estudo dos melanomas estão disponíveis. Os modelos murinos de melanoma possibilitam melhor compreensão desta neoplasia e de seu desenvolvimento. Embora não se possa extrapolar diretamente para os seres humanos, constituem ferramentas experimentais importantes que possibilitam o estudo de novas drogas e estratégias terapêuticas (PRADO, 2005).

A linhagem de células B16F10 foi cultivada em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB e adicionado antibiótico penicilina 10.000 unidades/mL/estreptomicina 10.000  $\mu\text{g/mL}$  Gibco® em estufa ( $37^{\circ}\text{C}$ ) com atmosfera de 5% de dióxido de carbono, até confluência.

Para o implante das células, os camundongos C57BL6/J tiveram a região posterior do dorso tricotomizada. As células B16F10, com contagem determinada  $5 \times 10^4$  em 100  $\mu\text{L}$ , foram injetadas via subcutânea no dorso dos camundongos. Para este procedimento não foi necessário o uso de anestésicos, já que esses

camundongos não apresentam inervação subcutânea, não sendo, portanto, um processo doloroso ao animal. Este tipo de tumor possui um crescimento acelerado sendo visível em aproximadamente dez dias do implante (PLOWMAN *et al.*, 1997).

#### 4.8 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Após a realização do implante das células tumorais, exceto no Grupo 1, os animais foram randomicamente divididos em 5 grupos de 8 camundongos C57BL6/J, sendo cada grupo composto por 4 machos e 4 fêmeas com idade de 8 semanas.

Grupos experimentais:

1. Grupo Controle Sadio
2. Grupo Controle Portador de Melanoma
3. Grupo Suspensão de Histidina
4. Grupo Suspensão de Cimetidina
5. Grupo Suspensão Histidina/Cimetidina

Para o Grupo Controle Sadio e Grupo Controle Portador de Melanoma foi administrado via oral apenas veículo (água) durante o tratamento de 11 dias. Para o Grupo 3 foi administrada via oral, suspensão de cloridrato de histidina na dose de 21,4 mg/kg, em água por 11 dias. Para o Grupo 4 foi administrada via oral, suspensão de cimetidina na dose de 343,3 mg/kg de cimetidina em água por 11 dias. Para o Grupo 5 foi administrada via oral, suspensão com associação de cloridrato de histidina/cimetidina na dose de 21,4 mg/kg de histidina/343,3 mg/kg de cimetidina em água por 11 dias.

A administração foi realizada em uma única dose diária, mantendo o mesmo horário de administração durante todo o tratamento. Cada animal era pesado antes da administração e a dose administrada adequada ao peso.

No final do experimento, os animais foram anestesiados com quetamina/xilazina de acordo com a massa corporal de cada animal e posteriormente foram retiradas amostras sanguíneas para análises. Após o sacrifício, foram retirados os órgãos e o tumor para a análise histológica.

## 4.9 PARÂMETROS MACROSCÓPICOS DO CRESCIMENTO TUMORAL

Após o desenvolvimento visível e palpável do tumor implantado, 10 dias após a injeção das células, a massa corporal e o volume do tumor foram sequencialmente determinados. A massa corporal é um importante critério de avaliação do desenvolvimento do tumor, através dela pode-se acompanhar, por exemplo, se está ocorrendo processo de caquexia (OTALE *et al.*, 2009).

O volume tumoral foi avaliado com auxílio de um Paquímetro Digital Marberg® por 11 dias, com início no décimo dia após o implante celular. A obtenção do volume foi obtida em mm<sup>3</sup> através da fórmula (Kato *et al.*, 1994):

$$\text{Volume Tumoral} = \text{Medida longitudinal (mm)} \times [(\text{medida transversal (mm)})^2 \times \frac{3}{4} \pi]$$

## 4.10 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS

### 4.10.1 Determinações Bioquímicas

As determinações sanguíneas são ferramentas precisas que podem predizer quadros lesivos, indicam com alta sensibilidade as alterações que ocorrem nos sistemas orgânicos como um todo, podendo substituir técnicas mais dispendiosas.

As amostras sanguíneas foram coletadas, após sedação de todos os grupos experimentais, por via intracardíaca com utilização do anticoagulante heparina. As amostras foram separadas em centrífuga e congeladas a -20°C até o processamento. Posteriormente foram realizadas as determinações de creatinina, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP).

A creatinina é um produto formado devido à degradação da fosfocreatina dos músculos, pela enzima creatina-quinase. Essa reação ocorre através da contração muscular, ou seja, cada vez que o músculo é contraído a quebra de creatina acontece produzindo creatinina, que é filtrada pelos rins, e excretada na urina.

Quando os níveis de creatinina no sangue encontram-se elevados, indicam diminuição da função renal, desidratação, obstrução do trato urinário ou doenças musculares.

As enzimas TGO e TGP, também chamadas de AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase), respectivamente, são enzimas que estão presentes em maior concentração no hepatócito, e normalmente, são intracelulares. A ocorrência de aumento dessas enzimas sugere lesão hepatocelular. A lesão pode ser aguda: como nas hepatites, ou crônica, como na doença hepática gordurosa e lesão induzida por etanol.

A TGO está presente também na musculatura estriada (coração e músculos esqueléticos) e em menor concentração nos rins, cérebro e pâncreas. Essa enzima forma aspartato, durante o catabolismo dos aminoácidos, no qual transfere grupos amino do glutamato ao oxalato, e o produto formado é usado como fonte de nitrogênio no ciclo da ureia.

A TGP, além do hepatócito está presente em quantidades muito menores na musculatura estriada. Esta enzima catalisa a transferência do grupo amino da alanina ao alfa-cetoglutarato, formando piruvato e glutamato.

As determinações de creatinina foram realizadas no equipamento de automação para bioquímica Selectra-E, da Vitalab<sup>®</sup>, utilizando-se kit comercial para creatinina da marca Kovalent<sup>®</sup> e as determinações de TGO e TGP realizadas no equipamento de automação para bioquímica Miura<sup>®</sup> 500 (Série A-1230) com kit comercial Kovalent<sup>®</sup>.

#### 4.10.2 Determinação do Hemograma

As amostras sanguíneas foram coletadas dos grupos experimentais e colocadas em frascos contendo anticoagulante EDTA 5%. A análise da contagem global celular (séries vermelha e branca) foi realizada em contador hematológico Hemacounter, da Hemogran<sup>®</sup>, e a contagem diferencial realizada em lâminas coradas por May-Grunwald/Giemsa de acordo com as técnicas utilizadas pelo Laboratório-Escola da UEPG.

#### 4.11 PREPARAÇÃO DOS TECIDOS PARA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após o tratamento dos diferentes grupos, os camundongos receberam sedação em doses adequadas ao peso do animal com a mistura quetamina/xilazina, em seguida foram coletadas as amostras sanguíneas e, posteriormente sacrificados.

Os órgãos cérebro, fígado, baço e pulmão foram retirados, bem como o tumor e imediatamente acondicionados em frascos de vidro contendo o Fixador Alfac (composto por 85% de álcool 80%, 10% de formol e 5% de ácido acético) e permaneceram por 12 horas para que ocorresse a insolubilização das proteínas e manutenção dos tecidos com estrutura próxima a que estavam no organismo vivo. Após esse período, passaram a ser acondicionados em frascos de vidro contendo álcool 70%.

A seguir, realizou-se a desidratação do material, na qual as peças anatômicas passaram por soluções alcoólicas crescentes que vão de 70% a absoluto, respeitando-se os tempos de cada solução. Posteriormente são realizados dois banhos em xilol, etapa necessária para o clareamento do material. Após o clareamento, inicia-se a fase de inclusão, na qual o material é mergulhado em parafina fundida em estufa a 60°C para que o xilol seja evaporado e os espaços preenchidos por parafina. Em seguida são montados pequenos blocos em formas feitas com papel.

Os cortes histológicos foram feitos em micrótomo com espessura de 5 µm e a coloração utilizada foi a Hematoxilina-Eosina (H.E.). Nos cortes histológicos dos tumores foi avaliado o infiltrado inflamatório, as áreas de necrose, a reação estromal e angiogênese, utilizou-se a classificação para quantificação da inflamação como leve, moderado e intenso.

As etapas de retirada dos órgãos, fixação e desidratação foram realizadas no Laboratório Multiusuário da UEPG e as etapas inclusão, corte histológico, montagem de lâminas e coloração foram realizadas no Laboratório de Histotécnica da UEPG seguindo as técnicas e normas de trabalho desse laboratório.

## 4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente através do teste ANOVA de 1-Via, com análise posterior pelo teste de Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test, sendo adotado como significância 5%. Todos os cálculos foram realizados com o programa estatístico Graph Pad - Prism Stat, versão 3.0 (San Diego, CA, USA).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

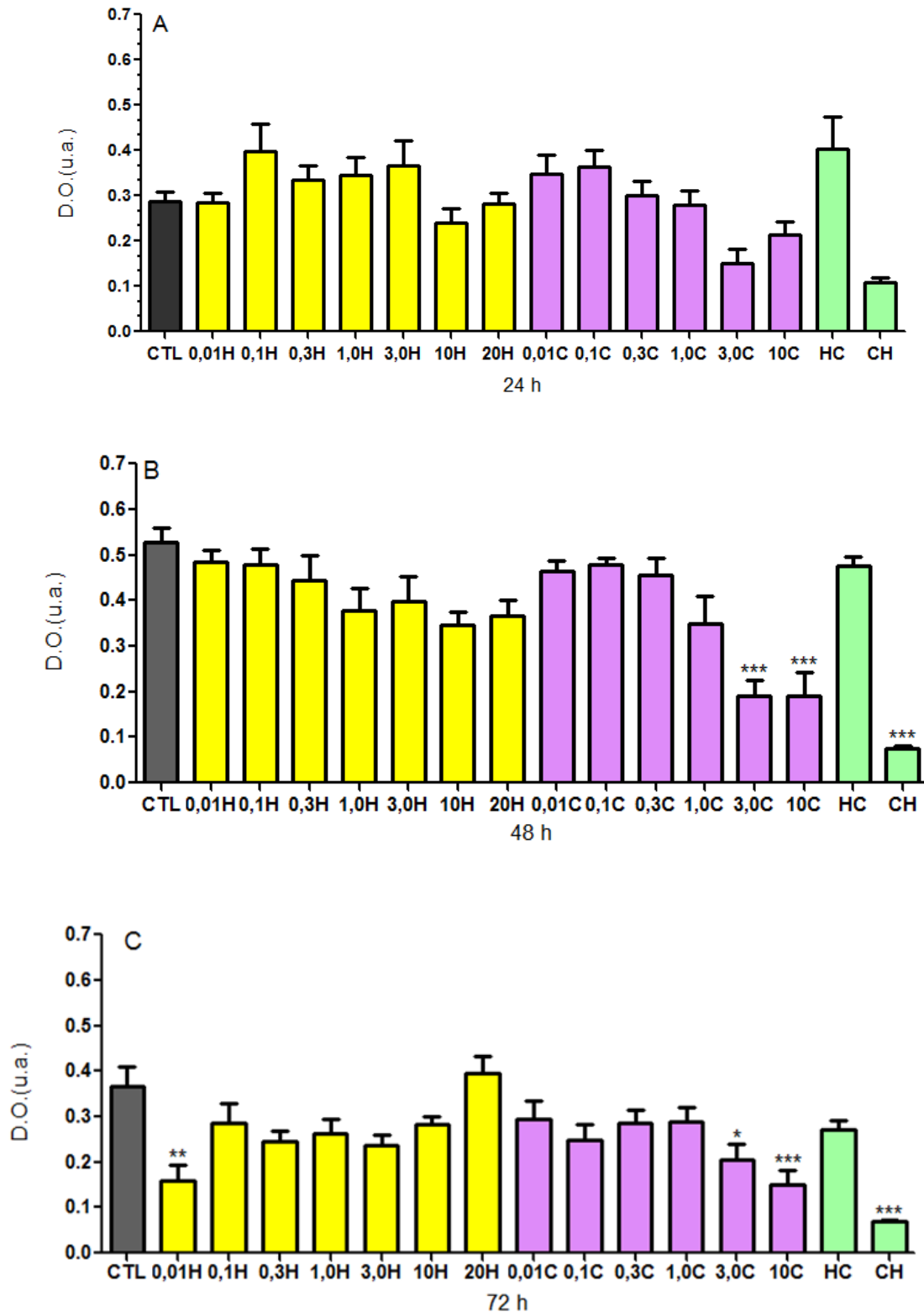
### 5.1. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM B16F10 UTILIZANDO MTT

A viabilidade das células B16F10 foi avaliada após 24, 48 e 72 horas de tratamento conforme metodologia descrita no item 4.2. Os dados mostrados na Figura 1 representam três repetições independentes, com n=4 em cada repetição do ensaio MTT.

Na Figura 1-A, observou-se o crescimento celular aumentado em relação ao controle nas seguintes concentrações 0,1, 0,3, 1,0 e 3,0 mM de histidina, 0,01, 0,1 mM de cimetidina e associação de histidina 10 mM + cimetidina 0,01 mM que não foram estatisticamente significativas em relação ao controle em 24 horas. Esse crescimento aumentado não ocorre na avaliação em 48 horas (1-B), onde todas as concentrações avaliadas têm crescimento celular diminuído em relação ao controle e estatisticamente significativo nas concentrações 3,0 e 10 mM de cimetidina e associação de cimetidina 10 mM + histidina 0,01 mM indicando diminuição da viabilidade celular.

Após 72 horas (Figura 1-C), apenas a concentração de 20 mM de histidina apresentou crescimento celular aumentado em relação ao controle. As demais concentrações apresentaram limitação do crescimento celular em relação ao controle, sendo estatisticamente significativa nas concentrações 0,01 mM de histidina, 3,0 e 10 mM de cimetidina e associação de cimetidina 10 mM + histidina 0,01 mM indicando diminuição da viabilidade celular.

**FIGURA 1.** Teste de viabilidade celular (MTT) com células B16F10. Células B16F10 (CTL), soluções de histidina (H) nas concentrações 0,01, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10 e 20 mM, soluções de cimetidina (C) nas concentrações 0,01, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 e 10 mM, e associação de histidina 10 mM + cimetidina 0,01 mM (HC) e associação de cimetidina 10 mM + histidina 0,01 mM (CH), avaliado em (A) 24 horas, (B) 48 horas e (C) 72 horas. Teste ANOVA -1 VIA, post hoc Tukey. As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=12/grupo). Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo Controle. \*\*\*P<0,001.



A histidina, precursora da histamina, limitou a viabilidade celular em baixas concentrações, enquanto a sobredosagem de 20 mM estimulou o crescimento após 72 h de tratamento, sugerindo um papel importante na modulação da proliferação celular, sendo inibitório ou estimulante dependendo da dosagem/dias de tratamento.

Esse papel modulatório da histamina foi também encontrado por Li *et al.* (2005), porém com resultados contrários, em estudo com queratinócitos, no qual a histamina em altas concentrações inibe o crescimento de queratinócitos e em baixas concentrações promove proliferação celular dos queratinócitos.

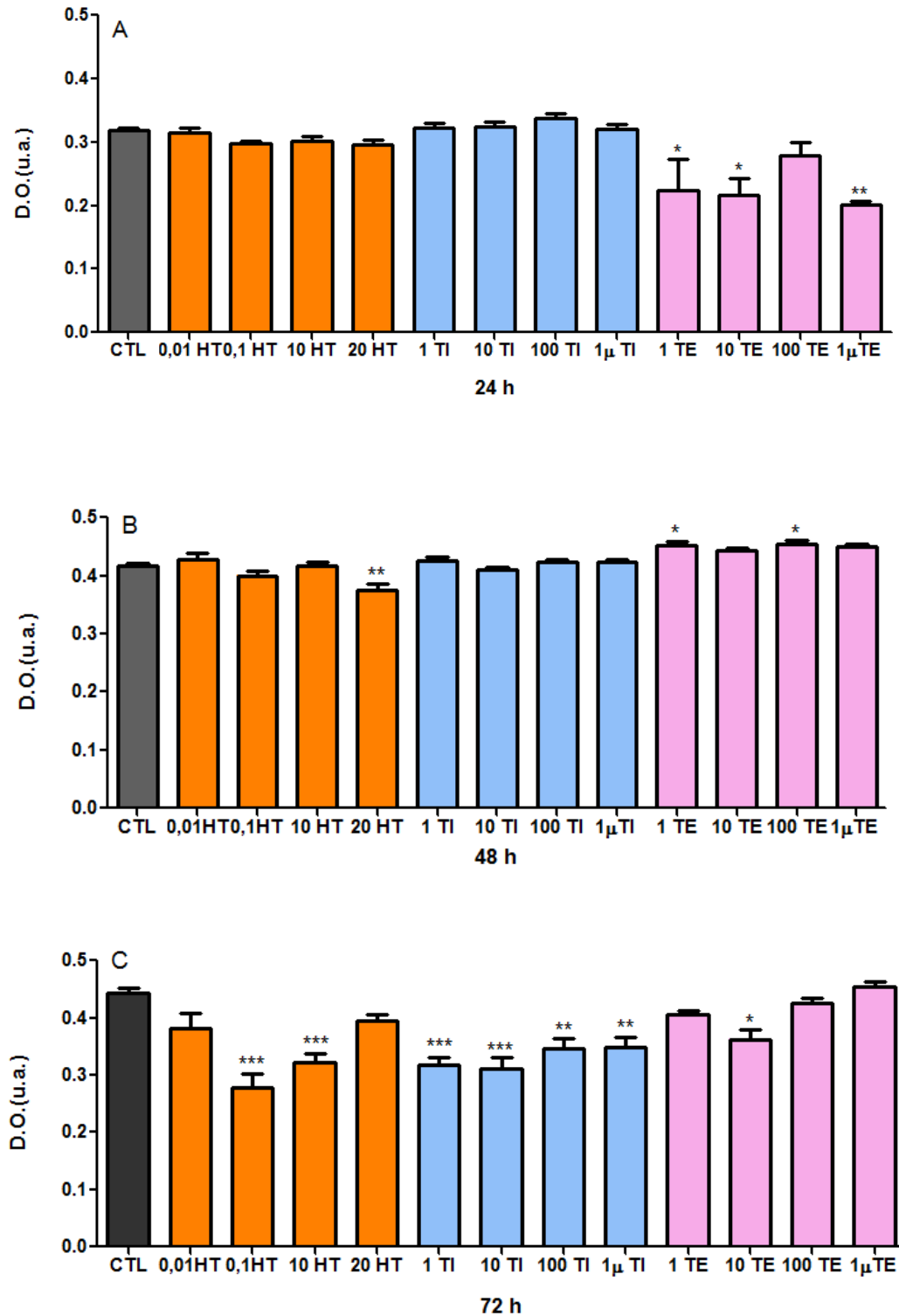
As concentrações de cimetidina estudadas levaram a inibição da proliferação celular. Dados que corroboram com Jiang *et al.* (2010), que encontraram resultados semelhantes ao avaliar o crescimento de células de câncer gástrico, através do método de MTT. As células SGC-7901 e MGC-803 expostas a várias concentrações de cimetidina determinaram um significativo decréscimo na viabilidade, sendo esse evento dependente da dose e do tempo.

Posteriormente realizado o teste de viabilidade para utilizando-se histamina, tioperamida e terfenadina em diferentes concentrações, conforme citadas no item 4.2. Os dados mostrados na Figura 2 representam duas repetições independentes, com n=3 em cada repetição do ensaio MTT.

Na Figura 2-A, observou-se o crescimento celular aumentado em relação ao controle nas seguintes concentrações 1, 10 e 100 nM de tioperamida que não foram estatisticamente significativas em 24 horas. Esse crescimento permaneceu aumentado na avaliação em 48 horas (2-B) para a concentração de 1 nM de tioperamida. Adicionalmente a concentração de 0,01 de histamina e as concentrações de 1, 10, 100 nM e 1 µM de terfenadina tiveram crescimento celular aumentado em relação ao controle em 48 h (2-B), sendo estatisticamente significativos nas concentrações de 1 e 100 nM de terfenadina, indicando aumento da viabilidade celular.

Na avaliação de 72 horas (2-C), apenas a concentração de 1µM de terfenadina apresentou crescimento celular aumentado em relação ao controle, porém não estatisticamente significativo.

**FIGURA 2.** Teste de viabilidade celular (MTT) com células B16F10. Células B16F10 (CTL), soluções de histamina (HT) nas concentrações 0,01, 0,1, 10 e 20 mM, soluções de tioperamida (TI) nas concentrações 1, 10, 100 nM e 1  $\mu$ M, e terfenadina (TE) nas concentrações 1, 10, 100 nM e 1  $\mu$ M, avaliado em (A) 24 horas, (B) 48 horas e (C) 72 horas. Teste ANOVA -1 VIA, post hoc Tukey. As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6/grupo). Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo Controle. \*\*\*P<0,001.



Com relação às concentrações 0,1 e 10 mM de histamina utilizadas, apresentaram crescimento celular diminuído em relação ao controle, porém não estatisticamente significativo (2-B) na avaliação de 48 horas, sendo na concentração de 20 mM de histamina a diminuição da viabilidade celular estatisticamente significativa (2-B).

As concentrações de terfenadina apresentaram crescimento celular diminuído em todas as concentrações, porém estatisticamente significativo nas concentrações 1, 10 nM e 1  $\mu$ M (2-A) na avaliação de 24 horas. Na avaliação de 72 horas (2-C), as concentrações de 10 nM de terfenadina e 1, 10, 100 nM, 1  $\mu$ M de tioperamida apresentaram crescimento celular diminuído, estatisticamente significativo em relação ao controle, indicando diminuição da viabilidade celular.

A terfenadina, antagonista de receptor  $H_1$ , é conhecida por causar apoptose em linhagens celulares (JIANG *et al.*, 2006). No presente estudo, foi eficaz na diminuição da viabilidade celular nas concentrações testadas em 24 horas, e posteriormente não manteve esse efeito em todas as concentrações, revelando em 48 horas, até um estímulo ao crescimento celular estatisticamente significativo. Em 72 horas a concentração de 10 nM de terfenadina apresentou diminuição da viabilidade celular estatisticamente significativa.

Uma hipótese é que a concentração do fármaco terfenadina utilizada foi baixa, não conseguindo manter o efeito de inibição do crescimento celular de acordo com o tempo decorrido. Conforme HADZIJUSUFOVIC *et al.* (2010) os efeitos encontrados em estudos com caninos e humanos em mastocitose primária utilizando loratadina e terfenadina indicaram inibição do crescimento celular e evidenciam que os fármacos são dose-dependentes, sendo a IC 50 da terfenadina de 1 a 20  $\mu$ M e da loratadina 10 a 50  $\mu$ M.

Com relação ao fármaco tioperamida, antagonista de receptor  $H_3$ , pode-se observar que o presente estudo apresentou diminuição da viabilidade celular em todas as concentrações testadas na avaliação de 72 horas. Apesar de poucos estudos terem sido realizados com esse fármaco com o intuito de avaliar a viabilidade celular, esse efeito já foi observado, como em estudo com células linfóides, no qual a tioperamida apresentou efeito apoptótico. (KAIDASHEV *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos nas diferentes concentrações de histamina mostram que ela atua como um modulador no crescimento celular, dependendo da

dosagem/dias de tratamento. Os resultados corroboram com os encontrados por Blaya *et al.* (2010) que a histamina exógena estimula a proliferação de células de melanoma humano e migração celular de modo dependente da dose. No presente estudo, o estímulo ocorreu em 48 horas, sendo a viabilidade celular diminuída em 72 horas.

Devido a estas células apresentarem resistência a tratamentos, característica comum de células tumorais (RUMJANEK *et al.*, 2001), pode-se avaliar como satisfatório os resultados apresentados por esses testes. Um largo intervalo de concentrações das drogas foi avaliado e as concentrações mais baixas de histidina (0,01 mM), 1 e 10 mM de histamina e as mais altas de cimetidina (3 e 10 mM) utilizadas, bem como o sinergismo (10 mM cimetidina/0,01 mM histidina) causaram efeitos deletérios às células. Posteriormente, observou-se esse mesmo efeito para as concentrações de terfenadina em 24 horas e para as concentrações de tioperamida em 72 horas. Fica evidenciado neste teste, o qual reflete funcionamento das mitocôndrias celulares, que nas concentrações citadas, há diminuição da viabilidade.

## 5.2 ENSAIO DE TOXICIDADE DA LINHAGEM B16F10 UTILIZANDO VERMELHO NEUTRO

Neste ensaio as células B16F10 foram plaqueadas e tratadas com diferentes concentrações de solução de histidina, solução de cimetidina e associação de soluções histidina/cimetidina conforme descrito no item 4.3.

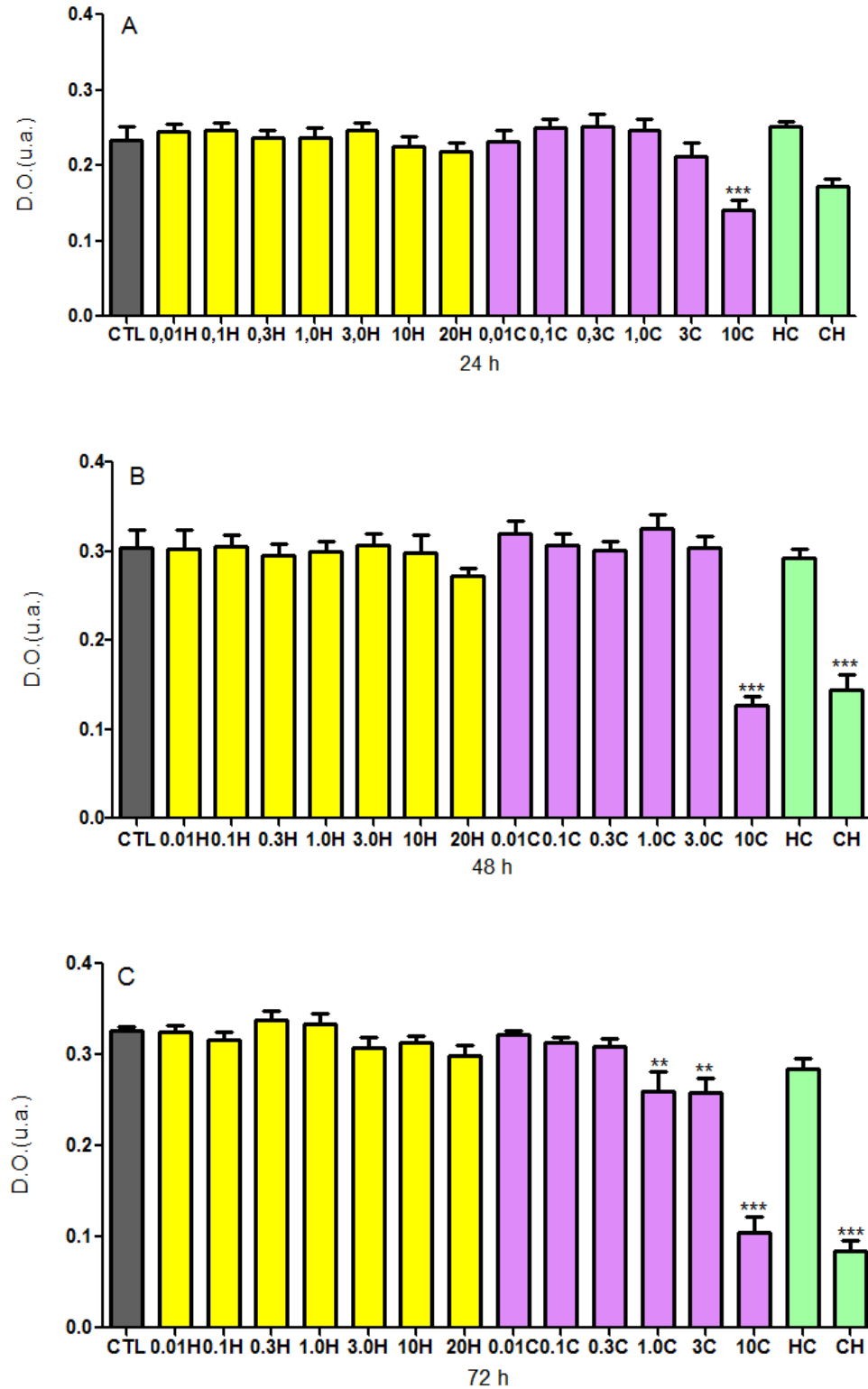
Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 3. Neste ensaio, o tratamento das células B16F10 com histidina nas concentrações de 0,01, 0,1, 0,3, 1,0 e 3,0 mM, bem como o tratamento com cimetidina nas concentrações 0,1, 0,3 e 1,0 mM e associação histidina 10 mM/cimetidina 0,01 mM sugerem em 24 horas (Figura 3-A) aumento do crescimento celular que mantém-se até 72 horas nas concentrações 0,1 e 3,0 mM histidina. O tratamento com histidina nas concentrações de 10 e 20 mM, e com cimetidina nas concentrações 0,01, 3,0 e 10 mM e associação de cimetidina 10 mM/0,01 mM de histidina tiveram a viabilidade celular diminuída em 24 horas.

O tratamento com solução de histidina no intervalo de concentrações utilizadas, não foi significativamente eficaz na diminuição da viabilidade celular ou efeito citotóxico para as B16F10 nos três tempos avaliados (Figura 3-A, B e C). As células apoptóticas mantêm sua integridade de membrana por algum tempo após o início do processo apoptótico, podendo a perda desta integridade ocorrer somente nos estágios finais do processo (McGAHON *et al.*, 1995). Portanto, por esta metodologia, células que se encontram nos primeiros estágios de apoptose poderão ser contabilizadas como células viáveis, provocando as possíveis diferenças de sensibilidade entre essa metodologia e o MTT.

No tratamento realizado com cimetidina, a concentração de 10 mM foi estatisticamente significativa em relação ao controle em 24, 48 e 72 horas. Os resultados mostraram que a associação de cimetidina 10  $\mu$ M/0,01 mM de histidina foi capaz de exercer o seu efeito citotóxico sobre a linhagem de células B16F10 nos três tempos estudados, não sendo estatisticamente significativa em relação ao controle somente em 24 horas. Nessas concentrações, os efeitos antiproliferativos mais acentuados foram obtidos, podendo-se sugerir que há uma relação entre a diminuição da viabilidade e a citotoxicidade destes compostos, devido ao fato de que foram as mesmas concentrações que provocam efeitos prejudiciais à linhagem celular B16F10, no ensaio do MTT.

Desta forma, no ensaio de citotoxicidade com o vermelho neutro, após 72 horas de tratamento, as soluções de cimetidina 1,0, 3,0 e 10 mM, provocaram efeitos nocivos à membrana das células e, por consequência, ao sistema lisossomal, resultando em dano à homeostasia da célula como um todo. Isso porque os lisossomos são as organelas responsáveis pela degradação de moléculas, reparação da membrana plasmática e ligação do material que sofreu endocitose (TURK e TURK, 2009).

**FIGURA 3.** Análise da viabilidade celular das células B16F10 pelo método vermelho neutro. Células B16F10 (CTL), soluções de histidina (H) nas concentrações 0,01, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10 e 20 mM, soluções de cimetidina (C) nas concentrações 0,01, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10 mM de cimetidina, e associação de histidina 10 mM + cimetidina 0,01 mM (HC) e associação de cimetidina 10 mM + histidina 0,01 mM (CH), avaliado em (A) 24 horas, (B) 48 horas e (C) 72 horas. ANOVA -1 VIA, post hoc Tukey. As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=8/grupo). Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo Controle. \*\*\*P<0,001.



### 5.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DA LINHAGEM B16F10

Os resultados dos experimentos *in vitro* de viabilidade e citotoxicidade celular, motivaram estudos de morfologia celular. As células B16F10 foram tratadas com diferentes concentrações de histidina, cimetidina e associação histidina/cimetidina, conforme descrito no item 4.4.

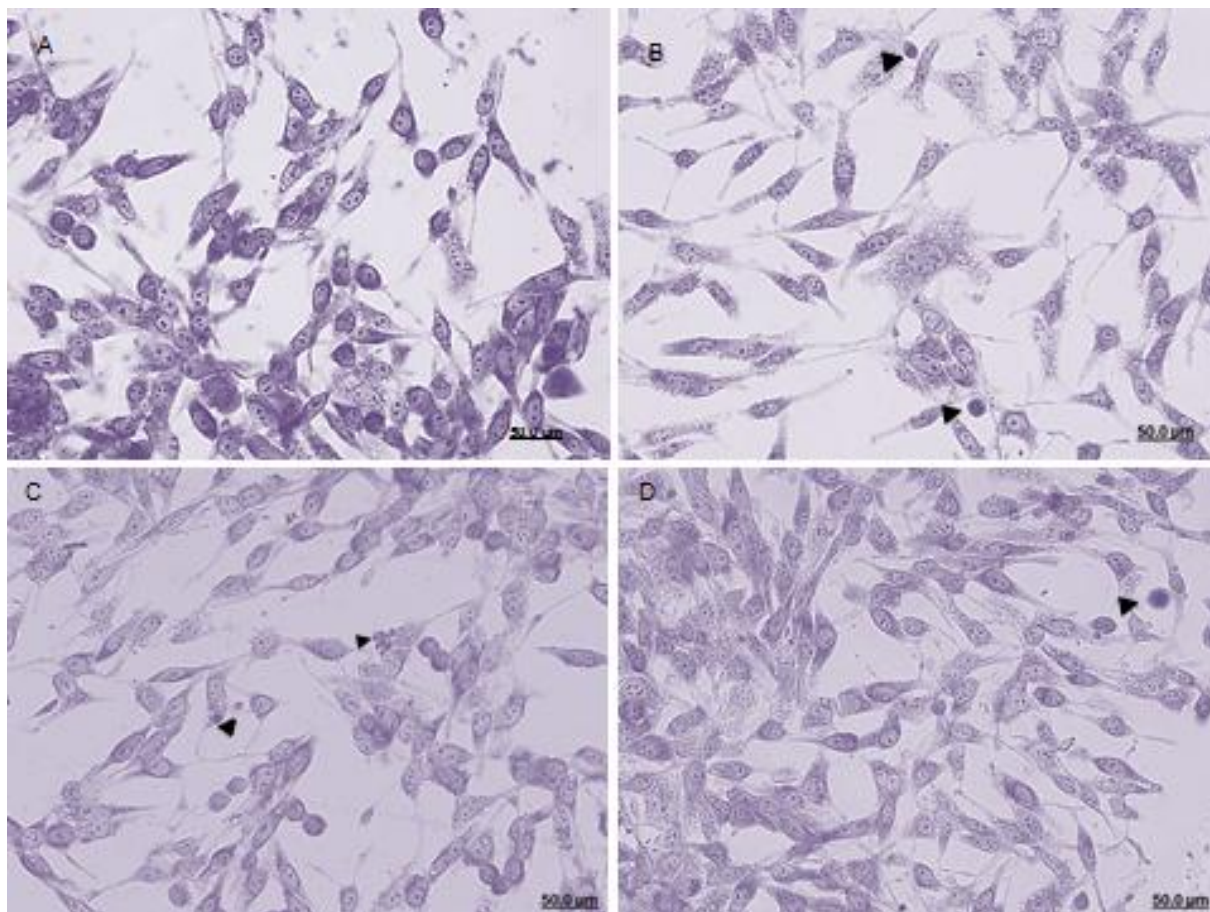
Nos tratamentos realizados não foram observadas diferenças morfológicas nos prolongamentos celulares ou na basofilia do citoplasma como as observadas por Zhao *et al.* (2001) em seus estudos de análise morfológica de células B16F10 em fibrosarcoma, utilizando o composto acetato ácido bosvéllico, ou como nos resultados dos estudos de Luvison (2008) que também encontrou alterações morfológicas em células B16F10 de melanoma murino ao utilizar guanosina como coadjuvante de quimioterápicos no tratamento de melanoma.

Nas imagens obtidas, pode ser observado o crescimento celular sem inibição por contato, que está relacionado ao fato da linhagem utilizada ser tumoral e com alto poder invasivo como mostra a figura 4 (A, B, C e D).

Nas células tratadas com solução de histidina nas concentrações 0,01, 0,1 e 0,3 mM (Figura 4-B, C, D), verificou-se o efeito discreto de retração do citoplasma, com a morfologia celular tornando-se arredondada, quando comparadas com as células controle (Figuras 4-A), este efeito sugere perda da adesão, uma vez que a redução dos prolongamentos celulares sugere interferência nos pontos de adesão celular.

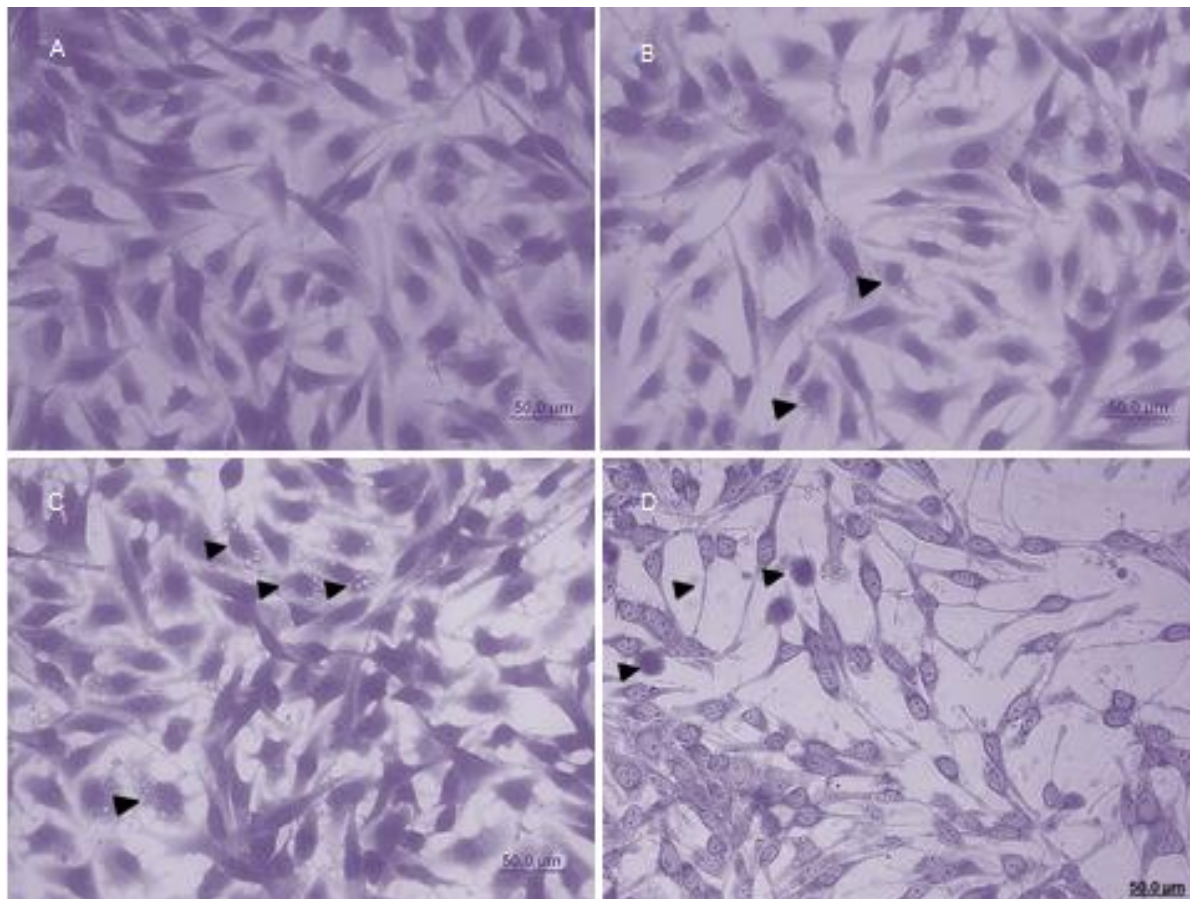
Além disso, as células B16F10 quando tratadas com solução de histidina 0,1  $\mu$ M apresentaram, de forma discreta, a presença de “blebs”, como mostrado na Figura 4 (C), que são vesículas, bolhas ou protuberâncias localizadas no citoplasma das células durante o processo de apoptose. Essas protuberâncias podem separar-se das células de origem, tornando-se corpos apoptóticos. A presença de “blebs” indica que a célula está sendo prejudicialmente exposta a algum processo ou substância, neste caso a solução de histidina 0,1 mM.

**FIGURA 4.** Microscopias da análise morfológica de células B16F10 após 48 horas de tratamento. (A) Controle, meio RPMI, (B) solução de histidina 0,01 mM, as setas indicam arredondamento celular (C) solução de histidina 0,1 mM, as setas indicam “*blebs*” (D) solução de histidina 0,3 mM, as setas indicam arredondamento celular. Exemplos obtidos de vários campos. Após fixação, coradas por May-Grunwald-Giemsa. Aumento da objetiva: 40 X.



Pôde-se observar, também, a vacuolização perinuclear do citoplasma, mostrado na Figura 4 (B e C) que é melhor evidenciada nas células tratadas com solução de histidina nas concentrações 3 mM e 10 mM (Figura 5-C, D), podendo sugerir citotoxicidade, fato que é ausente no controle (Figura 5 A), utilizada como comparação. A associação de histidina 10 mM/cimetidina 0,01 mM, apresentou arredondamento das células, ou seja, células em processo de apoptose, como mostrado na Figura 5 (D).

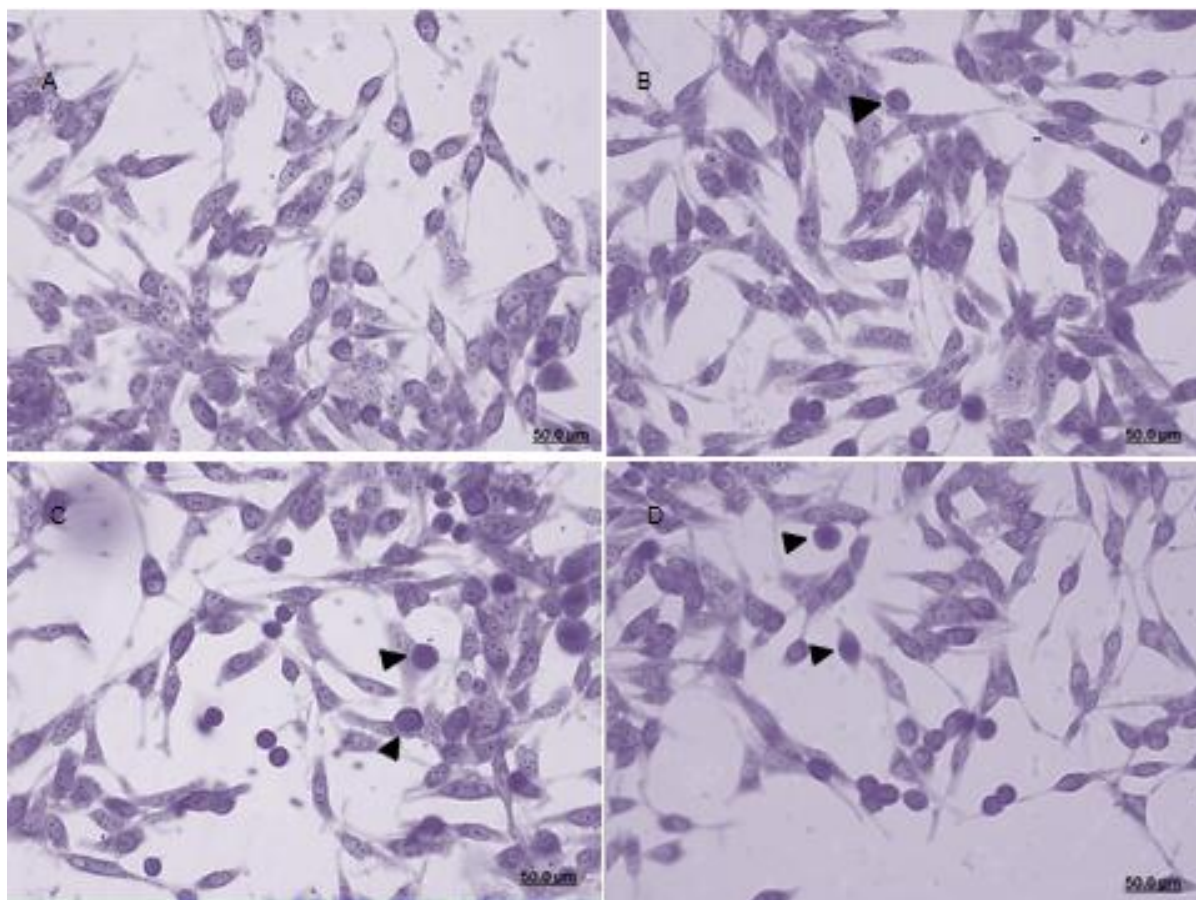
**FIGURA 5.** Microscopias de análise morfológica de células B16F10 após 48 horas de tratamento. (A) Controle, meio RPMI, (B) solução de histidina 3 mM, as setas indicam vacúolos citoplasmáticos (C) solução de histidina 10 mM, as setas indicam vacúolos citoplasmáticos (D) associação de histidina 10/ cimetidina 0,01 mM as setas indicam arredondamento celular. Exemplos obtidos de vários campos. Após fixação, coradas por May-Grunwald-Giemsa. Aumento da objetiva: 40 X.



O tratamento com histidina manteve o padrão celular, não levando a uma diferenciação, e causando um processo discreto de morte celular. Permite-se afirmar que a droga utilizada causa citotoxicidade à linhagem celular. Resultados semelhantes aos obtidos por Letzein *et al.* (2014) que obtiveram sinais de necrose e diminuição da viabilidade celular quando utilizaram histidina em células tumorais T98G, na concentração 10 µM de histidina com 48 h e nas concentrações de 10 a 50 µM em 72 horas, avaliadas por fluorescência.

Quando tratadas com solução de cimetidina, as células B16F10 apresentaram arredondamento, indicando processo apoptótico, como mostrado na Figura 6-B, C e D nas concentrações de 0,01, 0,1 e 0,3 mM quando comparadas ao controle. As células com esse aspecto são definidas pelo termo “rounded up cells”, que são células pré-desadesão e morte.

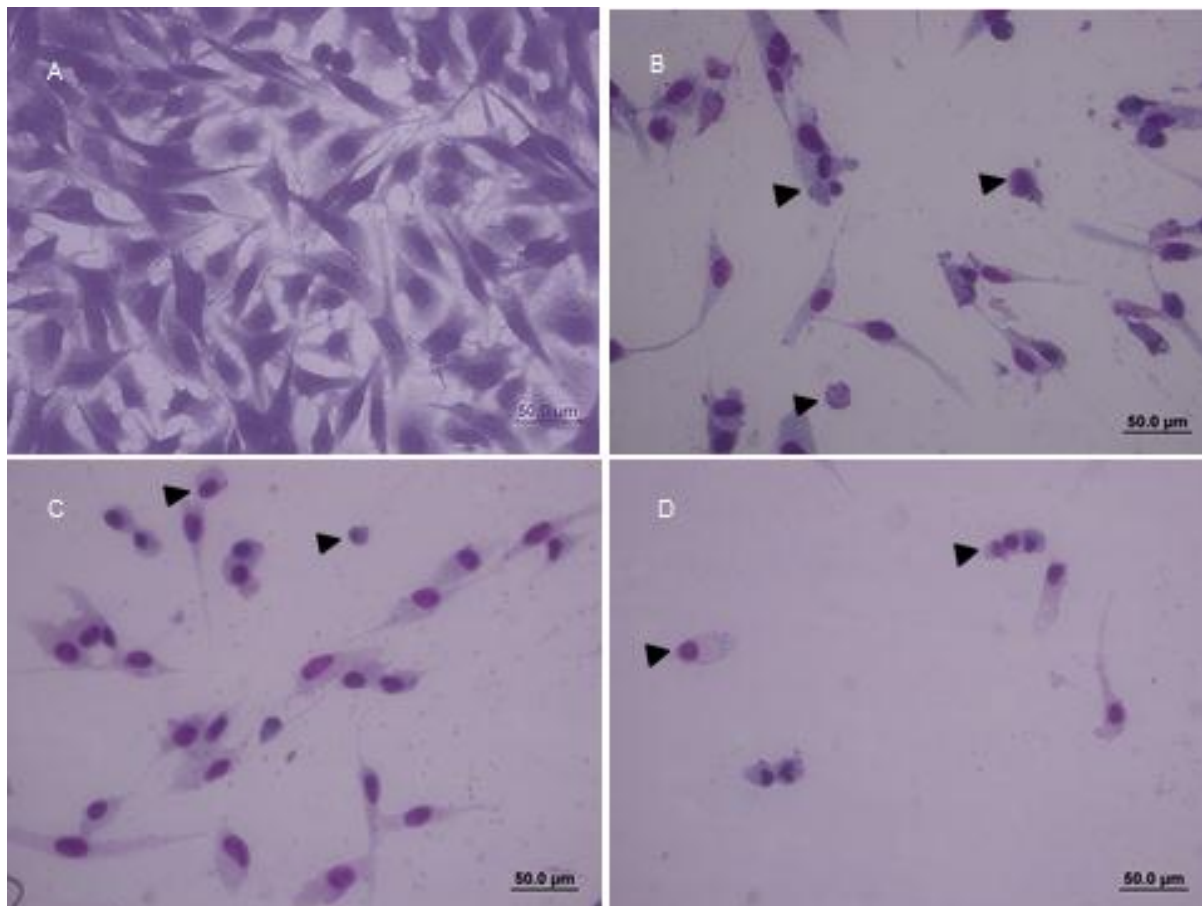
**FIGURA 6.** Microscopias da análise morfológica de células B16F10 após 48 horas de tratamento. (A) Controle, meio RPMI, (B) solução de cimetidina 0,01 mM, (C) solução de cimetidina 0,1 mM, (D) solução de cimetidina 0,3 mM. As setas indicam arredondamento celular. Exemplos obtidos de vários campos. Após fixação, coradas por May-Grunwald-Giemsa. Aumento da objetiva: 40 X.



Adicionalmente, no tratamento com cimetidina, pôde-se observar através das micrografias que quando a concentração da droga foi aumentada, as características de morte celular aumentaram. Isso pode ser observado na Figura 7, com as concentrações 3  $\mu$ M (B) e 10  $\mu$ M (C), onde é evidente o processo de morte celular.

A Figura 7 (D) mostra a associação cimetidina 10 mM/histidina 0,01 mM que revelou que houve uma tendência da associação em provocar a morte celular de forma mais intensa que quando a cimetidina é utilizada isolada, possivelmente pelo somatório dos danos celulares provocados na utilização de histidina e na utilização de cimetidina nas concentrações testadas, podendo-se afirmar que a droga causa diminuição do crescimento celular e citotoxicidade.

**FIGURA 7.** Microscopia da análise morfológica de células B16F10 após 48 horas de tratamento. (A) Controle, meio RPMI, (B) solução de cimetidina 3 mM, (C) solução de cimetidina 10m M, (D) associação de cimetidina 10/histidina 0,01 mM. As setas indicam arredondamento celular e morte. Exemplos obtidos de vários campos. Após fixação, coradas por May-Grunwald-Giemsa. Aumento da objetiva: 40 X.



A análise morfológica comprovou os resultados obtidos nos ensaios de MTT e vermelho neutro, ou seja, as concentrações de drogas que apresentaram diferença estatisticamente significativa nos ensaios de viabilidade celular foram as que revelaram danos às células na morfologia celular.

#### 5.4 QUANTIFICAÇÃO DE HISTAMINA

O teste de ELISA para quantificação de histamina foi realizado conforme descrito no Item 4.5 da metodologia.

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que na amostra controle os níveis de histamina estavam abaixo da sensibilidade do teste, não sendo detectados na leitura.

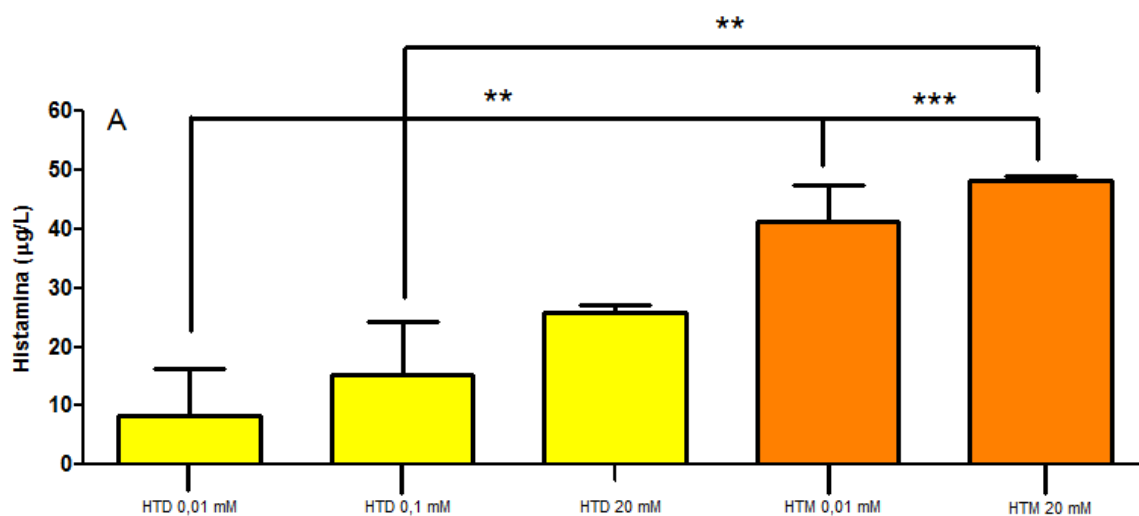
A quantificação de histamina após tratamento das células com diferentes concentrações de histidina e histamina estão mostrados na Figura 8. Foram testadas

para histidina as concentrações que apresentaram-se estatisticamente diferentes no teste de viabilidade celular, bem como a histamina nessas concentrações para comparação. Nos sobrenadantes analisados de histidina, há presença de histamina, porém, em quantidades menores do que quando tratadas com a própria histamina.

De acordo com os resultados encontrados, a histidina na concentração de 0,01 mM apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à histamina na concentração 0,01 mM e 20 mM. A histidina na concentração de 0,1 mM apresentou diferença estatística em relação à histamina na concentração de 20 mM.

A histidina produziu histamina quando comparada ao controle, porém frente aos resultados, acredita-se que a histidina deva participar de outras vias metabólicas intracelulares diferentes da produção de histamina.

**Figura 8.** Quantificação para histamina em sobrenadante de cultura celular B16F10. Células tratadas por 72 horas com histidina (HTD) nas concentrações 0,01, 0,1 e 20 mM e histamina (HTM) nas concentrações 0,01 e 20 mM. Teste ANOVA 1-VIA,  $p < 0,001$ .

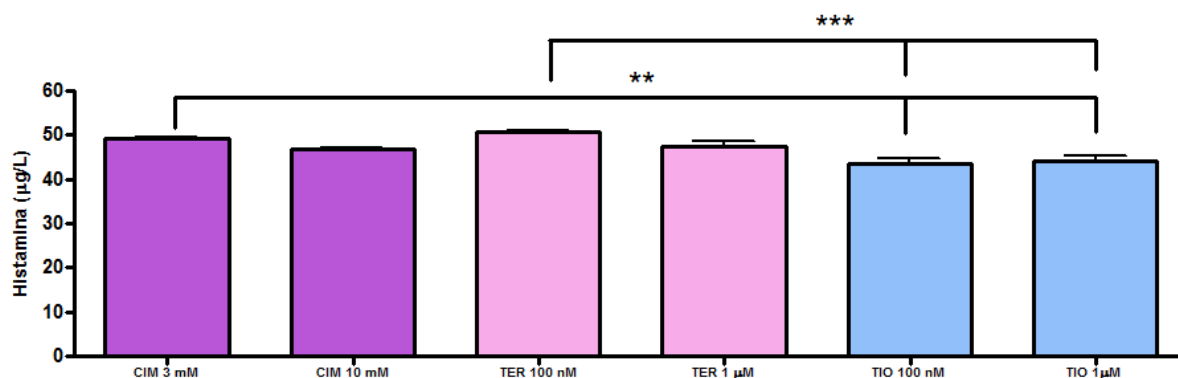


Adicionalmente realizada a quantificação para os antagonistas de histamina, terfenadina (antagonista de receptor  $H_1$ ), cimetidina (antagonista de receptor  $H_2$ ) e tioperamida (antagonista de receptor  $H_3$ ), conforme está mostrado na Figura 9.

A cimetidina na concentração de 3 mM apresentou valores estatisticamente significativos em relação à tioperamida nas concentrações de 100 nM e 1µM.

A terfenadina na concentração de 100 nM apresentou valores estatisticamente significativos em relação à tioperamida nas concentrações de 100 nM e 1µM.

**Figura 9.** Quantificação para histamina em sobrenadante de cultura celular B16F10. Células tratadas por 72 horas com cimetidina (CIM) nas concentrações 3 e 10 mM, terfenadina nas concentrações 100 nM e 1  $\mu$ M e tioperamida (TIO) nas concentrações 100 nM e 1  $\mu$ M. Teste ANOVA 1-VIA,  $p < 0,001$ .



Tem sido relatado o envolvimento da histamina na proliferação celular, no desenvolvimento embrionário, e no crescimento de tumores. Efeitos biológicos que são mediados pelos receptores específicos de histamina ativados ( $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$ , e  $H_4$ ) diferem nos padrões de expressão e funções dos tecidos. (BLAYA *et al.*, 2010).

A histamina regula várias funções através da ligação às proteínas G de quatro receptores ( $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$  e  $H_4$ ). O  $H_3$  exerce seus efeitos por meio de ativação da proteína G, reduzindo AMPc tendo na regulação das vias de crescimento um papel-chave (FRANCIS *et al.*, 2007).

Os três tratamentos realizados levaram ao estresse celular e aumentaram a produção de histamina. Esses resultados podem ser avaliados em duas hipóteses: a) a inibição de receptores  $H_1$  induz maior produção de histamina pelas células B16F10 ou o bloqueio desses receptores limita a recaptação de histamina; b) A tioperamida induziu a uma menor produção de histamina ou o bloqueio dos receptores  $H_3$  permite uma maior recaptação de histamina.

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, foi observada a expressão dos receptores histaminérgicos envolvidos e sua expressão nas células estudadas. De acordo com NCBI Genome (2015) os receptores  $H_1$ , localizados no cromossomo 6 das células, são pouco expressos, também pouco expressos os receptores  $H_2$ , localizados no cromossomo 13. Já os receptores  $H_3$ , localizados no cromossomo 2, tem sua expressão aumentada.

O estudo de Jiang *et al.* (2008) avaliaram o efeito da histamina e terfenadina em células A375 de melanoma humano. Verificaram que a histamina exógena atua

sobre a proliferação celular de um modo dependente da dose e do tempo e que a terfenadina causa apoptose por outras vias celulares independentes da sinalização da histamina. E que a baixa expressão dos receptores  $H_1$  nessas células causa pouca interferência no efeito apoptótico causado pela terfenadina.

A cimetidina, um antagonista do receptor da histamina do tipo 2, tem sido utilizada para aumentar a sobrevivência de pacientes com câncer. Entretanto, os mecanismos exatos pelos quais a cimetidina inibe o desenvolvimento de tumores ainda devem ser avaliados (NATORI *et al.*, 2005).

A terfenadina e a loratadina, em um estudo, inibiram o crescimento de uma linhagem de células humanas HMC1 e duas linhagens caninas C2 e NI-1 de mastócitos neoplásicos e também inibiram o crescimento em humanos com mastocitose neoplásica primária (HADZIJUSUFOVIC *et al.*, 2010).

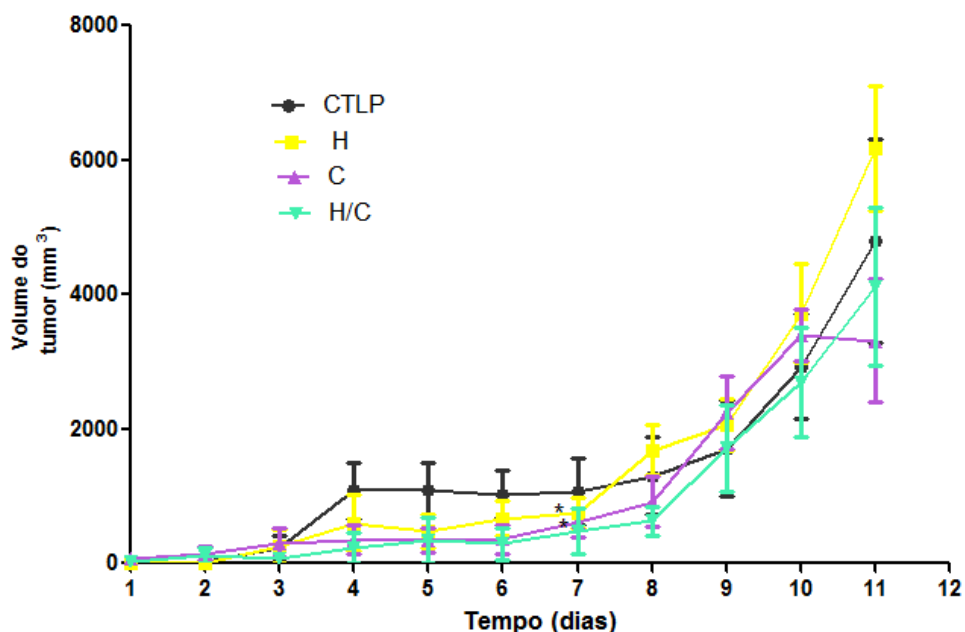
Com relação ao antihistamíco  $H_1$ , a terfenadina, estudos evidenciam que o tratamento com terfenadina *in vitro* induziu a morte de células de melanoma por apoptose e o tratamento *in vivo* inibiu o crescimento tumoral significativamente em modelos murinos (BLAYA, *et al.*, 2010).

## 5.5 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

### 5.5.1 Volume Tumoral

Os camundongos foram submetidos ao implante tumoral com células B16F10 conforme descrito no item 4.7. O volume tumoral foi avaliado durante 11 dias de tratamento nos camundongos C57BL6/J, conforme descrito no item 4.9.

**FIGURA 10.** Avaliação do volume tumoral após tratamentos com veículo (CTLP), histidina (H), cimetidina (C) e associação de histidina/cimetidina (H/C) nos tumores B16F10 em camundongos C57BL6/J portadores de melanoma. ANOVA -1 VIA, post hoc Tukey,  $p > 0,0001$ .



De acordo com os resultados obtidos no estudo *in vivo*, os tratamentos com Histidina e Cimetidina obtiveram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao Controle Portador de melanoma, tratado com veículo, até o sétimo dia de tratamento (valor de  $p > 0,05$ ), nas condições experimentais utilizadas, como pode ser observado na Figura 10. Nos demais dias, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e o controle.

Os resultados obtidos corroboram com Tomika, Nakamura e Okabe (2005) que examinaram os efeitos da histamina exógena e da cimetidina no crescimento de melanoma maligno em ratos utilizando células B16BL6, nos quais roxatidina e cimetidina suprimiram significativamente o crescimento do implante B16BL6 quando comparado com o veículo.

Nesse mesmo estudo, entretanto, observaram que a histamina e a cimetidina agem de um modo dependente da dose. A histamina quando administrada sistemicamente estimulou significativamente o crescimento de implantes B16BL6 e conseguiu suprimí-los quando havia a coadministração de cimetidina (TOMITA, NAKAMURA, OKABE, 2005).

Do oitavo dia em diante, uma das hipóteses para o crescimento tumoral em todos os grupos é a de que a quantidade de histamina circulante é elevada e devido ao seu papel modulatório, poderia estar exercendo um efeito de estímulo ao crescimento tumoral. Conforme Falus e Gilicze (2014) pode ser demonstrado que o melanoma não somente tem a capacidade de produzir histamina, mas também realizar a contínua secreção de histamina no ambiente tumoral.

No tratamento com cimetidina, após o sétimo dia uma das hipóteses é que a dose da droga administrada estaria tornando-se baixa para contenção do avanço do crescimento celular nessa fase da doença na presença elevada de histamina.

### 5.5.2 Determinações Bioquímicas

Amostras de sangue dos animais tratados foram coletadas no 12.<sup>o</sup> dia após o início do tratamento conforme item 4.10.1.

#### 5.5.2.1 Análise do perfil de Creatinina dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos

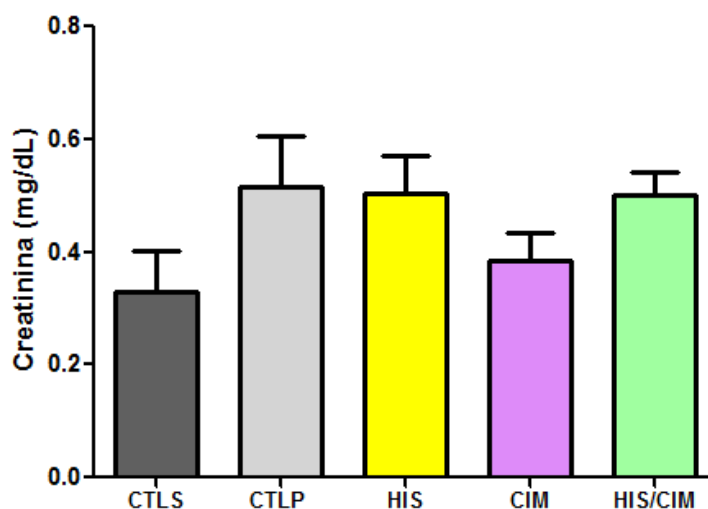
Com relação às substâncias administradas nesse estudo, foi verificada através da creatinina, a possível toxicidade renal. Conforme Pontes *et al.* (2014), os compostos para tratamento de câncer são, em sua maioria, nefrotóxicos e podem não afetar os rins diretamente, mas proporcionam diferentes toxicidades alterando o a excreção renal. Esses agentes incluem os analgésicos, os quimioterápicos e as terapias de alvo molecular. Assim, o monitoramento da função renal em pacientes com câncer é essencial para a administração segura de agentes terapêuticos.

O diagnóstico de insuficiência renal foi mais comumente atribuído para indivíduos com diagnóstico coexistindo de cardíaca congestiva, doença pulmonar crônica, doença renal crônica, câncer, e infecção pelo HIV (LIANGOS *et al.*, 2006). Em pacientes com melanoma avançado a insuficiência renal associada à intensa

presença de melanina circulante é um dos fatores de mau prognóstico para o paciente, sendo por isso, uma importante avaliação nesse estudo.

Os resultados das determinações de creatinina dos grupos tratados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle sadio ou com o controle portador de melanoma, neste estudo, como está demonstrado na Figura 11.

**FIGURA 11.** Gráfico das concentrações de creatinina plasmática em camundongos C57BL6/J. Grupo Controle sadio (CTLS), Controle portador de melanoma (CTLP), e tratados com Histidina (HIS), tratados com Cimetidina (CIM) e tratados com associação histidina/cimetidina (HIS/CIM), n=5/grupo, teste ANOVA -1 VIA, post hoc Tukey,  $p<0,05$ .



Os resultados indicaram que os níveis de creatinina estão discretamente aumentados nos camundongos portadores de melanoma quando comparados ao grupo controle sadio, porém não indicando toxicidade.

#### 5.5.2.2 Análise do perfil de Enzimas Hepáticas dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos

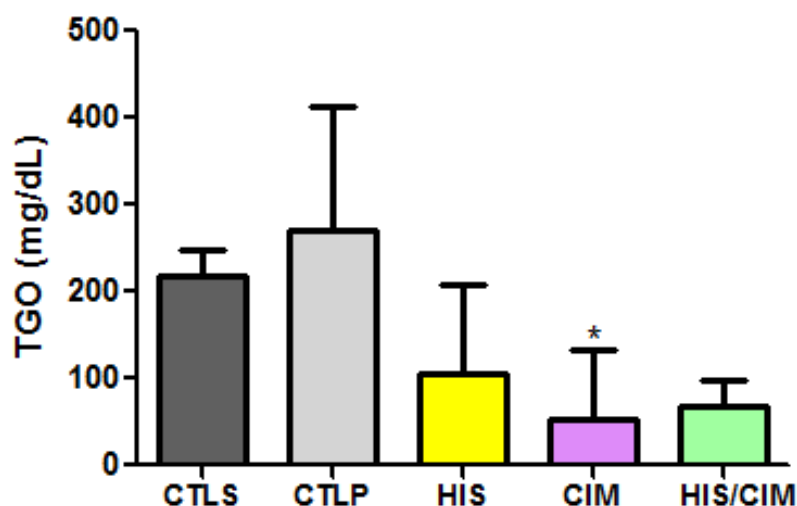
Neste estudo, determinações de TGO e TGP foram realizadas e as Figuras 12 e 13 mostram os valores plasmáticos das enzimas nos diferentes grupos experimentais. Os valores de TGO e TGP apresentaram-se aumentados no Grupo Controle Portador de melanoma quando comparadas ao Controle sadio, com diferença estatisticamente significativa em TGP.

Em melanoma, o fígado é um órgão afetado rapidamente com possível comprometimento de função e metástases. No melanoma ocular, por exemplo, conforme Mouriaux *et al.* (2012), é evidente a disseminação hematogênica e sua tendência à metástase para o fígado; o órgão está envolvido em 90% a 95% dos casos, e consequentemente, é o principal alvo para a triagem de metástases.

De acordo com os resultados apresentados, os tratamentos com histidina, cimetidina e associação histidina/cimetidina apresentaram valores de TGO e TGP diminuídos em relação ao Controle Portador de melanoma. Conforme Pós, Safrany, Müller (2005) os tumores malignos apresentam uma quantidade elevada de histamina circulante, e, receptores de histamina nas células tumorais e de acordo com Biondo-Simões (2000) estudos mostram que, quando a histamina é exogenamente administrada, ocorre regeneração celular em hepatócitos.

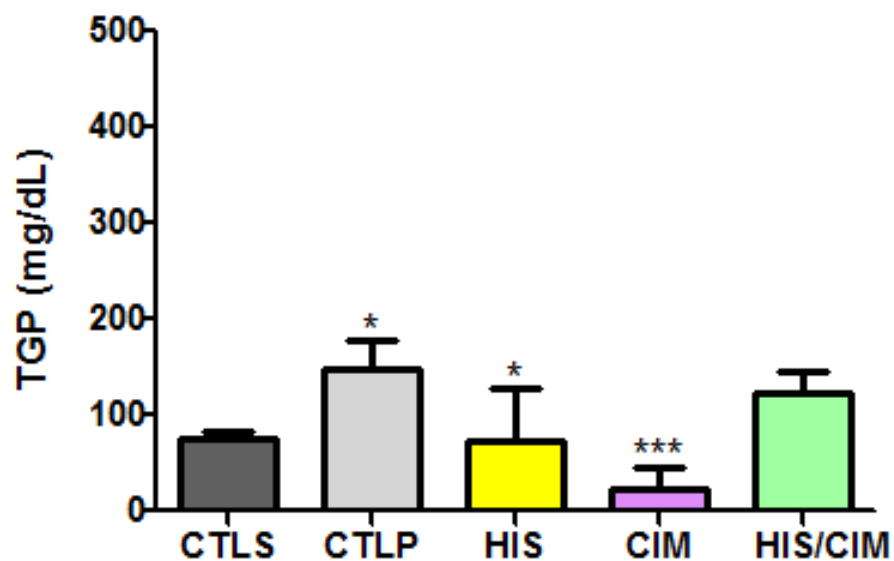
A Histidina, utilizada como suplementação de histamina, poderia estar auxiliando no efeito protetor aos hepatócitos, resultando em valores de TGO e TGP menores que os valores encontrados no Grupo Controle Portador de melanoma, esses dados, entretanto, foram estatisticamente significativos somente em TGP, quando a histidina foi administrada de forma isolada.

**FIGURA 12.** Gráfico das concentrações de transaminase pirúvica (TGO) plasmática em camundongos C57BL6/J. Controle Sadio (CTLS) sem implante tratados com veículo, Controle Portador de melanoma, com implante tumoral e tratamento com veículo (CTLP), com implante tumoral tratados com Histidina (HIS), com implante tumoral tratados com Cimetidina (CIM) e com implante tumoral tratados com associação Histidina/Cimetidina (HIS/CIM), n=5/grupo, teste ANOVA -1 VIA, post hoc Tukey,  $p < 0,05$ .



Em relação ao grupo experimental tratado com Cimetidina, houve diferença estatisticamente significativa quando comparado ao Grupo Controle Portador de melanoma em TGO e TGP. Neste estudo, a cimetidina, ao se ligar aos receptores  $H_2$  de histamina, possivelmente mantém uma grande quantidade de histamina circulante, proveniente do próprio tumor. A histamina, que é rapidamente metabolizada, poderia estar permanecendo mais tempo na circulação, devido à ligação da cimetidina aos receptores celulares  $H_2$  (meia vida de 4 a 7 horas), o que resultaria em um efeito protetor ou regenerador mais evidente para os hepatócitos.

**FIGURA 13.** Gráfico das concentrações de transaminase pirúvica (TGP) plasmática em camundongos C57BL6/J Controle sadio (CTLS), Controle portador de melanoma, (CTLP), Histidina (HIS), Cimetidina (CIM) e com associação Histidina/Cimetidina (HIS/CIM), n=5/grupo, teste ANOVA -1 VIA, post hoc Tukey,  $p < 0,05$ .



### 5.5.3 Estudo dos Parâmetros Hematológicos

#### 5.5.3.1 Avaliação da Série Vermelha

Em tratamentos com quimioterápicos convencionais, alterações hematológicas são comuns, estando presentes na maioria dos casos, anemia e

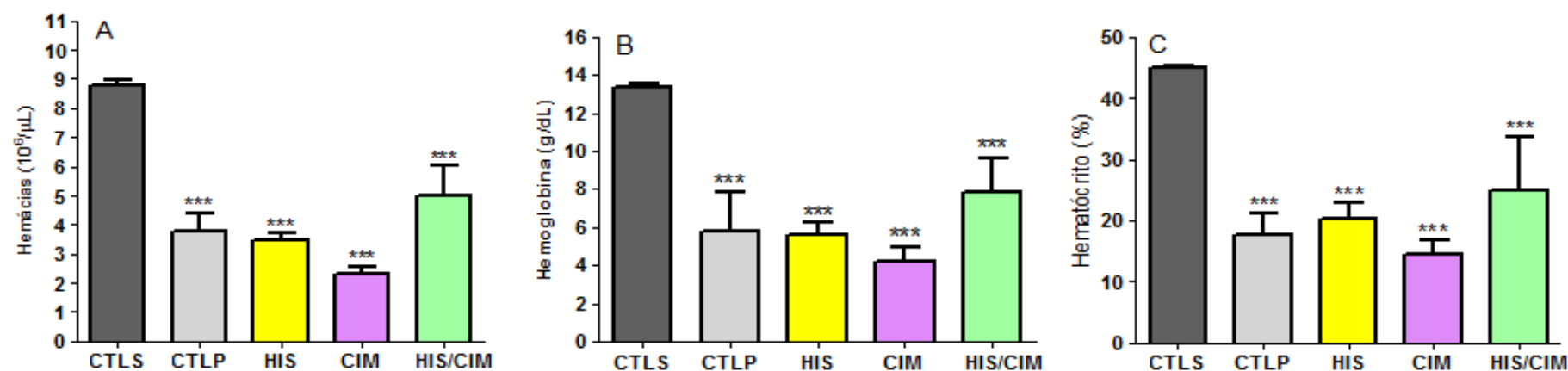
mielossupressão. Os parâmetros hematológicos foram, por isso, avaliados nesse estudo.

Os resultados obtidos dos eritrogramas estão demonstrados na Figura 14 e revelam que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais para os valores obtidos nas determinações de hemácias, de hemoglobina e hematócrito.

De acordo com os dados, em todos os grupos, o melanoma B16F10 causa diminuição no número de hemácias, hemoglobina e hematócrito, estatisticamente significativos, que levam ao aparecimento de anemia quando comparados ao Grupo Controle Sadio.

O Grupo Cimetidina apresentou menores valores na série vermelha quando comparado aos outros tratamentos. Este fato pode estar relacionado ao fármaco cimetidina, o qual traz em seus efeitos colaterais, a possibilidade de ocorrência de citopenias, fato que pode ser considerado para os valores de hemácias encontrados nos eritrogramas.

**FIGURA 14.** Gráficos dos eritrogramas. (A) Contagem de eritrócitos circulantes ( $10^6/\mu\text{L}$ ), (B) concentração de hemoglobina (g/dL) e (C) hematócitos (%) em camundongos C57BL6/J. Camundongos Controle Sadio (CTLs), Controle Portador de melanoma (CTLP), e tratados com Histidina (HIS), tratados com Cimetidina (CIM) e tratados com associação histidina/cimetidina (HIS/CIM), n=5/grupo, teste ANOVA -1 VIA, post hoc Tukey,  $p<0,0001$ .



### 5.5.3.2 Avaliação da Série Branca

Quanto ao leucograma, avaliou-se o número total de leucócitos, bem como a contagem diferencial manual. Esta avaliação se fez necessária considerando-se que a diminuição do número de leucócitos na contagem global pode caracterizar leucopenia, o que indica uma ação tóxica ou imunossupressora sobre essas células.

Na contagem diferencial, os números de segmentados, bastonetes, eosinófilos, linfócitos, basófilos e monócitos são determinados em valores percentuais. Nesse estudo, devido ao envolvimento da histamina no processo fisiopatológico do melanoma, esperava-se encontrar valores aumentados de eosinófilos, que são as células sanguíneas armazenadoras de grânulos de histamina. Como ocorre nos seres humanos, a concentração de histamina no sangue é de duas a três vezes maior, em pacientes com tumores malignos diagnosticados em comparação com pacientes saudáveis (MORIARTY *et al.*, 1988).

Células imunitárias, como os eosinófilos e os basófilos, acredita-se que são as mais importantes fontes de mediadores nas doenças de pele (GUTOWSKA-OWSIK *et al.*, 2014). Nos grupos experimentais de camundongos C57BL6/J tratados, no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao número de eosinófilos ou outras células sanguíneas na contagem diferencial, conforme dados mostrados na Tabela 1.

Os basófilos não foram encontrados nas lâminas analisadas e a contagem global de leucócitos também não apresentou diferença estatisticamente significativa.

**TABELA 1.** Contagem global de leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ ) e diferencial de leucócitos (%) de camundongos C57BL6/J. Grupos: Controle Sadio (CTLS) tratado com veículo, Grupo Controle Portador de melanoma (CTLP) com implante tumoral e tratamento com veículo, e camundongos com implante tumoral tratados com Histidina (HIS), tratados com Cimetidina (CIM) e tratados com associação histidina/cimetidina (HIS/CIM), n=5/grupo. Teste ANOVA,  $p < 0,05$ .  $\pm$  Desvio-padrão da média.

| CÉLULAS | CTLS               | CTLP               | HIS                   | CIM                   | HIS/CIM              |
|---------|--------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| LEU     | 3410 $\pm$ 1428.77 | 6076 $\pm$ 1409,28 | 4409.28 $\pm$ 2658,51 | 5688.33 $\pm$ 2632.78 | 3212.50 $\pm$ 755.92 |
| SEG     | 17.75 $\pm$ 3.774  | 29 $\pm$ 5.033     | 41.42 $\pm$ 18.35     | 18.6 $\pm$ 9.9        | 29.75 $\pm$ 8.34     |
| BAS     | 1.25 $\pm$ 1.258   | 1.25 $\pm$ 0.5     | 0.285 $\pm$ 0.48      | 0.6 $\pm$ 0.54        | 1 $\pm$ 0.816        |
| EOS     | 0.5 $\pm$ 0.577    | 1.5 $\pm$ 1.291    | 2 $\pm$ 1.41          | 2.6 $\pm$ 2.70        | 4.25 $\pm$ 2.21      |
| LIN     | 80.75 $\pm$ 5.315  | 69.5 $\pm$ 6.557   | 55.28 $\pm$ 18.36     | 75 $\pm$ 10.07        | 63.25 $\pm$ 9.17     |
| MON     | 0.75 $\pm$ 0.50    | 0.75 $\pm$ 0.957   | 0.714 $\pm$ 1.113     | 2.2 $\pm$ 0.44        | 0.75 $\pm$ 0.95      |

#### 5.5.4 Análise Histopatológica dos tecidos dos camundongos tratados

A análise histopatológica foi realizada com intuito de verificar possíveis metástases e alterações morfofuncionais causadas pelos tratamentos nos tecidos dos tumores quando comparados ao Grupo Controle Portador de melanoma e nos principais órgãos (fígado, baço, pulmões, cérebro).

Nos cortes histológicos dos órgãos, depósitos de melanina foram encontrados. Alterações histológicas e metástases não foram encontradas no material analisado, sugerindo um ponto favorável aos tratamentos realizados. Sendo o melanoma B16F10 um tipo de câncer muito invasivo e causador de metástases, conforme Bell e Wilson (2004); Shields e Shields (2009), no melanoma cutâneo, a metástase é frequente e envolve o fígado, os pulmões, os ossos, os rins e o cérebro. Adicionalmente, para Aboody *et al.* (2006), as metástases cerebrais são um problema frequente e grave para pacientes com câncer, especialmente para aqueles com melanoma em quadro avançado.

As figuras 15, 16, 17 e 18 mostram tecidos normais de cortes histológicos realizados dos órgãos dos camundongos tratados, sendo cérebro, fígado, pulmão e baço, respectivamente.

**FIGURA 15.** Cortes histológicos de cérebros de camundongos tratados. (A) Controle Portador de melanoma, (B) Tratado com Histidina, (C) Tratado com Cimetidina, (D) Tratado com associação Histidina/Cimetidina. Exemplos obtidos de várias amostras. Coloração H.E. Aumento da objetiva: 40 X.

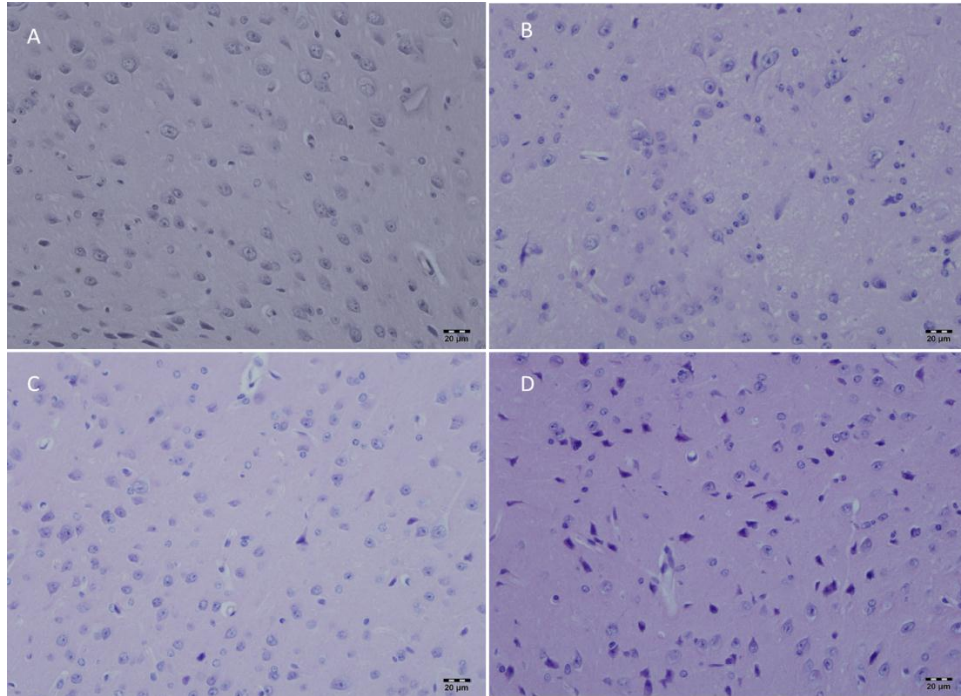


**FIGURA 16.** Cortes histológicos de fígados de camundongos tratados. (A) Controle Portador de melanoma, (B) Tratado com Histidina, (C) Tratado com Cimetidina, (D) Tratado com associação Histidina/Cimetidina. Exemplos obtidos de várias amostras. Coloração H.E. Aumento da objetiva: 20 X.

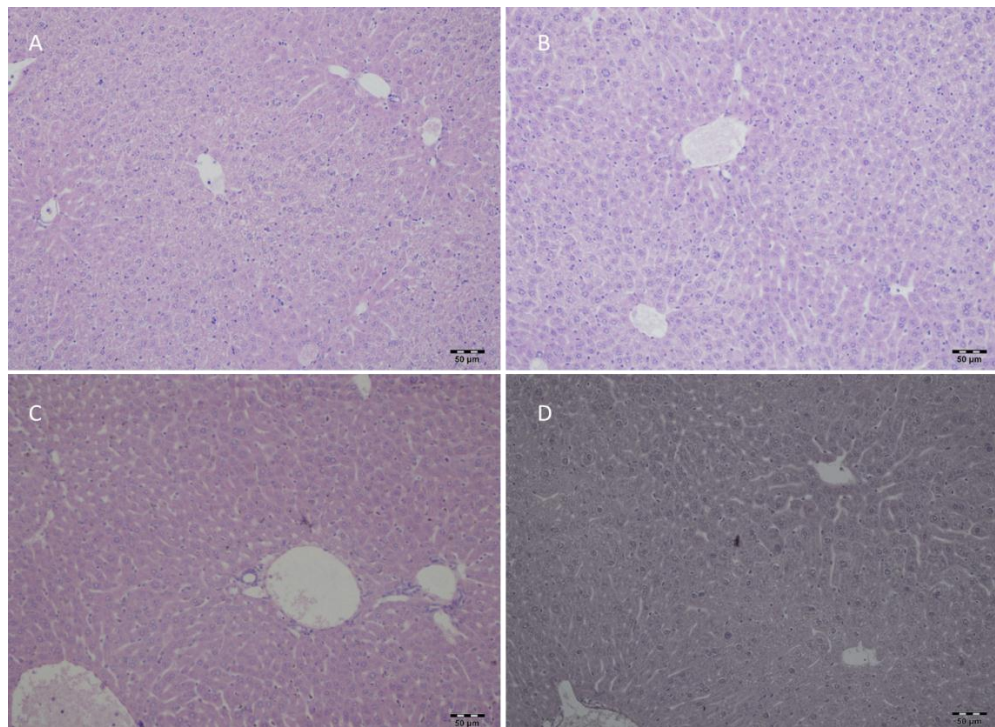


**FIGURA 17.** Cortes histológicos de pulmões de camundongos tratados. (A) Controle Portador de melanoma, (B) Tratado com Histidina, (C) Tratado com Cimetidina, (D) Tratado com associação Histidina/Cimetidina. Exemplos obtidos de várias amostras. Coloração H.E. Aumento da objetiva: 20 X.

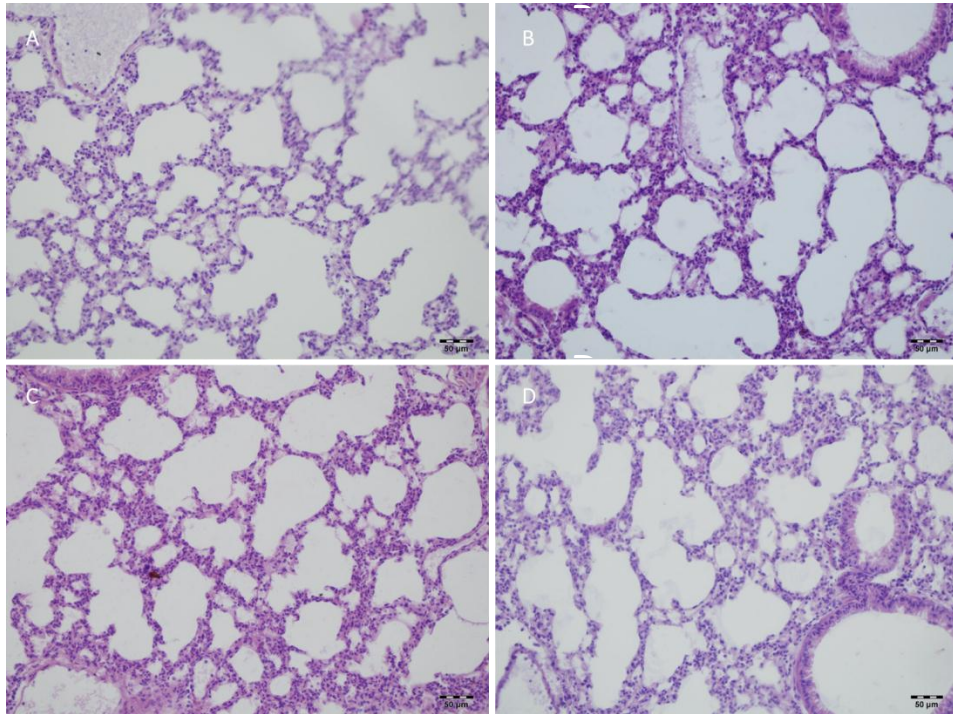
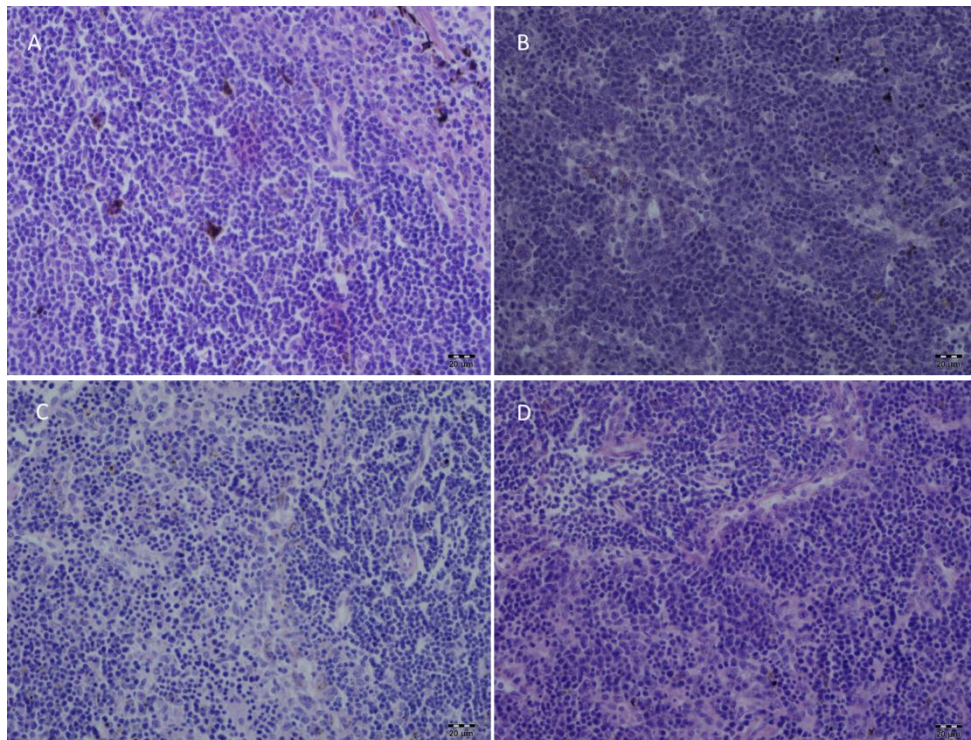


**FIGURA 18.** Cortes histológicos de baços de camundongos tratados. (A) Controle Portador de melanoma, (B) Tratado com Histidina, (C) Tratado com Cimetidina, (D) Tratado com associação Histidina/Cimetidina. Exemplos obtidos de várias amostras. Coloração H.E. Aumento da objetiva: 40 X.



A avaliação dos cortes histológicos dos tumores foi realizada conforme descrito no item 4.11 da metodologia.

No infiltrado inflamatório dos melanomas, a predominância de linfócitos, torna-se um achado de prognóstico favorável ao portador de melanoma (BROWN, 1997).

A Figura 19 mostra cortes histológicos do tumor dos grupos experimentais de camundongos C57BL6/J portadores de melanoma, nos quais foi observada a presença de áreas necróticas no Grupo Histidina (Figura 19-B). Essa morte tecidual provavelmente esteja relacionada com citotoxicidade celular causada por histidina. O Grupo Cimetidina apresentou infiltrados linfocitários (Figura 19-C) e o Grupo associação Histidina/Cimetidina (Figura 19-D), no material analisado, não apresentou áreas necróticas ou infiltrado leucocitário. Neste estudo, o Grupo Histidina apresentou inflamação grau leve e Grupo Cimetidina grau moderado.

Os resultados obtidos com o Grupo Cimetidina diferem dos encontrados por Tomita, Izumi, Okabe (2003) no estudo de ratos tratados por 26 dias com cimetidina, no qual a análise histológica revelou aumento de áreas necróticas nos tecidos de tumor de cólon implantados quando comparados ao grupo controle.

Quanto aos vasos sanguíneos, observou-se as paredes vasculares íntegras e com contorno regular, fato comum a todo material examinado, como pode ser observado na Figura 20. Em processos fisiológicos e patológicos como o câncer, a angiogênese é um componente importante, estudos correlacionam a angiogênese com a agressividade tumoral em vários tipos de câncer (PEREIRA *et al.*, 2008).

Conforme Van Kempen, Muijen, Ruiter (2005) e Smolle, Hofmann-Wellenhof, Fink-Puches (1996), a reação estromal é formada por uma resposta à inflamação, que promove a angiogênese e remodela as proteínas extracelulares. Esses fatores contribuem para formação do ambiente favorável ao tumor capaz de sustentar seu crescimento e metástase.

A quantidade de vasos não diferiu, no material analisado, nos tratamentos com Histidina (Figura 20- B) e associação Histidina/Cimetidina (Figura 20-D) quando comparados com o Grupo Controle Portador de melanoma (Figura 20-A), sugerindo que esses tratamentos não promoveram favorecimento da vascularização. Os resultados encontrados são semelhantes aos dos estudos de Francis *et al.* (2014) que mostram que não há diferenças na angiogênese no microambiente tumoral depois do tratamento com histamina, quando comparado com camundongos tratados com veículo.

**FIGURA 19.** Cortes histológicos de melanomas B16F10. (A) Controle Portador de melanoma, (B) Tratado com Histidina, área de necrose indicada pela seta, (C) Tratado com Cimetidina, Infiltrado linfocitário indicado pela seta, (D) Tratado com associação Histidina/Cimetidina. Exemplos obtidos de várias amostras. Coloração H.E. Aumento da objetiva: 40 x.

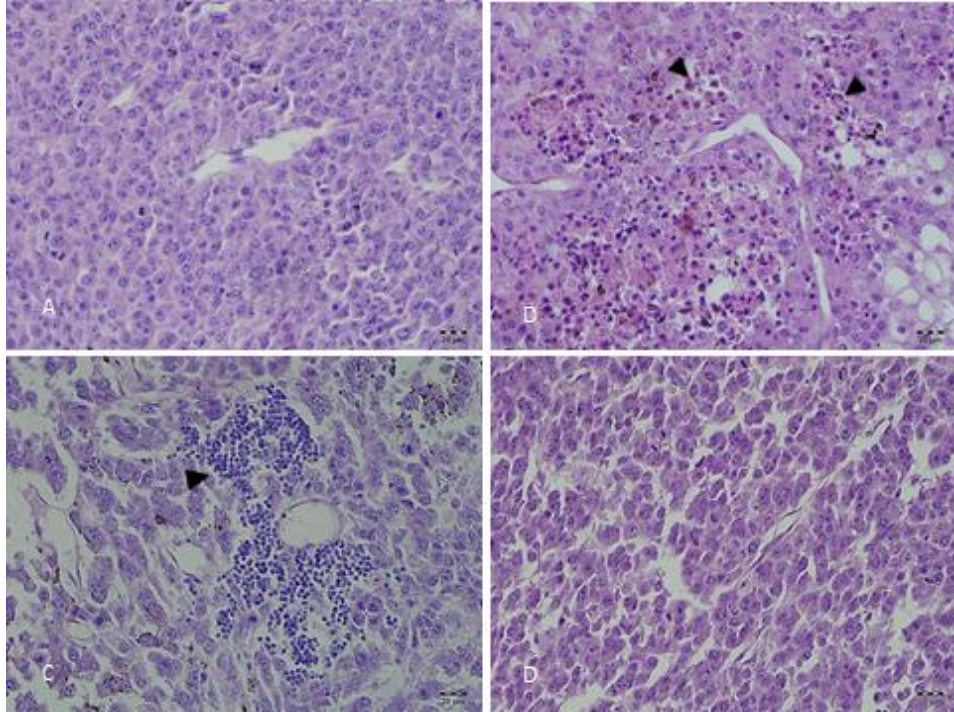
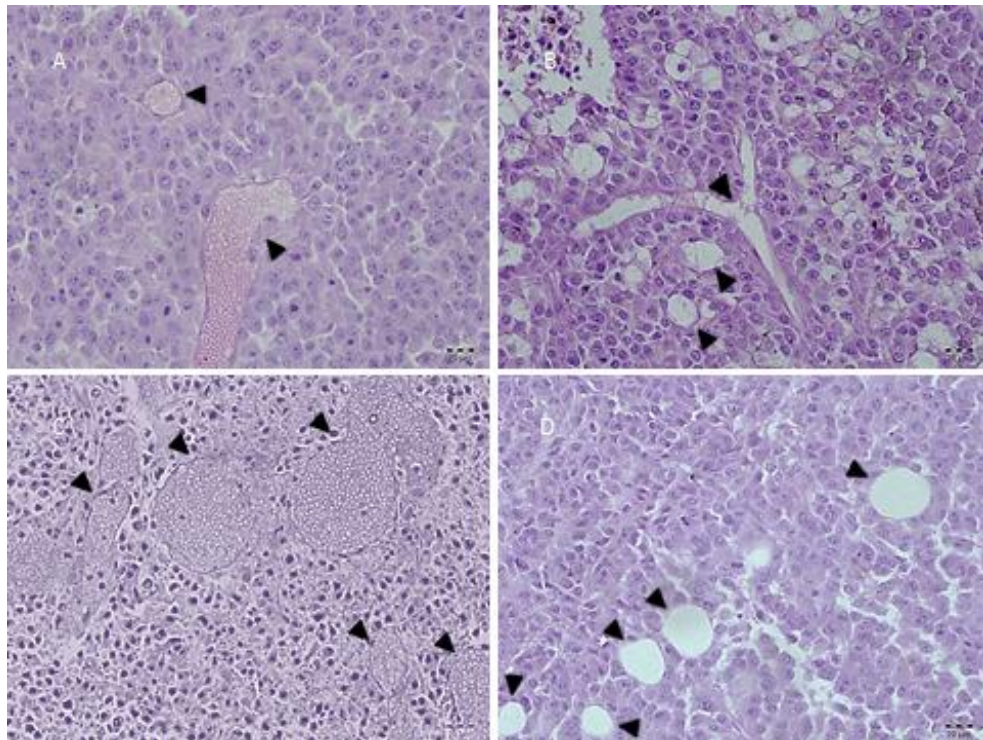


**FIGURA 20.** Micrografias de cortes histológicos de melanomas B16F10. Coloração H.E. Exemplo obtido de várias amostras. (A) Controle Portador de melanoma, (B) Tratado com Histidina, (C) Tratado com Cimetidina, (D) Tratado com associação Histidina/Cimetidina. As setas indicam vasos sanguíneos. Exemplos obtidos de várias amostras. Aumento da objetiva: 40 x.



O tratamento com Cimetidina, conforme mostrado na Figura 20-C, promoveu favorecimento da vascularização. Resultado semelhante foi obtido por Natori *et al.* (2005) com células CMT93, de câncer de cólon, em camundongos C57BL6/J, que foram tratados com cimetidina por 14 dias que revelaram que muitos novos vasos haviam sido formados no tumor, embora a densidade capilar tenha sido diminuída em relação ao controle.

## 6 CONCLUSÕES

Pode concluir-se que:

- A maior concentração de Cimetidina utilizada (10 mM) e a associação Cimetidina 10 mM/Histidina 0,01 mM diminuíram a viabilidade celular, sendo tóxicas para a linhagem celular B16F10 no período de 48 e 72 horas.
- A Histidina ocasiona pequenas alterações na morfologia celular e a Cimetidina modificações condizentes com processo pré-morte.
- A histamina nas concentrações 0,1 e 10 mM diminuiu a viabilidade celular em 72 horas.
- A terfenadina diminuiu a viabilidade celular nas concentrações 1, 10 nM em 24 horas e 10 nM em 72 horas e a tioperamida diminuiu a viabilidade celular nas concentrações de 1, 10, 100 nM e 1 µM em 72 horas.
- Até o sétimo dia de tratamento tanto a Cimetidina quanto a Histidina limitaram o crescimento do tumor em camundongos C57BL6/J portadores de melanoma.
- As análises do hemograma apontam como principal achado a não prevenção dos efeitos anêmicos do desenvolvimento tumoral pelos tratamentos utilizados.
- As análises bioquímicas de TGO e TGP sugerem que os tratamentos não causaram sinais de hepatotoxicidade aos camundongos C57BL6/J.
- O número total de leucócitos e de eosinófilos não se alterou após os tratamentos em camundongos C57BL6/J.
- A Histidina desenvolve um processo inflamatório leve no tumor enquanto a Cimetidina apresenta moderado infiltrado inflamatório.

### Considerações finais:

O tratamento com histidina nas células B16F10 produziu histamina, porém acredita-se que a histidina participe de outras vias metabólicas intracelulares diferentes da produção de histamina.

Os achados demonstram que a Histidina, Histamina e seus receptores influenciam na progressão do melanoma, sendo inibitório ou estimulante dependendo da dosagem/dias de tratamento, porém os mecanismos de ação envolvidos ainda necessitam de estudos.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABOODY, K. S. *et al.* Targeting of melanoma brain metastases using engineered neural stem/progenitor cells. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 8, n. 2, p. 119-126, 2006.
- ADAMS, W.J., *et al.* Cimetidine preserves non-specific immune function after colonic resection for cancer. **Australian and New Zealand Journal of Surgery**, v. 64, n. 12, p. 847–852, 1994.
- ARDAWI, M. S. M. Hepatic glutamine metabolism in the Septic Rat. **Clinical Science**, v. 82, p. 709-16, 1992.
- BELL, D.J., WILSON, M. W. Choroidal melanoma: natural history and management options. **Cancer Control Journal**, v. 11, n. 5, p. 296-303, 2004.
- BENDER, D. A. **Amino acid metabolism**. New York, 1985.
- BLAYA, B. *et al.* Histamine and histamine receptor antagonists in cancer biology. **Inflammation & Allergy - Drug Targets**, v. 9, n. 3, p. 146-57, 2010.
- BIONDO-SIMÕES, M. L. P., VASCONCELOS, C. N. *et al.* Effect of histamin on liver regeneration: experimental study on rats . **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 15, n. 1, 2000.
- BONGERS, G. *et al.* The Akt/GSK-3 $\beta$  axis as a new signaling pathway of the histamine H(3) receptor. *Journal Of Neurochemistry*, v.103, n. 1, p. 248-58, 2007.
- BORELLI, P. *et al.* Protein-Energy malnutrition halts hemopoietic progenitor cells in the g0/g1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 523-30, 2009.
- BRANDES, L.J. *et al.* Intracellular histamine and liver regeneration: High affinity binding of histamine to chromatin, low affinity binding to matrix, and depletion of a nuclear storage pool following partial hepatectomy. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 2, p. 184, 1992.
- BROWN, M. Staging and prognosis of melanoma. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, n. 16, p. 113-121, 1997.
- CANDIDA, T. *et al.* Evaluation of antitumoral and antimicrobial activity of *Morinda icitrifolia* L. grown in Southeast Brazil. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 29, n. 2, 2014.
- CHAMBERS, A.F.; GROOM, A.C., MACDONALD, I.C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 563-572, 2002.
- CHENG, X. *et al.* Tumor-Specific Delivery of Histidine-Rich Glycoprotein Suppresses Tumor Growth and Metastasis by Anti-angiogenesis and Vessel Normalization. **Current Gene Therapy**, v. 14, n. 2, p. 75-85, 2014.
- CIANCHI, F.; VINCI, M.C.; MASINI, E. Histamine in cancer: The dual faces of the coin. **Cancer Biology & Therapy**, v. 21, p. 36-37, 2008.

COOPER, G. M. A Célula - Uma Abordagem Molecular. **Artmed**. 2ª Ed., p. 633-74, 2001.

CRIADO, P.R. *et al.* Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85; n.2, p. 365-371, 2010.

DAI, W. *et al.* Peptide PHSCNK as an integrin  $\alpha 5 \beta 1$  antagonist targets stealth liposomes to integrin-overexpressing melanoma. **Nanomedicine**, v. 8, n. 7, p. 1152-61, 2012.

DAVIS, S. C. *et al.* Up-regulation of histidine decarboxylase expression and histamine content in B16F10 murine melanoma cells. **Inflammation Research**, v. 60, n.1, p. 55-61, 2011.

DEUSCHLE, U. *et al.* The nuclear bile acid receptor FXR controls the liver derived tumor suppressor Histidine-rich Glycoprotein. **Internacional Journal of Cancer**, 2014.

DOLS, M. *et al.* Specific alterations in the serum amino acid profile of patients with lung cancer and head and neck cancer. **Oncologia**, v. 29, n. 7, p. 283-290, 2006.

DOYLE, A.; GRIFFITHS, J.B. **Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology**. John Wiley & Sons Ltd: Chichester, 1998.

ELDER, J.B.; GANGULI, P. C.; GILLESPIE, I. E. Cimetidine and Gastric Cancer. **The Lancet**, v. 313, n. 8124, p. 1005–1006, 1979.

FALUS, A. *et al.* Paracrine and autocrine interactions in melanoma: histamine is a relevant player in local regulation. **Immunology**, v. 22, p. 648–652, 2001.

FALUS, A. GILICZE, A. Tumor formation and antitumor immunity; the overlooked significance of histamine. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 96, n. 2, p. 225-231, 2014.

FRANÇA, F. D. **Avaliação das linhagens VERO e MDCK na sinalização celular e como alternativas para estudo da nefrotoxicidade utilizando anfotericina B** (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

FRANCIS, H. *et al.* H3 histamine receptor agonist inhibits biliary growth of BDL rats by downregulation of the cAMP-dependent PKA/ERK1/2/ELK-1 pathway. **Laboratory Investigation**, v. 87, n.5, p.473-87, 2007.

FRANCIS, H. *et al.* H3 histamine receptor-mediated activation of protein kinase C alpha inhibits the growth of cholangiocarcinoma in vitro and in vivo. **Molecular Cancer Research**, v. 7, p. 1704-13, 2009.

FRANCIS, H. *et al.* Inhibition of histidine decarboxylase ablates the autocrine tumorigenic effects of histamine in human cholangiocarcinoma. **Gut-British Medical Journal**, v. 61, p. 753–64, 2012.

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

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

GARCIA-CABALLERO, M. *et al.* Increased histidine decarboxylase (HDC) activity in human colorectal cancer: results of a study on ten patients. **Agents Actions**, v. 23, p. 357–60, 1988.

GOUPIL, D.; ÉTHIER, C.; ZARNEGAR, G. Hepatic Expression of Regeneration Marker Genes Following partial Hepatectomy in the Rat. **Journal of Hepatology**, v.26, p. 659-668, 1997.

GRAF, A. *et al.* Knockout of histidine decarboxylase decreases bile duct ligation-induced biliary hyperplasia via downregulation of the histidine decarboxylase/VEGF axis through PKA-ERK1/2 signaling. **American Journal of Physiology**, v. 307, n. 8, 2014.

GRAFF, L. *et al.* Expression of histidine decarboxylase and synthesis of histamine by human small cell lung carcinoma. **American Journal of Pathology**, v. 160, p. 1561-1565, 2002.

GU, J. *et al.* Serum-resistant complex nanoparticles functionalized with imidazole-rich polypeptide for gene delivery to pulmonary metastatic melanoma. **International Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 461, p. 559-69, 2014.

GUNAWAN, S.T. *et al.* Tuning Particle Biodegradation through Polymer-Peptide Blend Composition. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 12, p. 4429-4438, 2014.

GUTOWSKA-OWSIK, D. *et al.* Histamine exerts multiple effects on expression of genes associated with epidermal barrier function. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 24, p. 231–9, 2014.

HAAS-FREUNDSCH, M. *et al.* Histidine decarboxylase expression in human melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, p. 345-352, 2000.

HADLEY, M.E. **Endocrinology**. 4 ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, p. 549, 1996.

HADZIJUSUFOVIC, E. *et al.* H1-receptor antagonists terfenadine and loratadine inhibit spontaneous growth of neoplastic mast cells. *Experimental hematology*, v. 38, n. 10, p. 896-907, 2010.

HALLGREN, J.; GURISH, M.F. Granule maturation in mast cells: histamine in control. **The European Journal of Immunology**, v. 44, n. 1, p. 33-36, 2014.

HAKOMORI, S. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. **Cancer Research**, v. 56, n. 23, p. 5309–5318, 1996.

HOOGDUIJN, M.J. *et al.* Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca<sup>2+</sup>. **Experimental Cell Research**, v. 294, n.1, p. 60-67, 2004.

IDZKO, M. *et al.* Expression and function of histamine receptors in human monocyte-derived dendritic cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 109, p. 839-846, 2002.

INAMI, Y. *et al.* Topical surfactant- induced pruritus: involvement of histamine released from epidermal keratinocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 344, p. 459-466, 2013.

JANSEN, F. P. *et al.* Characterization of the binding of the first selective radiolabeled histamine H<sub>3</sub>-receptor antagonist (<sup>125</sup>I) iodophenpropit to rat brain. **British Journal of Pharmacology**, v. 113, p. 355-362, 1994.

JEMAL, A. *et al.* Cancer statistics, **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 60, n. 5, p. 277-300, 2010.

JESUS, R.P.; WAITZBERG, D.L.; CAMPOS, F.G. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, 2000.

JL, L., *et al.* Induction of Apoptosis and Inhibition of Tumorigenicity and Tumor Growth by Adenovirus Vector-mediated Fragile Histidine Triad (*FHIT*) Gene Overexpression1. **Cancer Research**, v. 59, n. 15, p. 3333–3339, 1999.

JANGI, S.M. *et al.* H1 histamine receptor antagonists induce genotoxic and caspase-2-dependent apoptosis in human melanoma cells. **Carcinogenesis**, v. 27, p. 1787–1796, 2006.

JANGI, S. *et al.* Terfenadine-induced apoptosis in human melanoma cells is mediated through Ca<sup>2+</sup> homeostasis modulation and tyrosine kinase activity, independently of H1 histamine receptors. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 3, p. 500-509, 2008.

JIANGI, C., *et al.* Cimetidine induces apoptosis in gastric cancer cells *in vitro* and inhibits tumor growth *in vivo*. **Oncology Reports**, v. 23, p. 693-700, 2010.

JUTEL, M.; Blaser, K.; Akdis, C.A. Histamine in chronic allergic responses. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 15, p. 1-8, 2005.

KAIDASHEV, I. *et al.* Influence Of H1, H2 And H3 Antagonists On Apoptosis Of Lymphoid Cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, n. 1, p. 178, 2007.

KATO, T. *et al.* Enhanced suppression of tumor growth by combination of angiogenesis inhibitor O-(chloroacetyl-marbamoyl fumginal (TNP- 4700) and cytotoxic agents in mice. **Cancer Research**, p. 5143–7, 1994.

KENNEDY, L. L. *et al.* Inhibition of mast cell-derived histamine secretion by cromolyn sodium treatment decreases biliary hyperplasia in cholestatic rodents. **Laboratory Investigation**, 2014.

KERN, K. A.; NORTON, J. A. Cancer cachexia. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 12, p.286-298, 1988.

KOARAI, A. *et al.* Disruption of L-histidine decarboxylase reduces airway eosinophilia but not hyperresponsiveness, **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 167, p. 758–763, 2003.

KOBAYASHI, K., *et al.* 2000. Cimetidine inhibits cancer cell adhesion to endothelial cells and prevents metastasis by blocking E-selectin expression. **Cancer Research**, v. 60, n. 14, p. 3978–3984, 2000.

KOZLOWSKI JR., V.A.; MATTOS FILHO, T.R. Effect of H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptor antagonists on the serum activity of Gama-glutamyltransferase during Liver regeneration after partial hepatectomy in rats. **Pharmacology**, v. 51, p. 134-136, 1995.

KUBECOVA, M. *et al.* Cimetidine: An anticancer drug? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, p. 439–444, 2011.

LEE, H.J. *et al.* Histamine receptor 2-mediated growth-differentiation factor-15 expression is involved in histamine-induced melanogenesis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, p. 2124-2128, 2012.

LEONARDI, A. *et al.* Histamine Effects on Conjunctival Fibroblasts from Patients with Vernal Conjunctivitis. **Experimental Eye Research**, v. 68, n. 6, p. 739–746, 1999.

LETZIEN, U. *et al.* The antineoplastic effect of carnosine is accompanied by induction of PDK4 and can be mimicked by L-histidine. **Amino Acids**, v. 46, p. 1009–1019, 2014.

LI, R. *et al.* Effects of histamine on proliferation, apoptosis and differentiation of human Keratinocytes. **Journal First Military Medical University**, v. 25, n. 10, 2005.

LIANGOS, O. *et al.* Epidemiology and Outcomes of Acute Renal Failure in Hospitalized Patients: A National Survey. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v.1: p. 43–51, 2006.

LIM, J. Y. *et al.* β-Carotene inhibits neuroblastoma tumorigenesis by regulating cell differentiation and cancer cell stemness. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 450, n. 4, p. 1475–1480, 2014.

LITTLE, J.H. Histology and prognosis of cutaneous melanoma. **Clinical Trials Reporting Program – National Cancer Institute**, v.6, p. 163-176, 1975.

LONGHINI, R. *et al.* Increased apoptosis in osteoclasts and decreased RANKL immunoexpression in periodontium of cimetidine-treated rats. **Journal of Anatomy**, v. 222, n. 2, p. 239-247, 2013.

LUKJANOV, T. K. K. *et al.* Histaminergic neurons protect the developing hippocampus from kaianic acid-induced neuronal damage in an organotypic coculture system. *The Journal of Neuroscience*, v. 26, n. 4, p. 1088-1097, 2006.

LUVISON, A. C. **Modulação fenotípica induzida por guanosina em modelo de melanoma murino.** Dissertação de Mestrado, Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

MACKENZIE, G. G. *et al.* Targeting mitochondrial STAT3 with the novel phospho-valproic acid (MDC-1112) inhibits pancreatic cancer growth in mice. **Plos One**, v. 8, n. 5, 2013.

MAINTZ, L.; NOVAK, N. Histamine and histamine intolerance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, p. 1185-1196, 2007.

MARKS, R. *et al.* Mast cell granules cause proliferation of human microvascular endothelial cells. **Laboratory Investigation**, v. 55, n.3, p. 289-294, 1986.

MÄSIAR, P.J.; MEDEKOVÁ, E. The role of serine and glutamine in the metabolism of malignant bone tumors and their significance in the diagnosis and prognosis of bone tumors. **Neoplasia**, v. 35, p. 197-206, 1988.

MATSUKI, Y. *et al.* Histidine decarboxylase expression as a new sensitive and specific marker for small cell lung carcinoma. **Modern Pathology**, v. 16, p. 72-78, 2003.

McGAHON, A. J. *et al.* The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis *in Vitro*. **Cell Death**, v. 46, n. 9, p. 153-185, 1995.

MEDINA, V. A.; RIVERA, E. S. Histamine receptors and cancer pharmacology. **British Journal of Pharmacology**, v. 161, n. 4, p. 755-767, 2010.

MENEZES, A. S. **Difração Múltipla de Raios-X no estudo das propriedades estruturais da L-histidina hidrocloreídrica monohidratada.** Dissertação (Mestrado) em Física, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MORIARTY, C.M. *et al.* Blood histamine and solid malignant tumors. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 114, n. 6, p. 588–592, 1988.

MORINI G. *et al.* Histamine H<sub>3</sub>-receptor antagonists inhibit gastroprotection by (R) $\alpha$ -methylhistamine in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 129:1597–1600. 2000

MORINI, G. *et al.* Ligands for histamine H<sub>3</sub> receptors modulate cell proliferation and migration in rat oxyntic mucosa. **British Journal of Pharmacology**, v. 137, n. 2, p. 237–244, 2002.

MOURIAUX, F. *et al.* Liver Function Testing Is Not Helpful for Early Diagnosis of Metastatic Uveal Melanoma. **Ophthalmology**, v. 119, n.8, p. 1590-1595, 2012.

MUKHERJEE, S. **O Imperador de Todos os Males: uma Biografia do Câncer**. São Paulo: Companhia das Letras, 2012.

NAKAMURA, D. *et al.* Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. **Life Sciences**, v. 70, p.791-798, 2002.

NATORI, T. *et al.* Cimetidine inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, p. 56–60, 2005.

NAVES, M. M. V. Beta-Caroteno and Câncer. **The Brazilian Journal of Nutrition**, v. 11, n. 2, p. 99-115, 1998.

NAVES, M. M. V.; MORENO, F. S. Diferenciação Celular: Importância na Hepatocarcinogênese e Papel Modulador do  $\beta$ -Caroteno. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 46, n. 4, p. 389-99, 2000.

NCBI Map Viewer. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acessado em: 08/02/2015.

NICOLAU-GALMÉS, F. *et al.* Terfenadine induces apoptosis and autophagy in melanoma cells through ROS-dependent and independent mechanisms. **Apoptosis**, v. 16, n.12, p. 1253-67, 2011.

OHMORI, E. *et al.* Purification and characterization of l-histidine decarboxylase from mouse mastocytoma P-815 cells. **Journal of Biochemistry**, v. 107, p. 834-839, 1990.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes Antineoplásicos Biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 976-984, 2002.

OLIVEIRA FILHO, R. S.; BEVILACQUA, R. G.; CHAMMAS, R. Hyperthermia increases the metastatic potential of murine melanoma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 8, p. 941-945, 1997.

OTALE, A.H. *et al.* Inhibition of angiotensin II receptor 1 limits tumor-associated angiogenesis and attenuates growth of murine melanoma. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 79-87, 2010.

OZOLS, R.F. *et al.* Clinical cancer advances 2006: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening - a report from the American Society of Clinical Oncology. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, p. 146-162, 2007.

PANTEL, K.; BRAKENHOFF, R.H. Dissecting the metastatic cascade. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 6, p. 448-456, 2004.

PETER, I. *et al.* Comparative analysis of immunocritical melanoma markers in the mouse melanoma cell lines B16, K1735 and S91-M3. **Melanoma Research**, v. 11, p. 21-30, 2001.

PEREIRA, J. *et al.* Papel da célula endotelial em neoplasias malignas hematológicas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 3, p. 223-228, 2008.

PHILLIPS, N.C. *et al.* Clinical evaluation of liposomal tumor antigen vaccines in patients with stage-III melanoma. **Cancer Detection and Prevention**, v. 14, p. 491-496, 1990.

PINTO, A. L. N. **Anti-histamínicos H3: Uma nova classe terapêutica**. Dissertação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

PLOWMAN, J. *et al.* Human tumor xenograft models in NCI development. In: TEICHER, B.A., ANDREWS, P. A. **Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical trials and approval**, 1997.

PONTES, L. B. *et al.* Prevalência de insuficiência renal em pacientes idosos com câncer em um centro de tratamento oncológico. **Einstein**, v. 12, n. 3, p. 300-303, 2014.

PÓS, Z. *et al.* Phenotypic Profiling of Engineered Mouse Melanomas with Manipulated Histamine Production Identifies Histamine H<sub>2</sub> Receptor and rho-C as Histamine-Regulated Melanoma Progression Markers. **Cancer Research**, v. 65, n.10, p. 4458-4466, 2005.

PRADO, S. R. T. **Efeitos de imidas cíclicas sobre o metabolismo mitocondrial e atividade antimelanoma**. Tese (Doutorado), Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

PREVIATI, M. *et al.* Determination of histamine in the whole blood of colon cancer patients. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies Biomedical**, v. 780, p. 331–339, 2002.

RAN, L. *et al.* Effects of histamine on proliferation, apoptosis and differentiation of human keratinocytes. **Journal First Military Medical University**, v. 25, n. 10, p. 1286-1289, 2005.

REYNOLDS, J.L.; AKHTER, J.; MORRIS, D.L. *In vitro* effect of histamine and histamine H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptor antagonists on cellular proliferation of human malignant melanoma cell lines. **Melanoma Research**, v. 6, p. 95–99, 1996.

RIVERA, E. *et al.* Histamine regulation of tumour growth. Role of H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptors. In.: GARCIA-CABALLERO, M. *et al.* Histamine in normal and cancer cell proliferation. **Advances in the Biosciences**, v. 89, p. 299-317, 1993.

RUMJANEK, V. M., *et al.* A. Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.73, n.1, p.57-69, 2001.

RUSCIANO, D.; LORENZONI, P.; BURGER, M. Murine models of liver metastasis. **Invasion Metastasis**, v. 14, p. 349-361, 1994.

SHAHID, M. *et al.* **Biomedical Aspects of Histamine Current Perspectives**. Springer, 2010.

SCHNEIDER, E. *et al.* Mast cells and their committed precursors are not required for interleukin-3 - induced histamine synthesis in murine bone marrow: characteristics of histamine-producing cells. **Blood**, v. 81, n. 5, p. 1161-1169, 1993.

SCHUCHTER, L.M. Review of the AJCC staging system for cutaneous malignant melanoma. **Current Oncology Reports**, v. 3, p. 332-337, 2001.

SCOTT, R.E. Differentiation/gene therapy and cancer. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 73, p. 51-65, 1997.

SIGMA-ALDRICH CO. Disponível em: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) Acessado em: 07/02/2015.

SHIELDS, C.L., SHIELDS, J.A. Ocular melanoma: relatively rare but requiring respect. **Clinics in Dermatology**, v. 27, n. 1, p.122–33, 2009.

SIMONS, F.E. Advances in H1-antihistamines. **The New England Journal of Medicine**, v, 351, p. 2203–2217, 2004.

SMOLLE, J. HOFMANN-WELLENHOF, R., FINK-PUCHES, R. Melanoma and stroma: an interaction of biological and prognostic importance. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 15, p. 326-335, 1996.

STEEG, P. S. *et al.* Histidine kinases and histidine phosphorylated proteins in mammalian cell biology, signal transduction and cancer. **Cancer Letters**, v. 190, n. 1, p. 1–12, 2003.

TADA, H. *et al.* An improved colorimetric assay for interleukin 2. **Journal of Immunological Methods**, v. 93, n.2, p. 157–165, 1986.

TAKADA, A. *et al.*, Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis-A and sialyl Lewis-X to adhesion of human cancer-cells to vascular endothelium. **Cancer Research**, v. 53, n. 2, p. 354–361, 1993.

TAKANO, H. *et al.* Establishment of the culture model system that reflects the process of terminal differentiation of connective tissue-type mast cells. **FEBS Letters**, v. 582, p. 1444–1450, 2008.

TANG, N. H. *et al.* Cooperative inhibitory effects of antisense oligonucleotide of cell adhesion molecules and cimetidine on cancer cell adhesion. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 1, p. 62-66, 2004.

TANIMOTO, A. *et al.* Histidine decarboxylase expression in pancreatic endocrine cells and related tumors. **Pathology International**, v. 54, p. 408-412, 2004.

TARLÁ, M. R. *et al.* Aspectos celulares da regeneração hepática. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 1, 2006.

TETLOW, L.C.; WOOLLEY, D.E.: Immuno localisation of histamine and histidine decarboxylase in chondrocytes of arthritic cartilage. **Inflammation Research**, v. 53, n. 1, p. 21-22, 2004.

TILLY, B.C. *et al.* Histamine as a Growth Factor and Chemoattractant for Human Carcinoma and Melanoma Cells: Action through  $Ca^{2+}$ -Mobilizing. **The Journal of Cell Biology**, v. 110, p. 1211-1215, 1990.

TOMITA, K., IZUMI, K.; OKABE, S., Roxatidine- and Cimetidine-Induced Angiogenesis Inhibition Suppresses Growth of Colon Cancer Implants in Syngeneic Mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 93, p. 321–330, 2003.

TOMITA, K.; NAKAMURA, E., OKABE, S. Histamine regulates growth of malignant melanoma implants via H2 receptors in mice. **Inflammopharmacology Journal**, v. 13, n.3, p. 281-289, 2005.

TUGUES, S. *et al.* Histidine-Rich Glycoprotein Uptake and Turnover Is Mediated by Mononuclear Phagocytes. **Plos One**, v. 9, n. 9, 2014.

TURK, B.; TURK, V. Lysosomes as “suicide bags” in cell death: myth or reality? **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n.33, p. 21783–21787, 2009.

UÇAR, K. The effects of histamine h2 receptor antagonists on melanogenesis and cellular proliferation in melanoma cells in culture **BIOCHEMICAL AND Biophysical Research Communications**, v. 177, n. 1, p. 545-550, 1991.

VALENT, P. *et al.* **Diagnosis and classification of mast cell proliferative disorders:** delineation from immunologic diseases and non-mast cell hematopoietic neoplasms. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, p. 3-12, 2004.

VAN, V. D. L. T. M.; PRINSEN, I. M.; JANSEN, G. H. Growth of cultured human glioma tumour cells can be regulated with histamine and histamine antagonists. **British Journal of Cancer**, v. 68, p.475–483, 1993.

VAN KEMPEN, L.C.L., VAN MUIJEN, G. N. P., RUITER, D. J. Stromal responses in human primary melanoma of the skin. **Bioscience**, v. 10, p. 2922-2931, 2005.

VARKI, A., Selectin Ligands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 16, p. 7390–7397, 1994.

WADE, T.R.; WHITE JR., C.R. The histology of malignant melanoma. **Medical Clinics of North America**, v. 70, p. 57-70, 1986.

WANG, W.T. *et al.* Terfenadine induces anti-proliferative and apoptotic activities in human hormone-refractory prostate cancer through histamine receptor-independent Mcl-1 cleavage and Bak up-regulation. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology Journal**, v. 387, n. 1, p. 33-45, 2014.

WANG, L. *et al.* Breast metastasis from lung cancer: a report of two cases and literature review. **Cancer Biology and Medicine**, v. 11, n. 3, p. 208-15, 2014.

WANG, X. 1H NMR Metabolomics Study of Metastatic Melanoma in C57BL/6J Mouse Spleen. **Metabolomics**, v. 10, n. 6, p. 1129-1144, 2014.

WATANABE, S.; KANDA, N. Histamine inhibits the production of interferon-induced protein of 10 kDa in human squamous cell carcinoma and melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 119, n. 6, p. 1411-1419, 2002.

WELAGE, L.S.. Overview of pharmacologic agents for acid suppression in critically ill patients. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 62, n. 2, p. 4-10, 2005.

WELCH, D.R. Technical considerations for studying cancer metastasis *in vivo*. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 15, p. 272-306, 1997.

WHITEHEAD, R.J. *et al.* Demonstration of histamine H2 receptors on human melanoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 151, p. 518-523, 1988.

YAMAGUCHI, T. *et al.* Effect of Glutamine or Glucagon-Insulin Enriched Total Parenteral Nutrition on Liver and gut in 70 % Hepatectomized Rats. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 185, p. 156-162, 1997.

YOSHIDA, S. *et al.* Effect of Glutamine Supplement and Hepatectomy on DNA and Protein Synthesis in the Remnant Liver. **Journal of Surgical Research**, v. 59, p. 475-481, 1995.

ZHAO, X. *et al.* Protein kinase C alpha plays a critical role in mannosylerythritol lipid-induced differentiation of melanoma B16 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, 2001.

ZHENG, Y. *et al.* Cimetidine suppresses lung tumor growth in mice through proapoptosis of myeloid-derived suppressor cells. **Molecular Immunology**, v. 54, n. 1, p. 74-83, 2013.

ZOLTAN, P. *et al.* Phenothyc Profiling of Engineered Mouse Melanomas with manipulated Histamine Production Identifies Histamine H2 Receptor and rho-C as Histamine-Regulated Melanoma Progression Markers. **Cancer Research**, v. 65, n. 10, p. 4458-4466, 2005.

## 8 ANEXO

**UEPG**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL****CARTA DE APROVAÇÃO****Processo CEUA – 002/2014**

Protocolo UEPG – 765/2014

**Título** – " Efeito da histidina livre e encapsulada na progressão e diferenciação celular em melanoma".  
**Interessado** – *Prof. Dr. Giovani Marino Favero***Data de Entrada** – 20/02/2014**Resultado:** Aprovado**Data/Prazo** – 29/01/2014 a 29/01/2016**Considerações**

Prezado Professor,

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação pela aprovação, por dois anos, do uso de 30 (trinta) camundongos.

- APROVADO.

Atenciosamente,



Professora Drª Mara Marta Loddi  
Coordenadora Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas  
Ponta Grossa – Paraná  
Bloco da Reitoria - anexo a PROESP  
Fone: (042) 3220-3264