

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

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL E DO COMPORTAMENTO ANIMAL
COM O USO DE PROPRANOLOL EM UM MODELO DE MELANOMA MURINO**

PONTA GROSSA

2020

JULIANA BERTON

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL E DO COMPORTAMENTO ANIMAL
COM O USO DE PROPRANOLOL EM UM MODELO DE MELANOMA MURINO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa em Associação Ampla com Universidade Estadual do Centro-Oeste.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Favero
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro

PONTA GROSSA

2020

B546 Berton, Juliana
Avaliação do crescimento tumoral e do comportamento animal com o uso de propranolol em um modelo de melanoma murino / Juliana Berton. Ponta Grossa, 2020.
88 f.

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

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Favero.

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro.

1. Melanoma. 2. Propranolol. 3. Comportamento. I. Favero, Giovani Marino. II. Ferro, Marcelo Machado. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 615.321



Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Programa de
Pós-Graduação em

Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a

Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa



Ponta Grossa, 27 de agosto de 2020.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 05/2020 DA DOUTORANDA JULIANA BERTON REALIZADA NO DIA 27 DE AGOSTO DE 2020, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e sete dias de agosto de dois mil e vinte, às 9:00h00min, via videoconferência, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência do Professor Doutor Giovani Marino Favero reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da doutoranda Juliana Berton, na linha de pesquisa: Avaliação clínico/laboratorial de processos fisiopatológicos, constituída pelo Professor Doutor Giovani Marino Favero (UEPG/PR) e demais Doutores (membros titulares): Leandro Cavalcante Lipinski (UEPG/PR), José Fabiano Justus (UEPG/PR), Carlos Alexandre Molena Fernandes (UNESPAR/PR) e Juliana Bonametti Olivato (UEPG/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

O título do trabalho foi: **“AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL E DO COMPORTAMENTO ANIMAL COM O USO DE PROPRANOLOL E AS CONSEQUÊNCIAS SOBRE A PRODUÇÃO DE CATECOLAMINAS EM UM MODELO DE MELANOMA MURINO”.**

Encerrada a defesa, a banca pronunciou-se APROVADA a tese, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da tese de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Pró – Reitoria de Pesquisa e Pós- Graduação

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fármacos, medicamentos e bio-ciências aplicadas à Farmácia – Fone (42) 3220-3337 – ppgcf@hotmail.com

Av. Carlos Cavalcanti, 4748 – Ponta Grossa – Paraná – Brasil – CEP: 84030-900



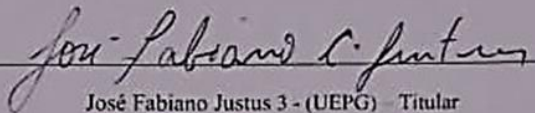
Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Programa de
Pós-Graduação em

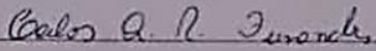
Ciências Farmacêuticas

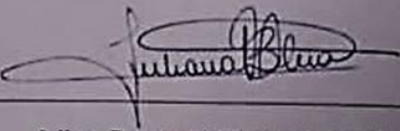
Associação Ampla entre a

Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa




José Fabiano Justus 3 - (UEPG) – Titular


Carlos Alexandre Molena Fernandes 4 - (UNESPAR) – Titular


Juliana Bonametti Olivato 5 - (UEPG) – Titular

Pró – Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fármacos, medicamentos e biotecnologias aplicadas à Farmácia – Fone (42)
3220-3337 – ppgc@hotmail.com

Av. Carlos Cavalcanti, 4748 – Ponta Grossa – Paraná – Brasil – CEP: 84030-900



Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Programa de
Pós-Graduação em

Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a

Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa



Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim ☒ não ☐

Novo título: AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL E DO
COMPORTAMENTO ANIMAL COM O USO DO PROPRANOLOL EM
UM MODELO DE MELANOMA MURINO

Giovanni Marino Favero 1 - (UEPG) Presidente

Leandro Cavalcante Lipinski 2 - (UEPG) - Titular

Pró - Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fármacos, medicamentos e biotecnologias aplicadas à Farmácia - Fone (42)
3220-3337 - ppgcf@hotmail.com

Av. Carlos Cavalcanti, 4748 - Ponta Grossa - Paraná - Brasil - CEP: 84030-900

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. Marcelo Machado Ferro**, por sua prontidão e disponibilidade.

Ao professor **Dr. Fabio André**, por sua boa vontade sempre que foi solicitado.

À professora **Dra. Kátia Sabrina Paludo**, pela colaboração no andamento dos experimentos.

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

Aos membros da banca de defesa, **Dr. José Fabiano Costa Justus, e Dra. Juliana Olivato, Dr. Luis Mascarenhas e Dr. Carlos Molena Fernandes** pelo aceite e disponibilidade.

À aluna e amiga **Nadja Pereira Santos** pelo auxílio nos experimentos e materiais.

À colega e amiga **Tamara Nascimento Ferreira**, pelo auxílio nos experimentos.

À **Maria** por ajudar com os cortes histológicos.

À **Marilene** que cuidou dos camundongos com dedicação.

Aos demais colegas de turma, pela companhia e amizade.

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

À minha amiga e 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.

"Foi o tempo que dedicaste à
tua rosa que a fez tão importante".

Antonie de Saint-Exupéry

BERTON, J. **Avaliação do crescimento tumoral e do comportamento animal com o uso de propranolol em um modelo de melanoma murino.** Orientador: Giovani Marino Favero. Ponta Grossa, 2020. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2020.

RESUMO

Através da via da tirosinase são originadas a melanina e as catecolaminas, ambas em desordem no melanoma. As catecolaminas, de ação no sistema nervoso simpático, funcionam naturalmente como neurotransmissores ou hormônios e vem sendo relacionadas à progressão do tumor e alterações psicológicas e comportamentais. Neste sentido, o propósito desse trabalho foi avaliar o uso do β -bloqueador propranolol na progressão do tumor e em alterações comportamentais como ansiedade e depressão em melanoma murino. O ensaio *in vitro* de viabilidade celular MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 difeniltetrazóliobrometo) foi realizado com propranolol nas concentrações 0,01; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10 mM e avaliados após 24, 48 e 72 horas utilizando-se células B16F10. Para o ensaio *in vivo* foram utilizados camundongos C57BL6/J, submetidos ao implante de células tumorais e posteriormente tratados e avaliados por 20 dias quanto ao crescimento tumoral com determinação do volume. A região da substância nigra foi avaliada através de cortes histológicos. Os grupos foram compostos por camundongos sadios controle e tratados com solução oral de propranolol nas doses de 10 e 40 mg/kg/dia e camundongos portadores de melanoma controle e tratados com solução oral de propranolol nas doses de 10 e 40 mg/kg/dia. Durante o tempo de tratamento foram realizados os testes comportamentais de campo aberto, nado forçado, labirinto em cruz elevado e teste de esconder esferas em tumor inicial e em tumor consolidado. Como resultados no teste de viabilidade MTT, o propranolol diminuiu a viabilidade celular nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 mM em 24, 48 e 72 horas. Na experimentação *in vivo* o tratamento com propranolol diminuiu o crescimento tumoral na dose de 40 mg/kg/dia em 15 dias de tratamento. O teste de campo aberto não apresentou diferença no tempo 1 e houve redução da locomoção no tempo 2 nos grupos propranolol tratados com 10 e 40 mg e no grupo portador de melanoma 40 mg, quando comparados ao controle sadio. Os testes labirinto em cruz elevado e teste de esconder esferas não apresentaram diferença estatística em nenhum dos tempos avaliados. O teste de nado forçado apresentou diferença estatística no tempo de natação dos grupos portador de melanoma 40 mg e grupos sadios tratados com propranolol 10 mg e 40 mg e no comportamento de imobilidade todos os grupos ficaram mais tempo imóveis que o controle sadio em tempo 1. Concluiu-se que o propranolol pode ter um papel importante na progressão tumoral devido a citotoxicidade *in vitro* e inibitório para o crescimento tumoral medido *in vivo* e nos testes comportamentais o propranolol proporcionou efeito depressivo no nado, não sendo eficaz como ansiolítico ou antidepressivo e alterou de forma discreta a motilidade em testes no tempo 2 dificultando a diferenciação de um efeito na locomoção. Não houve diferença entre os grupos na região da substância nigra.

Palavras-chave: melanoma, propranolol, comportamento

BERTON, J. **Evaluation of tumor growth and animal behavior using propranolol in a murine melanoma model.** Supervisor: Paulo Vitor Farago. Ponta Grossa, 2020. Thesis (PhD in Pharmaceutical Sciences) – State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2020.

ABSTRACT

Through the tyrosinase pathway, melanin and catecholamines originate, both in melanoma disorder. Catecholamines, which act on the sympathetic nervous system, function naturally as neurotransmitters or hormones and have been linked to tumor progression and psychological and behavioral changes. In this sense, the purpose of this work was to evaluate the use of the β -blocker propranolol in tumor progression and in behavioral changes such as anxiety and depression in murine melanoma. The *in vitro* MTT cell viability assay (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5 diphenyltetrazolium bromide) was performed with propranolol in concentrations 0.01, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10 mM and evaluated after 24, 48 and 72 hours using B16F10 cells. For the *in vivo* test, C57BL6/J mice were used, submitted to the implantation of tumor cells and subsequently treated and evaluated for 20 days for tumor growth with volume determination. The groups were composed of healthy control mice and treated with oral solution of propranolol at doses of 10 and 40 mg/kg/day and mice with control melanoma and treated with oral solution of propranolol at doses of 10 and 40 mg/kg/day. During the treatment period, behavioral tests of open field, forced swimming, elevated plus maze and test of hiding spheres in initial tumor and in consolidated tumor were performed. As a result of the MTT viability test, propranolol decreased cell viability at concentrations of 0.3, 1.0, 3.0, 10 mM in 24, 48 and 72 hours. In the *in vivo* experimentation, treatment with propranolol decreased tumor growth at a dose of 40 mg/kg/day in 15 days of treatment. The open field test showed no difference in time 1 and there was a reduction in locomotion in time 2 in the propranolol groups treated with 10 and 40 mg and in the group with melanoma 40 mg, when compared to the healthy control. The elevated plus-maze tests and the marble-burying test showed no statistical difference in any of the evaluated times. The forced swim test showed a statistical difference in the swimming time of the groups with melanoma 40 mg and healthy groups treated with propranolol 10 mg and 40 mg and in immobility behavior all groups remained immobile longer than the healthy control in time 1. It was concluded that propranolol may have an important role in tumor progression due to *in vitro* cytotoxicity and inhibitory to tumor growth measured *in vivo* and in behavioral tests propranolol provided a depressive effect on the swim, not being effective as an anxiolytic or antidepressant and altered accordingly discrete form motility in tests over time 2 making it difficult to differentiate an effect on locomotion.

Key-words: melanoma, propranolol, behavior

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 1	Desenho do Protocolo Experimental para experimentação <i>in vivo</i> ...	37
FIGURA 1	Caixa para Campo Aberto (Open-Field) com camundongo C56BL6/J na periferia.....	38
FIGURA 2	Recipientes do Teste Nado Forçado	39
FIGURA 3	Labirinto em Cruz Elevado com suporte de Elevação em vista superior.....	40
FIGURA 4	Caixa para Teste de Esconder Esferas com distribuição das esferas e camundongo C57BL6J	41
FIGURA 5	Teste de viabilidade MTT com células B16F10 após 24, 48 e 72 horas de tratamento utilizando propranolol.....	44
FIGURA 6	Avaliação do volume tumoral após tratamento com propranolol.....	45
FIGURA 7	Número de cruzamentos totais no Campo Aberto (Tempo 1).....	46
FIGURA 8	Tempo de permanência no centro no Campo Aberto (Tempo 1).....	47
FIGURA 19	Tempo de imobilidade no pré-teste do Nado Forçado (Tempo 1)....	48
FIGURA 10	Tempo de natação no pré-teste Nado Forçado (Tempo 1).....	49
FIGURA 11	Tempo de escalada no pré-teste do Nado Forçado (Tempo 1).....	50
FIGURA 12	Tempo de imobilidade no teste do Nado Forçado (Tempo 1).....	50
FIGURA 13	Tempo de natação no teste Nado Forçado (Tempo 1).....	51
FIGURA 14	Tempo de escalada no teste do Nado Forçado (Tempo 1).....	52
FIGURA 15	Tempo gasto nos braços abertos no Labirinto em Cruz Elevado (Tempo 1).....	52
FIGURA 16	Tempo gasto nos braços fechados no Labirinto em Cruz Elevado (Tempo 1).....	53
FIGURA 17	Número de entradas nos braços fechados no Labirinto em Cruz Elevado (Tempo 1)	54
FIGURA 18	Comportamento no teste de Esconder Esferas (Tempo 1).....	55
FIGURA 19	Número de cruzamentos totais em teste campo aberto (Tempo 2)...	56
FIGURA 20	Tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado (Tempo 2).....	58
FIGURA 21	Tempo de natação no Teste Nado Forçado (Tempo 2).....	59

FIGURA 22	Tempo de escalada no Teste do Nado Forçado (Tempo 2).....	59
FIGURA 23	Tempo gasto nos braços abertos no Labirinto em Cruz Elevado (Tempo 2).....	60
FIGURA 24	Tempo gasto nos braços fechados no Labirinto em Cruz Elevado (Tempo 2).....	61
FIGURA 25	Número de entradas nos braços fechados no Labirinto em Cruz Elevado (Tempo 2).....	62
FIGURA 26	Número de esferas escondidas no teste de esconder esferas (Tempo 2).....	62
FIGURA 27	Micrografias de cortes histológicos dos camundongos C57BL6/J....	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Atividade locomotora no na periferia do campo aberto (Tempo 1).....	47
TABELA 2	Tempo de Levantar no campo aberto (Tempo 1).....	48
TABELA 3	Número de entradas nos braços abertos no labirinto em cruz elevado (Tempo 1).....	54
TABELA 4	Número de cruzamentos no centro no labirinto em cruz elevado (Tempo 1).....	54
TABELA 5	Atividade locomotora no centro do campo aberto (Tempo 2).....	56
TABELA 6	Atividade locomotora na periferia do campo aberto (Tempo 2).....	57
TABELA 7	Tempo de levantar no campo aberto (Tempo 2).....	57
TABELA 8	Número de cruzamentos no centro do campo aberto (Tempo 2).....	57
TABELA 9	Número de entradas nos braços abertos no labirinto em cruz elevado (Tempo 2).....	60
TABELA 10	Número de cruzamentos no centro no labirinto em cruz elevado (Tempo 2).....	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS

α -adrenérgico	Receptor alpha adrenérgico
α -adrenérgico 2	Receptor alpha adrenérgico 2
β -adrenérgico	Receptor beta adrenérgico
β -bloqueadores	Fármaco beta-bloqueador adrenérgico
β -1	Receptor beta adrenérgico 1
β -2	Receptor beta adrenérgico 2
β -3	Receptor beta adrenérgico 3
β AR	Receptor beta adrenérgico
B16	Linhagem celular de melanoma murino
B16F10	Linhagem celular de melanoma murino
A375	Linhagem celular de melanoma humano
Anti-PD-1	Anticorpo da proteína de morte celular programada 1
ATCC	American Type Culture Collection
B16F10	Linhagem celular de melanoma murino
CA	Campo Aberto
CO2	Dióxido de Carbono
C57BL6/J	Camundongos isogênicos
C57BL6/10	Camundongos isogênicos
DOPA	Diidroxifenilalanina
DNA	Desoxiribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FDA	Food and Drug Administration
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
L-DOPA	Levodopa
MELAN	Grupo Portador de Melanoma
Mel-CLS3	Linhagem celular de melanoma humano
Mewo	Linhagem celular de melanoma humano
MITF	Fator de Transcrição associado à Microftalmia
MMIC	Células iniciadoras do melanoma maligno
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 difeniltetrazóliobrometo
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RPMI	Meio de cultivo celular (Roswell Park Memorial Institute)
SADIO	Grupo Sadio
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SK-MEL 23	Linhagem celular de melanoma humano
STAP-2	Proteína adaptadora 2 de transdução de sinal
TEE	Teste de Esconder Esferas

TNF	Teste de Nado Forçado
TRP I	Proteína 1 relacionada à tirosinase
TRP II	Proteína 2 relacionada à tirosinase
Tyrp 1	Proteína 1 relacionada à tirosinase
Tyrp 2	Proteína 2 relacionada à tirosinase
TYRO-3	Receptor de proteína tirosina-quinase 3
UV	Radiação Ultravioleta
VEG	Fator de Crescimento Vascular Endothelial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 MELANOMA.....	19
2.2 PROPRANOLOL.....	22
2.3 COMPORTAMENTO	26
2.4 CATECOLAMINAS.....	29
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 GERAL.....	33
3.2 ESPECÍFICOS.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 CULTURA DA LINHAGEM B16F10.....	34
4.2 ENSAIO DE MTT.....	34
4.3 LINHAGEM DE CAMUNDONGOS.....	34
4.4 INDUÇÃO DO MELANOMA.....	34
4.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	36
4.6 PARÂMETROS MACROSCÓPICOS DO CRESCIMENTO TUMORAL.....	37
4.7 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	37
4.7.1 Campo Aberto.....	38
4.7.2 Teste Nado Forçado	39
4.7.3 Labirinto em Cruz Elevado.....	40
4.7.4 Teste de Esconder Esferas.....	41
4.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	43
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5 RESULTADOS.....	44
5.1 EXPERIMENTAÇÃO CELULAR.....	44
5.1.1 Avaliação da Viabilidade Celular em Linhagem B16F10	44
5.2 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	46
5.2.1 Avaliação do Volume Tumoral.....	46
5.2.2 Avaliação dos Testes Comportamentais no Tempo 1.....	47

5.2.2.1 Avaliação da atividade locomotora no Campo Aberto.....	47
5.2.2.2 Avaliação do comportamento animal no Nado Forçado.....	49
5.2.2.2.1 Pré-teste Nado Forçado.....	49
5.2.2.2.2 Teste Nado Forçado.....	51
5.2.3 Avaliação do comportamento no Labirinto em Cruz Elevado.....	53
5.2.4 Avaliação do comportamento no Teste de Esconder Esferas.....	56
5.2.5 Avaliação dos testes comportamentais no Tempo 2	56
5.2.5.1 Avaliação da atividade locomotora no Campo Aberto.....	56
5.2.5.2 Avaliação do comportamento animal no Nado Forçado.....	59
5.2.5.2.1 Tempo de Imobilidade	59
5.2.5.2.2 Tempo de Natação	59
5.2.5.2.3 Tempo de Escalada.....	60
5.2.6 Avaliação do comportamento no Labirinto em Cruz Elevado.....	61
5.2.7 Avaliação do comportamento no Teste de Esconder Esferas.....	63
5.3 Análise Histológica.....	64
6 DISCUSSÃO.....	65
7 CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO CEUA.....	88

INTRODUÇÃO

O melanoma é o mais agressivo câncer de pele e considerado problema de saúde pública mundial (GARCIA *et al.*, 2019) que aumentou nas últimas décadas e causa 80% das mortes por câncer de pele. Considerado resistente à maioria das terapias existentes, possui mau prognóstico para o paciente e, por isso, é crucial a sua investigação (PALUNCIC *et al.*, 2016).

A origem do melanoma está nos melanócitos. Estas células estão sempre em íntimo contato físico e funcional com outras células epidérmicas, realizando a secreção de várias citocinas (ESPARZA *et al.*, 1997). Nos melanócitos estão os melanossomas, que contêm o pigmento melanina. A síntese da melanina começa com oxidação enzimática de L-tirosina à levodopa e oxidação de levodopa à dopaquinona (OLIVEIRA; JUNIOR, 2003), sendo uma via comum existente entre a produção das melanoproteínas e a produção das catecolaminas.

Em melanoma, a noradrenalina favorece a expressão dos genes de IL-6, IL-8, VEGF e receptores β -adrenérgicos em estudos com linhagens de células humanas (KAO; LUU, 2019). Os receptores β -1 e β -2 adrenérgicos foram encontrados em células melanocíticas de nevos benignos, em nevos atípicos e em melanomas malignos, sendo que em linhagens de células de melanoma a expressão foi maior (MORETTI *et al.*, 2013).

Em virtude da sua anaplasia, o melanoma pode secretar diversas catecolaminas, sendo possível ocorrer um aumento das respostas simpáticas pelo organismo, resultando em outras patologias associadas ao câncer como insuficiência renal, hipertensão e distúrbios psíquicos.

Indivíduos com câncer são suscetíveis à depressão e déficit cognitivo. A avaliação do quadro ansioso ou depressivo baseia-se na aplicação de modelos comportamentais, que avaliam a reatividade emocional do animal, nos quais apresentam comportamentos de exploração do ambiente ou podem apresentar aversão e esquiva (KALUEFF; WHEATON; MURPHY, 2007). Em estudo com modelo animal com tumor periférico induzido, foram relatadas alterações comportamentais, mas, os mecanismos exatos não estão elucidados (YANG *et al.*, 2014). O estresse também pode atuar como um co-fator para a iniciação e progressão do câncer, podendo a catecolamina epinefrina estar envolvida neste processo, sendo relacionada à angiogênese e metástase (YANG *et al.*, 2010).

A investigação sobre as intervenções com componentes de ativação simpática, ou a utilização de agentes β -bloqueadores, podem representar novas estratégias para retardar a

progressão da doença maligna e auxiliar na qualidade de vida dos doentes com câncer (YANG *et al.*, 2010). Recentemente, estudos apresentam resultados contrastantes acerca da eficácia de β -bloqueadores na progressão do melanoma, não sendo fácil a compreensão das discrepâncias entre resultados (WROBEL; LE GAL, 2015).

Desta forma, o presente estudo propõe a avaliação do propranolol, na progressão tumoral e produção de catecolaminas, bem como a avaliação do comportamento animal, como forma de diminuir a progressão tumoral e minimizar os possíveis distúrbios psíquicos nos portadores de melanoma, dentre eles ansiedade e depressão. Ainda não está elucidado até que ponto o melanoma afeta a qualidade de vida dos portadores e se experimentam sofrimentos psicológicos (BEUTEL *et al.*, 2015).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MELANOMA

O melanoma cutâneo é uma neoplasia letal e altamente invasiva; é considerado o câncer de pele mais agressivo, embora não tenha alta incidência quando comparado aos outros cânceres, é um problema de saúde pública (JEMAL *et al.*, 2010). Nos últimos 40 anos a incidência do melanoma tem aumentado cerca de 3 a 8% ao ano em todo mundo (ŠITUM *et al.*, 2014). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, anualmente são registrados de 2 a 3 milhões de casos de câncer de pele não-melanomas e desses, são 132 mil casos de melanoma maligno.

O rápido crescimento em conjunto com a produção aumentada de melanina faz o melanoma manifestar-se, habitualmente, como uma pinta escura (marrom ou negra) de bordas assimétricas, sendo acompanhadas de coceira e descamação (SCHUCHTER, 2001). Origina-se nos melanócitos e destaca-se por sua agressividade, proliferação celular rápida, metástases precoces e prognóstico silencioso (MERVIC, 2012). Nos homens, localiza-se preferencialmente em ombros e costas e nas mulheres em extremidades inferiores, sendo diagnosticado anteriormente por volta dos 50 anos, e mais recentemente (última década) entre 25 e 40 anos e muito raramente na infância (ŠITUM *et al.*, 2014). O melanoma nodular, especificamente, pode adquirir diferentes colorações, como escura, castanha, multicolorida ou não apresentar coloração (ERLIC; FISCHER, 2018).

Com o aprofundamento nos estudos sobre o melanoma, foi possível perceber que ele pode ser classificado de acordo com alguns critérios como: estágio da doença, localização anatômica, lesão primária, expressão de oncogenes e presença de biomarcadores; isso favoreceu as abordagens específicas para cada critério que trazem avanços na história da doença (FLAHERTY; HODI; FISHER, 2012).

A principal forma de tratamento para o melanoma cutâneo é cirúrgica, com ressecção da lesão e várias vezes com dissecação do linfonodo. Como adjuvantes ao tratamento podem ser utilizadas a quimioterapia, a radioterapia e a imunoterapia, porém pouco satisfatórias e com muitos efeitos colaterais (PIRES, 2017). Mesmo após a retirada cirúrgica, os pacientes podem apresentar metástases distantes que definem o mau prognóstico de mais 5 anos de vida em média para esses pacientes (WEINSTEIN *et al.*, 2014).

A etiologia do melanoma é multifatorial, sendo o fator genético muito importante e os fatores de risco adicionais são: exposição solar e luz ultravioleta em excesso, peles de cor clara

(embora ocorram também em peles escuras); e ainda, têm sido relatada a incidência aumentada em imunodeprimidos e pacientes com altos níveis de estresse no trabalho (SINNYA & DE'AMBROSIS, 2013). Os casos relacionados à hereditariedade, representam 5 a 10 % do total dos registros (ERLICH; FISCHER, 2018).

O melanoma maligno origina-se nos melanócitos que passam a ser células cancerosas depois de alterações bioquímicas e moleculares. Os precursores dos melanócitos são células que se originam da crista neural e no período de desenvolvimento embrionário se diferenciam em melanoblastos, após migração para a derme e, posteriormente, em melanócitos na epiderme. (WALKER; HAYWARD, 2002). Os melanócitos têm a função de produzir melanina (eumelanina e feomelanina), pigmentos que protegem a célula de danos ao DNA devido à radiação ultravioleta (UV) proveniente da luz solar. A síntese da melanina tem sua regulação realizada por muitos agentes, incluindo hormônios (BOURNEUF, 2017), sendo que a melanogênese reflete no comportamento do melanoma e na resposta aos tratamentos (SLOMINSKI *et al.*, 2004).

Quando a célula é exposta à radiação UV, a melanina migra dos melanócitos aos queratinócitos, que são as células que controlam o crescimento dos melanócitos e a liberação da melanina, quando há perda de controle desse processo é que surge a hipótese da ocorrência do melanoma, inclusive com a possibilidade de saída dos queratinócitos da pele para outros órgãos (FAIÃO-FLORES; SMALLEY, 2018).

Com relação ao potencial de desencadear metástases, o melanoma é altamente capaz, estando esse fato envolvido na maioria das mortes por câncer de pele. (LEE; BARTHEL; SCHATTON, 2014). As neoplasias primárias que mais constantemente originam metástases são a leucemia, linfoma, o câncer de mama e melanoma maligno (WANG *et al.*, 2014). No melanoma maligno, uma das hipóteses mais importantes para a formação das metástases é a função antiapoptótica, que traz como consequência a tolerância às drogas quimioterápicas dos tratamentos (CANDIDA *et al.*, 2014). Além da capacidade de metastatizar, outro fator revelante e favorável ao melanoma é a vascularização do tumor. Até que o tumor atinja 3 mm, a nutrição é feita por difusão passiva, logo após se inicia o processo de angiogênese no tumor até que este esteja vascularizado e, após isso, a massa de células começa a aumentar (NAVES *et al.*, 2017).

Entre os cânceres, o melanoma, é tido como um dos mais imunogênicos e com características clínicas e histológicas heterogêneas, além de número elevado de mutações (CORICOVAC *et al.*, 2018). As pesquisas têm mostrado que as alterações genéticas aparecem em mais de 70% dos melanomas cutâneos, em genes relacionados com supressão e progressão celular (LEE; BARTHEL; SCHATTON, 2014) e essa natureza heterogênea, faz com que o

melanoma seja o mais agressivo tipo de câncer e com instabilidade de genes mutados, e que possua um bom prognóstico se retirado cirurgicamente, com diagnóstico no início da doença, mas não sem alternativas eficazes quando o estágio ou as metástases estão avançadas (CORICOVAC *et al.*, 2018).

Nas metástases, há hipóteses de que são as células iniciadoras do melanoma maligno (conhecidas como MMICs), que possuem capacidade de propagação, autorrenovação e diferenciação. A presença dessas células, está relacionada com mau prognóstico e elas podem estar no sangue periférico dos pacientes com melanoma (LEE; BARTHEL; SCHATTON, 2014). Já foram identificadas também células quimiorresistentes em culturas de células de melanoma apresentando a expressão de genes compatíveis com os de células-tronco (FRANK *et al.*, 2005).

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a noradrenalina influencia na expressão do gene do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), da interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8), que estão associadas à progressão tumoral, através de angiogênese e metástases (MORETTI *et al.*, 2013). A IL-6 foi apontada como citocina importante nas metástases em melanoma devido a promoção do sinal de transdução e ativação da via de transcrição (KUMARI *et al.*, 2016).

Após instalado, o melanoma mantém sua progressão e torna-se tardia a morte celular programada, a apoptose. Esse processo é modulado por reguladores genéticos e metabólicos, que controlam os efeitos de sobrevivência ou morte de células tumorais e células normais (IVANOV; HEI, 2015). Devido às lacunas que as tentativas de contenção do melanoma apresentam, estudos trabalham com a modulação da resposta imune antitumoral, com terapias sistêmicas não específicas, reguladores negativos ou imunostimulantes inespecíficos (PARDOLL, 2012). O interferon e a interleucina-2 têm sido utilizadas, juntamente com substâncias quimioterápicas para aumentar o tempo de sobrevida dos pacientes (KEILHOLZ *et al.*, 2005). Estudos com moléculas inibidoras contra proteínas específicas oncogênicas também têm sido desenvolvidos (FLAHERTY; HODI; FISHER, 2012). Outra estratégia de tratamento testada foi baseada na capacidade do melanoma de desencadear repostas imunes antitumorais, então, uma alternativa foi utilizar anticorpos dirigidos contra antígenos tumorais específicos identificados em pacientes com melanoma. Também estão sendo utilizadas as associações na imunoterapia para tentar conter a progressão do melanoma, como exemplo a terapia com anti-PD-1 (anticorpo da proteína de morte celular programada 1), proteína que se liga aos seus receptores causando supressão do sistema imunológico, e quando utilizada associação em com propranolol obteve redução no crescimento do tumor, enquanto a anti-PD-1 sozinha não

apresentou resultado, o que sugere que o propranolol é benéfico para o melanoma (BUCSEK *et al.*, 2017).

Entretanto, mesmo com o avanço das pesquisas, as terapias combinadas ainda apresentam vantagens no tratamento do melanoma, devido à resistência que o tumor adquire frente aos tratamentos de imunoterapia, considerados os mais específicos e modernos na atualidade. Também estão sendo utilizadas abordagens da bioinformática para considerar as interações complexas com o sistema imune e tentar traçar ensaios mais assertivos (ASCIERTO *et al.*, 2019), embora devido a sua complexibilidade, pesquisas realizadas com essa doença ainda são consideradas desafiadoras (CORICOVAC *et al.*, 2018).

Contudo a grande quantidade de informações disponíveis sobre o desenvolvimento do melanoma, progressão e expressão gênica foram obtidas a partir dos modelos celulares; mesmo que essas linhagens possam apresentar diferentes respostas quanto ao meio em que estão, ou seja, a cultura ou o animal (HERLYN; FUKUNAGA-KALABIS, 2010).

As linhagens celulares tumorais têm sido amplamente utilizadas, pois permitem elucidar os processos que ocorrem na doença de forma rápida. A linhagem de células B16F10, foi apresentado pela primeira vez por Fidler (1973) e é originária de um tumor espontâneo de melanoma em camundongos C57BL6/J. A B16F10 é uma linhagem com alta capacidade metastática e com confiabilidade em relação aos dados de imunologia e imunoterapia, sendo adequada para a maioria dos modelos e ensaios experimentais (LIU *et al.*, 2018).

Também é crescente a utilização dos modelos murinos com implante das células tumorais de melanoma. O modelo perfeito para estudos *in vivo* seria aquele que tivesse a capacidade de desenvolver o melanoma a partir da exposição à radiação UV, mimetizando a doença humana, e atendendo a requisitos histopatológicos e imunológicos. Apesar deste fato, os modelos animais com camundongos têm constituído avanços consideráveis no esclarecimento da doença (CORICOVAC *et al.*, 2018). Os camundongos C57BL6/J, isogênicos são imunocompetentes e considerados ferramenta útil para estudos do melanoma, devido à interação entre melanócitos, células imunes e células B16F10, por conseguirem originar o melanoma e as metástases em pouco tempo após a inoculação (LIU *et al.*, 2018). Uma limitação decorrente do uso dos modelos murino é a localização dos melanócitos no camundongo, que se localizam nos folículos pilosos e nas regiões sem pelos (orelhas, patas) e em humanos, os melanócitos localizam-se entre a derme e a epiderme, o que obstrui o entendimento de eventos da doença (WALKER; HAYWARD, 2002).

2.2 PROPRANOLOL

O propranolol (1-isopropilamino-3-(1-naftiloxi)-2-propanol), beta-bloqueador adrenérgico, foi descoberto em 1964 por James Black e colaboradores na Indústria Química Imperial na Inglaterra. A síntese ocorreu a partir da modificação da molécula do pronetalol, uma droga eficaz na angina, cardiomiopatia hipertrófica e feocromocitoma, mas com muitos efeitos colaterais (BLACK; DUNCAN; SHANKS, 1965).

A nova droga propranolol, β -adrenérgico bloqueador não seletivo, foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) em 1967, três anos após sua descoberta, sem ter sido testada nos Estados Unidos. Na época ocorreu um estudo clínico realizado com um número reduzido de pacientes, com falha ética e viés de gênero, mas alavancou uma nova fase no tratamento de arritmias cardíacas, insuficiência cardíaca congestiva e doença arterial coronariana (MANU; ROGOZEA, 2016).

O propranolol está sendo utilizado há, em média, 40 anos para o tratamento de múltiplas patologias cardíacas como exemplo: angina de peito, arritmia e hipertensão arterial com ótimo perfil de segurança em adultos (MELO; GONÇALVES; ANJOS, 2013) e vem sendo prescrito em baixas doses para fobia social ou ansiedade social (NARDI, 1999). Entretanto para compreensão da automedicação individual e grupal com betabloqueadores em fobias sociais ou ansiedade de desempenho, bem como a prevalência do uso e sua importância ainda são necessários mais estudos. Os betabloqueadores vêm sendo utilizados para ansiedade de desempenho a três décadas, com ingestão de uma hora antes do evento a ser executado, e podem interromper sintomas autonômicos que causam o medo social (FONTANELLA, 2003).

O propranolol tem ação nos receptores β_1 e β_2 adrenérgicos. Os receptores beta-adrenérgicos (β -AR), fazem parte da atividade fisiológica normal e são o alvo das catecolaminas, para que o corpo possa dar a resposta de “Lutar ou Fugir” através da via beta-adrenérgica do sistema nervoso simpático (CHANG *et al.*, 2015); também são conhecidos por adrenoceptores e estão envolvidos nos processos celulares do câncer em angiogênese, metástase, progressão, invasão e apoptose (SOOD *et al.*, 2010), e são também os receptores-alvo dos β -bloqueadores, que quando presentes, impedem a ligação das catecolaminas (MACCARI *et al.*, 2017).

Com relação ao câncer, o envolvimento do sistema neuroendócrino no microambiente tumoral e metastático tem sido avaliado e com isso ocorreu a oportunidade da utilização de drogas que inicialmente eram dirigidas para doenças cardiovasculares, como os β -bloqueadores, conseguirem ser utilizadas como alternativa para contenção da progressão

tumoral (DE GIORGI *et al.*, 2012). Apesar de vários estudos mostrarem a eficácia do uso dos β -bloqueadores em estudos de células tumorais, em humanos os resultados de alguns estudos são contraditórios quando associam-se os β -bloqueadores e o câncer, o que reflete a sua relação complexa (YANG, 2010).

Os estudos a seguir são exemplos em que ocorreram vantagens com o uso do propranolol na progressão tumoral. No estudo de Perron e colaboradores (2004), pacientes com câncer de próstata e em uso de anti-hipertensivos beta-bloqueadores foram avaliados, e a incidência de câncer foi menor nestes pacientes quando comparado com os que usavam outras classes de anti-hipertensivos ou controle; neste estudo somente os anti-hipertensivos α e β -bloqueadores diminuíram o risco da doença e os bloqueadores dos canais de cálcio ou os inibidores da enzima conversora de angiotensina não apresentaram o efeito.

O propranolol também foi investigado no câncer de mama, com propósito de melhoria de progressão e sobrevida em ratos; mecanismos apoptóticos e de imunomodulação direta, associadas com a atividade anti-angiogênica indireta foram observados (ABDIN; SOLIMAN; SAIED, 2014). Estudos também apresentaram o risco diminuído em desenvolver câncer de estômago, cólon, próstata, pescoço e cabeça em casos de pacientes que receberam tratamento com propranolol (CHANG *et al.*, 2015). O propranolol também foi reportado por exibir um efeito anti-angiogênico nos hemangiomas infantis e adultos e adicionalmente em alguns tipos de câncer, o fármaco pode exibir um efeito inibidor sobre o crescimento do tumor e expressão de fatores angiogênicos em xenoinxertos de neuroblastoma, que podem proporcionar conhecimento do papel dos β -bloqueadores no neuroblastoma em ratos xenotransplantados (XU *et al.*, 2013). Em estudos epidemiológicos e estudos pré-clínicos os β -bloqueadores estão relacionados com o melanoma, mesmo sem a elucidação completa dessa relação, considera-se a validade como adjuvante de tratamento para os pacientes portadores de melanoma (ZHOU *et al.*, 2016).

Os experimentos realizados por Wrobel e Le Gal (2015) propõem que o propranolol desequilibra a expressão de proteínas pró e antiproliferativas e também interfere em genes pró e anti-apoptóticos, de modo positivo para manter a inibição da proliferação e a indução de apoptose em melanoma. O propranolol é tido como um medicamento com ação vasoativa, mas que apresenta atividade no melanoma como antitumoral e antiangiogênico (MACCARI *et al.*, 2017).

Os betabloqueadores foram testados em estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram ser eficazes para diminuir a progressão do melanoma e a recorrência da doença, são uma opção de preço acessível se obtiverem maiores comprovações de eficácia (KAO; LUU, 2019). Di

Giorgi *et al.* (2018) realizaram um estudo clínico, no qual participaram 121 pacientes com diagnóstico de melanoma cutâneo e sem metástases. O estudo teve duração de 3 anos e nele utilizaram propranolol como adjuvante ao tratamento do melanoma e houve a progressão da doença em 15.8% dos pacientes tratados e 41.2% em pacientes não tratados com propranolol. O uso de propranolol e outros betabloqueadores em estudos pré-clínicos demonstraram a inibição da progressão do tumor e da angiogênese quando a resposta da via noradrenalina-dependente foi inibida (TALARICO *et al.*, 2016; SLOAN *et al.*, 2010).

Estudos clínicos utilizando a associação de propranolol e pembrolizumabe estão sendo desenvolvidos e encontram-se em fase II, III e IV (ASCIERTO *et al.*, 2019).

Em relação ao uso do propranolol em estudos com cultura de células, o cloridrato de propranolol impediu a proliferação e induziu a apoptose em culturas primárias de células de melanoma primário e de metástase de melanoma humano, como também em linhagens de células de melanoma (A375, Mewo, e Mel-CLS3); quanto à expressão de receptores, essas células apresentaram receptores β_1 (WROBEL; LE GAL, 2015).

Quanto à expressão dos subtipos de receptores adrenérgicos (β_1 , β_2 e β_3), esta foi detectada em diferentes tipos de câncer: mama, rins, cérebro, ovário, pulmão, próstata e fígado (MORETTI *et al.*, 2013; SOOD *et al.*, 2010). Em células B16F10, para a avaliação da expressão receptores β , estas células foram retiradas de tecido cardíaco de ratos “knockout” e selvagens, e quantificados por PCR, e o estudo obteve a confirmação da expressão de receptores β_2 e ausência de receptores β_1 em células B16F10 (MACCARI *et al.*, 2017). Já os estudos de Dal Monte e colaboradores (2013) mostraram que os receptores β_3 também estão presentes nas células B16F10, comprovados por estudo em que os camundongos foram inoculados com B16F10 e como tratamento foi administrado um bloqueador β_3 específico.

Ainda sobre a expressão dos receptores beta adrenérgicos em células de melanoma, no estudo de Calvani e colaboradores (2015) foi relatado que todos os receptores β -adrenérgicos estão superexpressos no melanoma, porém a expressão dos receptores β_3 adrenérgicos está relacionada à sua agressividade. A falta de opções de fármacos β -adrenérgicos específicos para receptores β_3 dificulta a avaliação da sua função no processo (DAL MONTE *et al.*, 2013).

Os receptores β_3 adrenérgicos estão expressos, além das células tumorais, também em células estromais *in vivo* do microambiente do melanoma; a ativação dos receptores β_3 das células acessórias estimula tanto a liberação de citocinas inflamatórias quanto à angiogênese. Medicamentos dirigidos aos receptores β_3 adrenérgicos das células estromais não tumorais (fibroblastos, macrófagos e células endoteliais), como o propranolol, podem ser uma alternativa para diminuir a resistência a drogas nos pacientes com melanoma. (CALVANI *et al.*, 2015).

As catecolaminas têm sido relacionadas ao câncer devido aos seus efeitos nos receptores β -adrenérgicos, presentes nessas células tumorais (TANG *et al.*, 2013). Diante dessas informações, a regulação do crescimento do melanoma seria o papel do beta-bloqueador propranolol, antagonizando os efeitos da norepinefrina que atua como hormônio nessas células da pele (queratinócitos e melanócitos) (MORETTI *et al.*, 2013) através do bloqueio dos receptores beta e progressão tumoral (YANG *et al.*, 2009). A norepinefrina através dos receptores β -adrenérgicos nas células T apresentou efeito imunossupressor, mas esse aspecto ainda é pouco investigado nas pesquisas (ASCIERTO *et al.*, 2019).

2.3 COMPORTAMENTO

O sistema nervoso central e periférico pode ser significativamente comprometido quando há presença de câncer; os sinais e sintomas neurológicos estão presentes em cerca de 30% a 50% dos pacientes que se dirigem à consulta neurológica em hospitais de serviço oncológico (BALDWIN; ZIVKOVIC; LIEBERMAN, 2012). O melanoma, o osteossarcoma e o carcinoma de células renais geralmente são considerados radiorresistentes e os pacientes portadores que rapidamente desenvolvem déficits neurológicos são menos suscetíveis a melhora do que aqueles que desenvolvem déficits gradualmente (TORRES; MARADEI; TABAK, 2012).

No melanoma, as lesões cutâneas são consideradas lesões de risco, porém a mais provável causa de mortalidade vem da proliferação melanocítica "benigna" no cérebro ou no sistema nervoso central do portador de melanoma. Convulsões e hidrocefalia são manifestações neurológicas comumente encontradas e podem estar presentes nos primeiros anos de vida. O tratamento é sintomático e a morte ocorre nos três anos do início dos sintomas neurológicos (ISLAM, 2015). Fawzy e colaboradores (1993) avaliaram recorrência e sobrevivência de pacientes com melanoma maligno que participaram de um grupo de intervenção psiquiátrica por seis semanas, logo após diagnóstico e tratamento cirúrgico inicial e que foram reavaliados de 5 a 6 anos depois do diagnóstico. Os pacientes que passaram por intervenção psiquiátrica obtiveram maior tempo de sobrevivência e menor recorrência da doença, considerando a intervenção necessária e não um tratamento apenas alternativo.

A psiconeuroimunologia elenca fatores de comportamento, estresse psicológico e sistema imunológico como agentes influenciadores da saúde, inclusive no câncer. (YANG, 2010). Algumas das formas de estresse atuais como: sociais, emocionais, privação de glicose e dor refletem gerando tanto emoções negativas como irritabilidade e raiva, quanto como

alterações de comportamento, como ansiedade, depressão e alterações em vários órgãos do corpo (HERING; LACHOWSKA; SCHLAICH, 2015). Estudos demonstram que sintomas de depressão e ansiedade têm maior incidência em pacientes com câncer quando comparadas a outros tipos de doenças crônicas. A presença de ansiedade e depressão pode afetar o funcionamento físico, emocional e cognitivo (SALVETTI *et al.*, 2020) e aliados a sintomas psiquiátricos são um desafio em pacientes com câncer, da mesma forma que são difíceis intervenções terapêuticas (MOUSSAS *et al.*, 2012).

Na avaliação de incidência de ansiedade e depressão anterior à quimioterapia e a interferência desses sintomas na qualidade de vida, um estudo encontrou ansiedade em 21,8% dos e depressão em 23,6% dos pacientes, demonstrando impacto negativo desses sintomas na qualidade de vida dos pacientes (SIMÃO *et al.*, 2017). E em estudo realizado com 107 pacientes com câncer avaliados quanto à qualidade de vida e sintomas foram identificados: fadiga em 76,6%, dor em 42,1%, ansiedade em 31,8% e depressão em 21,5%. A depressão e a ansiedade pioram a qualidade de vida e se correlacionam com os sintomas físicos (SALVETTI *et al.*, 2020).

Na tentativa de elucidar os distúrbios neuropsicológicos que ocorrem nos pacientes com câncer e observar se há prolongamento na sobrevida dos portadores, alguns estudos têm sido desenvolvidos com foco no comportamento. Devido as dificuldades de estudo de sintomas como ansiedade e depressão em pacientes humanos portadores de tumores, os modelos animais de doenças psiquiátricas humanas estão entre as ferramentas de grande valia para investigar a neurobiologia e a etiologia ainda obscura nesses estados humanos (DE BROUWER; WOLMARANS, 2018). O estudo de modelos comportamentais pode revelar as interações entre as células tumorais e o seu ambiente, onde a metástase e a progressão do tumor são originadas e moduladas (PANTALEAO; LUCHS, 2010).

Entre os sintomas do paciente com melanoma, a depressão é uma doença comumente observada. No estudo de Lebeña e colaboradores (2014), em machos que foram inoculados com células tumorais de melanoma B16F10 e submetidos a testes avaliativos do comportamento, observou-se aumento da expressão de IL-6, diminuição da atividade dopaminérgica, bem como uma diminuição de serotonina, esses achados podem ser responsáveis pelo aparecimento de comportamentos depressivos em ratos portadores de tumor. Desta forma, características comportamentais estão sendo avaliadas em camundongos C57/BL6J com melanoma induzido por células B16F10, em estudos com antidepressivos (KUBERA *et al.*, 2011) e concentrações plasmáticas de epinefrina e norepinefrina foram avaliadas em ratos com implante de câncer de boca, submetidos a estresse. Neste último estudo citado, o estresse crônico possivelmente

provocou um aumento no tumor, além de elevação nos níveis das catecolaminas no plasma e de maior quantidade de células invasivas no carcinoma oral (HUIXU *et al.*, 2015).

Sinais emocionais debilitantes são sequelas refletidas em transtornos de comportamento causados pelo estresse, sendo ansiedade e depressão as mais comuns (KEDIA; CHATTARJI, 2014). Nos distúrbios de ansiedade as memórias aversivas podem estar superexpressas e estudos clínicos e pré-clínicos estabelecem a relação entre os processos emocionais e cognitivos sugerindo que essa associação possa ser desfeita com o uso de ansiolíticos tanto em humanos, quanto em animais (DEGROOT; NOMIKOS, 2005). Em estudos com roedores, as avaliações de estados de ansiedade decorrentes do estresse são em sua maioria avaliados pelo teste comportamental do labirinto em cruz elevado (“elevated plus-maze”), porém o teste de esconder esferas (“marble-burying test”) também têm sido utilizado com obtenção de resultados confiáveis para fármacos ou condições de ansiedade; este teste é útil para verificação de efeitos logo após a administração de ansiolíticos e pode ser utilizado para avaliação das intervenções farmacológicas ou ambientais a longo prazo, sendo útil para avaliar a progressão gradativa do estresse (KEDIA; CHATTARJI, 2014).

O labirinto em cruz elevado baseia-se no conflito exploração versus aversão, fundamentado na rejeição natural dos roedores à espaços abertos e provoca perfis de comportamento semelhantes à neofobia, evitar conflitos, exploração, sendo uma ferramenta para modelo de conflito comportamental espontâneo não-condicionado (BOURIN *et al.*, 2007). No teste de labirinto em cruz elevado, os ansiolíticos diminuem a aversão natural do animal aos braços abertos e estimulam a exploração desses braços. Enquanto, a permanência nos braços fechados é um comportamento indicativo de aumento de ansiedade (BADGUJAR; SURANA, 2010). O labirinto em cruz elevado é avaliado como um bom modelo para a ansiedade e tem sido utilizado não apenas para entradas nos braços, mas para outros comportamentos etológicos, como alongamento, higiene e queda de cabeça (RICO *et al.*, 2019). O teste de campo aberto (“open field”) apresenta similaridade no raciocínio quanto ao perfil de exploração do ambiente e agrega a avaliação de locomoção dos animais na arena (KALUEFF, 2007).

Apesar de difícil a avaliação dos processos neurológicos da depressão humana, a analogia do teste de natação forçada com a doença se dá devido aos achados comportamentais encontrados quando administrados os antidepressivos ou situações antidepressivas; onde a imobilidade é reduzida e as tentativas de fuga são aumentadas, como o nado (MARTÍ; ARMARIO, 1993). Conforme Porsolt e colaboradores (1977), no teste de nado forçado, quando um animal, seja ele rato ou camundongo, é apresentado a um estresse sem possibilidade de escape; como quando é colocado em um recipiente cilíndrico contendo água, o animal tentará

realizar a fuga desse ambiente e situação desfavorável e em seguida optará por manter-se imóvel, deixando somente com leves movimentos que permitam que sua cabeça permaneça acima da água.

O teste de nado forçado consegue avaliar de forma eficaz as classes de antidepressivos, possuindo a reprodutibilidade necessária e a facilidade de ser aplicado em vários laboratórios sem a necessidade de sofisticação em equipamentos em grande variedade de fármacos ou condições depressivas (COSTA, 2012).

2.4 CATECOLAMINAS

A tirosinase, proteína com múltiplas funções, possui envolvimento em doenças que ocorrem na pele como albinismo e melanoma. É a enzima que catalisa as várias etapas para a formação da melanina (WANG; HERBERT, 2006), tornando-se alvo de interesse em pesquisas de biologia molecular e imunologia.

Sendo a via da tirosinase capaz de originar melanina ou catecolamina, pesquisas utilizando inibidores ou ativadores com direcionamento na enzima tirosinase para tratar distúrbios da melanogênese são uma das muitas abordagens possíveis para desordens cutâneas, devido à complexa reação bioquímica envolvida na síntese de melanina (BUITRAGO *et al.*, 2016), entre elas o melanoma.

A melanina, produzida por melanócitos, tem várias funções fisiológicas de importância, entre elas: absorção da luz UV, proteção da pele dos danos causados pela luz UV e promoção da remoção de espécies reativas de oxigênio (KADEKARO *et al.*, 2005). Encontra-se sob a forma de eumelanina ou feomelanina, pigmentos preto-marrom e amarelo-vermelho, respectivamente, que quando combinados originam os diferentes tons de pele, cabelos e olhos dos mamíferos (WANG, HERBERT, 2006).

Os melanoblastos, precursores dos melanócitos, oriundos de uma subpopulação de células progenitoras da crista neural chegam até a pele para colonizá-la por uma extensa via dorsolateral e quando estão na epiderme, diferenciam-se em melanócitos, mantêm-se em número, através dos melanócitos auto-renováveis (ou células-tronco da crista neural regional), embora algumas dessas células, diferencie-se tardiamente (LIU *et al.*, 2018). Nos melanócitos (células pigmentares localizadas nas camadas mais internas da epiderme) ocorre a melanogênese, que é um processo de liberação de grânulos de pigmentos denominados melanossomos. Os pigmentos alcançam, posteriormente os queratinócitos circundantes e um

conjunto formado por 36 queratinócitos e um melanócito constitui uma unidade epidérmica de pigmentação (HADLEY, 1996). Os queratinócitos diferenciam-se e migram para as camadas mais externas da epiderme, os melanossomos são degradados e ocorre a liberação da melanina, conferindo pigmentação à pele (HOOGDUIJN *et al.*, 2004).

Nesse sentido, a pele contém uma diversidade de intermediários químicos com potencial para influenciar a proliferação e diferenciação dos melanócitos (ESPARZA *et al.*, 1997). Os melanoblastos podem diferenciar-se, se estiverem em condições adequadas, em células da glia ou neurônios, ou ainda em melanócitos, pois mantêm sua multipotência (KUNISADA *et al.*, 2014). Os melanomas são originados na diferenciação de melanoblastos em melanócitos ou de melanócitos jovens quando estão em maturação ativa, devido a mutações que podem ser somáticas ou epigenéticas (UONG; ZON, 2010) e as células que produzem melanina, de várias espécies, desde fungos até primatas, possuem estratégias favoráveis para longa sobrevivência (YAJIMA; LARUE, 2008).

Para que ocorra a melanogênese, os eventos iniciais exigem a presença da enzima tirosinase e das outras proteínas reguladoras pertencentes à mesma família, conhecidas como proteína relacionada à tirosinase 1 (TRP1, Tyrp1) e proteína relacionada a tirosinase 2 (TRP2, Tyrp2) (OLIVEIRA; JUNIOR, 2003). A enzima tirosinase catalisa a hidroxilação da tirosina para DOPA, através da tirosina hidroxilase, e depois deste passo também catalisa a oxidação da DOPA à levodopa, através da DOPA-oxidase. O processo da produção de melanina possui auto-regulação, sendo que a tirosinase sofre ativação e catálise por seu próprio substrato, a DOPA, que agiliza a reação à dopaquinona, entretanto alterações de pH e co-fatores podem alterar a atividade catalítica (WANG, HERBERT, 2006).

A levodopa serve como precursor para as melaninas e para as catecolaminas. Para a formação das melaninas (eumelanina e feomelanina) o que ocorre é a oxidação da levodopa para dopaquinona. E para a formação das catecolaminas a partir de levodopa ocorre descarboxilação para produzir dopamina, hidroxilação para produzir norepinefrina e metilação enzimática para produzir epinefrina (SLOMINSKI, A. *et al.*, 2004).

A falta de clareza na origem e desenvolvimento do melanoma também se deve ao fato de muitas vias de sinalização estarem envolvidas no processo, entre elas a via da tirosinase, motivo pelo qual essa via tem sido amplamente estudada. Estudos mostraram que a L-tirosina e a levodopa, necessárias à melanogênese, podem atuar com a função de reguladores celulares em outras funções além da melanogênese, a L-tirosina é um aminoácido não-essencial precursor da síntese de melanina e de catecolaminas (SLOMINSKI; ZMIJEWSKI; PAWELEK, 2012). No estudo de Prezioso e colaboradores (1993) realizado com células B16, a adição de L-tirosina

e L-fenilalanina aumentaram o número dendritos das células e a capacidade de metástase. E em estudo com camundongos C57BL/6/10 utilizando a L-tirosina, o número de melanossomos imaturos e de melanócitos mutantes elevou-se (HIROBE et al., 2002). Em estudo com células B16F10 implantadas em camundongos, a STAP-2 (proteína 2 de transdução de sinal) relacionada à melanogênese e proliferação celular, aumentou os níveis da proteína da tirosinase que determinou a invasão do tumor (SEKINE et al., 2015).

Estudos relacionaram alguns fatores ao aparecimento do melanoma, o MITF (fator de transcrição associado à microftalmia) considerado um regulador dos melanócitos é um exemplo desse fato. O MITF exporta pigmentos de melanina e consegue aumentar a sobrevivência das células da linhagem tumoral em 20 %. A expressão do MITF está atrelada à presença da proteína tirosina-quinase no receptor TYRO-3 (tirosinase 3) (super-expressa no melanoma) e pode ser um alvo para terapias, pois, quando considerada ausente, a proliferação celular *in vitro* foi inibida, bem como a tumorigênese *in vivo* (ZHU et al., 2009).

Quanto às catecolaminas, produzidas através da via da tirosinase, estas vêm sendo associadas à progressão tumoral em vários estudos: em câncer de ovário, a norepinefrina e a epinefrina influenciam a progressão da doença, através da modulação da expressão de genes (SOOD, 2006); no câncer pancreático β -bloqueadores associados às catecolaminas tiveram papel supressor (YANG et al., 2010). No estudo de migração celular em melanoma uveal e cutâneo, o estímulo de adrenalina foi avaliado, mostrando-se aumentado em melanoma uveal e sem alteração no melanoma cutâneo (JANIK et al., 2017). As catecolaminas são consideradas como agentes quimiotáticos e estimuladores de migração de células tumorais em células de carcinoma de mama e câncer de cólon (DRELL et al., 2003) e responsáveis por migração de células tumorais e células com efeito antiapoptótico (YANG, 2010). Em estudo com câncer de próstata em ratos xenoinxertados tratados com norepinefrina, houve aumento das metástases (BARBIERI et al., 2015). No melanoma, admite-se que as catecolaminas modulam a expressão de fatores pró-inflamatórios como a IL-6 (interleucina 6) e IL-8 (interleucina 8) e aumentam a transcrição do gene do fator de crescimento vascular endotelial, citocina associada à angiogênese, ambos fatores relacionados à progressão tumoral do melanoma (YANG et al., 2009). Ainda, a noradrenalina, tem sido apontada como angiogênica e relacionada ao aumento de citocinas (interleucinas 6 e 8), contribuindo com a progressão do tumor (SINNYA; DE'AMBROSIS, 2013). As catecolaminas atuam no microambiente tumoral, ativam as células tumorais, como também as células estromais (COLE; SOOD, 2012).

Em estudos com linhagens celulares, as catecolaminas estimularam adrenoceptores. Os receptores β -2 foram identificados em queratinócitos humanos, em SK-MEL 23, uma linhagem

de células de melanoma humano (SCHALLREUTER *et al.*, 1992) e em B16, linhagem de células de melanoma murino (TSUJI *et al.*, 1983). Adicionalmente, adrenoceptores α -2 e β -1 foram identificados em melanócitos de mamíferos e adrenoceptores α -1 em SK-MEL 23 (SCARPARO *et al.*, 2000).

As catecolaminas são consideradas os hormônios do estresse. O estresse é uma condição da civilização moderna que quando presente de forma crônica traz consequências graves, devido as respostas dadas pelos sistemas nervoso simpático e hormonal, podendo provocar uma sequência de reações no sistema nervoso central, entre elas a secreção de catecolaminas, adrenalina e noradrenalina como resposta rápida para ativar coração e músculos, e posteriormente desregula o eixo hipotâmico adrenal e enzimas são ativadas na via catecolaminérgica para liberação suplementar de catecolaminas (KRIZANOVA; BABULA; PACAK, 2016).

O estresse crônico foi relacionado a diversos tipos de câncer como em leucemia linfoblástica, em que o estresse crônico aumentou a progressão das células pela via de sinalização β -adrenérgica (LAMKIN *et al.*, 2012); em câncer de pulmão houve progressão do tumor por estresse crônico com sinalização por neurotransmissores em receptores nicotínicos de acetilcolina (AL-WADEI *et al.*, 2012); e em câncer de pâncreas (xenoenxertos), sob condições de estresse psicológico, houve progressão do tumor e aumento dos níveis de cortisol, adrenalina e noradrenalina (SCHULLER *et al.*, 2012). Alguns estudos, porém, na sua maioria *in vitro*, obtiveram resultados contraditórios dos hormônios relacionados ao estresse em relação à proliferação celular, sendo esses ora inibitórios, ora estimulantes, o que reforça a necessidade de identificação de diferenças entre as células tumorais e seus mecanismos de progressão (THAKER; SOOD, 2008). Os receptores β -adrenérgicos são mais prevalentes em câncer que os α -adrenérgicos. Em relação à afinidade por catecolaminas, nos receptores β -1 e β -2 a finalidade é a mesma por noradrenalina ou adrenalina, já os β -2 apresentam maior afinidade por adrenalina e os β -3 por noradrenalina (KRIZANOVA; BABULA; PACAK, 2016).

As catecolaminas liberadas em resposta ao estresse estão relacionadas com a progressão e angiogênese de tumores. Dessa forma, estuda-se seu envolvimento com expressão de receptores β - adrenérgicos. O estresse pode afetar a eficiência da terapia do câncer e os transtornos de comportamento ou psiquiátricos são considerados agravos da patologia (KRIZANOVA; BABULA; PACAK, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar dos efeitos do β -bloqueador propranolol sobre a progressão tumoral em ensaio *in vitro* e *in vivo*, bem como o comportamento *in vivo* de camundongos C57BL6/J sadios e inoculados com células B16F10 de melanoma murino tratados com propranolol.

3.2 ESPECÍFICOS

- Verificação os efeitos do propranolol em células B16F10 através da avaliação da toxicidade sobre o crescimento celular.
- Avaliação do crescimento tumoral *in vivo* em camundongos C57BL6/J
- Avaliação dos efeitos do propranolol sobre o comportamento de animais sadios e portadores de melanoma sem tratamento e tratados com propranolol nos testes de:
 - Campo Aberto
 - Nado Forçado
 - Labirinto em Cruz Elevado e
 - Teste de Esconder Esferas
- Avaliação dos efeitos do melanoma na região da substância nigra no cérebro dos camundongos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTURA DA LINHAGEM B16F10

Cultura da linhagem tumoral B16F10 (ATCC CRL-6475®, ATCC-USA), em meio RPMI 1640 suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB 10% v/v), adquiridos de Cultilab®, São Paulo. As células foram mantidas em garrafas de cultivo estéreis de 125 cm², em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂). O meio de cultivo utilizado foi RPMI, com adição de HEPES (Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-etanosulfônico) para correção e manutenção do pH ($7,2 \pm 0,2$) do meio de cultivo. Adicionalmente uma mistura de antibióticos a 1% (v/v) de penicilina 10.000 unidades/mL e estreptomicina 10.000 µg/mL foi utilizada, adquiridos de Invitrogen®.

A cultura foi diariamente observada em microscópio invertido, sendo realizada a substituição de meio de cultivo a cada dois dias, de acordo com a confluência celular. As passagens (subcultivos) foram realizadas de acordo com a necessidade, observando-se a confluência das células. Para isso, dentro da capela de fluxo laminar, o meio de cultivo foi aspirado e adicionada solução tampão fosfato salino sem cálcio e sem magnésio (PBS), pH 7,0, para lavagem da camada celular. Posteriormente, quando observada confluência celular, utilizou-se solução de Tripsina 2,5 g/L e EDTA 0,02 %, pH 7,0 (Vitrocell®) para o descolamento das células. Soro fetal bovino foi adicionado para neutralização do efeito da solução de tripsina e após realizou-se a centrifugação para retirada da solução de Tripsina/EDTA e obtenção das células para cultivo.

4.2 ENSAIO DE MTT

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 de propranolol foi determinada utilizando 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 difeniltetrazóliobrometo (MTT), de acordo com o método de Tada et al. (1986).

Foram adicionadas 5×10^3 células em cada poço de placas de 96 poços. As células foram armazenadas em estufa a 37°C por 24 h e posteriormente expostas às soluções de concentrações 0,01; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0 e 10 mM de propranolol e avaliadas em 24, 48 e 72 horas. As concentrações de propranolol avaliadas foram baseadas no trabalho de Maccari e colaboradores (2017).

A solução de MTT com concentração de 0,5 mg/mL foi adicionada em cada poço (200 µL), e a viabilidade das células foi avaliada através da atividade da desidrogenase mitocondrial formando o complexo formazan (roxo) após 3 horas de incubação em estufa a 37°C sob tensão de CO₂, sendo este um teste colorimétrico. A absorbância de cada poço foi lida a 570 nm, utilizando-se um leitor de placas (EL808B, BioTech Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA).

4.3 LINHAGEM DE CAMUNDONGOS

Foram utilizados camundongos C57BL6/J machos adultos, com idade entre 2 e 3 meses, obtidos de Biotério do Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da UEPG, após aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da UEPG, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação sob o número 16209/2016 (ANEXO 1).

O manejo dos animais foi realizado no Biotério do Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da UEPG. A experimentação foi realizada no Biotério e no Laboratório de Farmacologia da UEPG.

Aos animais estavam disponíveis água e ração *ad libitum*, permanecendo 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.

4.4 INDUÇÃO DO MELANOMA

A linhagem de células B16F10 cultivada em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB e adicionado antibiótico penicilina 10.000 unidades/mL/estreptomicina 10.000 µg/mL foi utilizada para a indução do tumor.

Para o procedimento, os camundongos C57BL6/J tiveram a região posterior do dorso tricotomizada. Foram injetadas via subcutânea no dorso dos camundongos as células B16F10, com contagem determinada de 5×10^4 células em 100 µL de meio de cultivo. O uso de anestésicos não foi necessário, já que esses camundongos não apresentam inervação subcutânea, não sendo, portanto, um processo que cause dor ao animal. Este tipo de tumor possui crescimento acelerado sendo possível a visualização em aproximadamente dez dias do implante (PLOWMAN et al., 1997).

4.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para a formação dos grupos, o total de animais foi dividido em dois grupos primários, sendo que um grupo recebeu o implante de células tumorais e o outro grupo não recebeu o implante.

Após a realização do implante de células tumorais, os camundongos foram randomicamente divididos em 3 grupos de 4 animais, bem como os animais que não receberam o implante, foram divididos em 3 grupos, contendo 4 animais cada. O protocolo experimental foi realizado três vezes, totalizando n=13 para cada grupo de animais.

Grupos experimentais:

1. Grupo Controle Sadio
2. Grupo Propranolol 10 mg
3. Grupo Propranolol 40 mg
4. Grupo Portador de Melanoma
5. Grupo Melanoma Propranolol 10 mg
6. Grupo Melanoma Propranolol 40 mg

Passados 5 dias após o implante, o tratamento foi iniciado e permaneceu sendo administrado durante 15 dias. Para todos os grupos o tratamento foi administrado via oral, em uma única dose diária, sendo mantido o horário de administração durante todo o tratamento. A dose administrada foi adequada ao peso de cada animal, para isso, eles foram pesados diariamente.

Para a administração do tratamento, o animal foi elevado da bancada com pinçamento da base do pescoço (mão esquerda) e, com isso, o peso do corpo do animal alinha o tronco, com a força da gravidade, e naturalmente o camundongo abre a boca e o tratamento pode ser administrado.

Aos Grupos 1 e 4 foi administrado via oral, somente veículo (água) durante o tratamento de 15 dias. Aos Grupos 2 e 5 foi administrado via oral, solução de propranolol na dose de 1,43 mg/Kg em água por 15 dias. E aos Grupos 3 e 6 foi administrado solução de propranolol na dose de 5,71 mg/Kg em água por 15 dias.

No final do experimento, os animais foram anestesiados com quetamina/xilazina (após pesados para determinação da dose de anestésicos) e retiradas as amostras sanguíneas para

análises posteriores. Após o sacrifício, os cérebros dos animais foram retirados para análise histológica.

4.6 PARÂMETROS MACROSCÓPICOS DO CRESCIMENTO TUMORAL

No quinto dia após o implante de células tumorais, os camundongos foram avaliados quanto ao aparecimento do tumor no dorso do animal. A partir do dia em que o tumor se tornou visível e palpável, foi utilizado um paquímetro Digital (Marberg®) para determinação das medidas longitudinal e transversal, necessárias para o cálculo do volume tumoral, de acordo com a equação 1 (KATO *et al.*, 1994), que seguiram sendo realizadas diariamente até o término do experimento.

$$\text{Eq 1: Volume Tumoral} = \text{Medida longitudinal (mm)} \times [(\text{medida transversal (mm)})^2 \times \frac{3}{4}] \quad \P$$

4.7 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais foram realizados no período da tarde, entre 13 e 17 horas, no Laboratório de Farmacologia da UEPG. Os testes foram realizados em duas tomadas de tempo, sendo a primeira no início do tratamento (quinto ao oitavo dia), denominado Tempo 1, o qual refere-se ao início do desenvolvimento do tumor e a segunda, denominada Tempo 2 no final do tratamento (décimo segundo ao décimo quinto dia), considerando tumor consolidado, conforme desenho experimental (Figura 1).

Durante os testes comportamentais a iluminação artificial da sala experimental foi mantida e as janelas fechadas para evitar sons externos, bem como as cortinas fechadas para bloquear luzes, sombras e reflexos, a fim de minimizar efeitos que pudessem distrair ou confundir os animais.

QUADRO 1. Desenho do protocolo Experimental para camundongos C57BL6/J no presente estudo (Testes comportamentais: CA=teste de campo aberto, LCE= labirinto em cruz elevado, TNF=teste de nado forçado, TEE= teste de esconder esferas)

Dia 1	...	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	...	Dia 12	Dia 13	Dia 14	Dia 15	Dia 21
Implante Tumoral		CA e LCE	Pré-teste NF	TNF	EE		CA e LCE	Pré-teste NF	TNF	EE	Coleta sangue
		Tempo 1					Tempo 2				
		Tratamento									Retirada
		Determinação do Volume Tumoral									cérebro

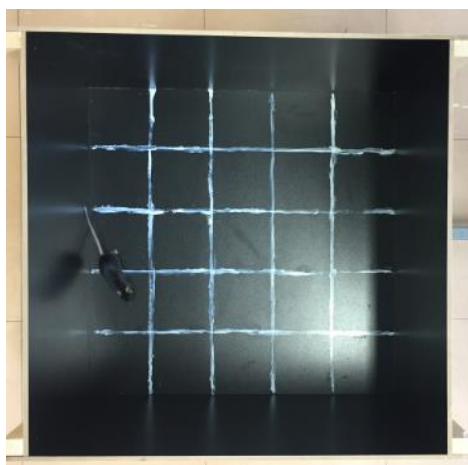
4.7.1 Campo Aberto

Este teste avalia função neuropsiquiátrica de forma simples, atividade locomotora e de ansiedade, foi descrito por Hall (1934), sendo a deambulação do animal na periferia considerada medida de atividade locomotora e a deambulação no centro do CA (campo aberto), uma medida mais seletiva para ansiedade (CRUZ; J. LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Consiste em uma caixa feita em madeira (30 X 30 X 20 cm) coberta na cor preta, sendo a base da caixa dividida em 25 quadrados iguais pintados na cor branca (Figura 1). Cada camundongo foi colocado individualmente no centro do CA permanecendo por 5 min (TADAIESKY; ANDREATINI; VITAL, 2006). Durante o tempo de permanência na caixa do CA foram analisados os seguintes parâmetros: o número de quadrados cruzados com todas as patas, locomoção no centro do CA (quando o camundongo encontrava-se com as quatro patas em qualquer um dos 9 quadrados centrais), locomoção na periferia (quando o camundongo encontrava-se com as quatro patas em qualquer um dos 16 quadrados laterais) e levantar (quando o camundongo encontrava-se com as duas patas traseiras apoiadas na base, com o corpo ereto e as patas dianteiras elevadas, tocando ou não as paredes do CA no centro e periferia). Após a saída de cada animal, no término do teste, foi utilizado álcool 10% em água para limpeza do CA, a fim de eliminar pistas odoríferas dos animais previamente avaliados.

As sessões foram filmadas por uma câmera instalada verticalmente conectada a um computador instalado na sala experimental. Os vídeos foram analisados posteriormente com auxílio do Software Open Field.

FIGURA 1. Caixa do Campo Aberto (open-field) com camundongo C56BL6/J na periferia (Laboratório de Farmacologia da UEPG).



Fonte: a autora (2017)

4.7.2 Teste Nado Forçado

O teste de nado forçado (TNF) foi descrito por Porsolt e colaboradores (1977) e é o modelo mais utilizado para avaliar depressão, estando em cerca de 72 % dos estudos publicados com esse fim na última década (YIN; GUVEN; DIETIS, 2016).

De acordo com Lucki (1997), o TNF é um modelo muito utilizado para a avaliação de atividade antidepressiva com roedores. Nesse teste, os animais foram colocados individualmente em recipientes cilíndricos de plástico (com aproximadamente 30 cm de altura e 22 cm de diâmetro), contendo água na temperatura média de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e profundidade de 20 cm (Figura 2). Ao término do teste, cada animal foi seco com toalha, e o recipiente higienizado com álcool 70%. A água do recipiente foi substituída e a temperatura da água verificada antes da colocação de cada animal e corrigida, quando necessário.

FIGURA 2. Teste Nado Forçado (Laboratório de Farmacologia da UEPG)



Fonte: a autora (2018)

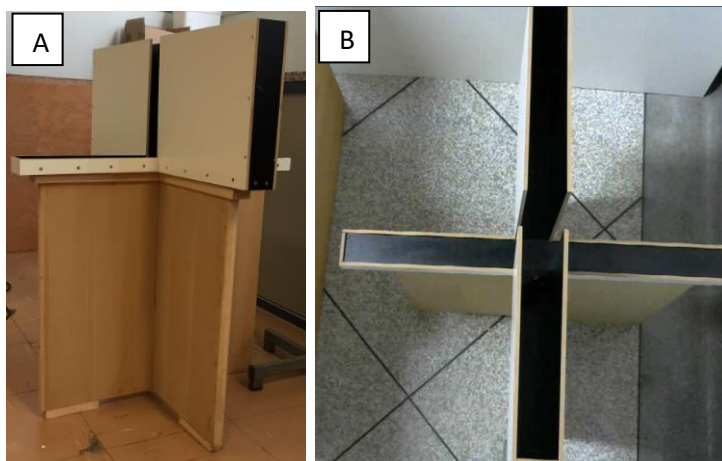
O tempo utilizado nos seguintes comportamentos foi determinado: imobilidade (completa flutuação ou movimentos suaves, mantendo-se com o corpo semiverticalizado, com o nariz acima da superfície da água); escalada (movimentos rápidos e contínuos com as patas dianteiras); natação (o animal se movimentou dentro do cilindro com o corpo na horizontal, não retirando da água as patas dianteiras). Também foi considerado natação quando o animal manteve o corpo abaixo da superfície da água.

O teste é realizado em duas etapas, sendo o primeiro dia denominado treino ou pré-teste, que possui duração de 15 minutos e no segundo dia o teste propriamente dito (FERNANDES *et al.*, 2012), que teve a duração de 5 minutos. Para o registro comportamental, os animais foram filmados. Os vídeos foram analisados posteriormente utilizando-se o software PlusMz e determinados os tempos das categorias comportamentais.

4.7.3 Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) é composto por dois braços abertos (30 x 5 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 25 cm) em forma de cruz, elevado 45 cm do chão através de uma plataforma, fabricado em madeira (Figura 3). Este instrumento foi desenvolvido para utilização em ratos (PELLOW *et al.*, 1985) e foi validado para camundongos por Lister (1987) como modelo para avaliar ansiedade e locomoção. Os braços abertos possuem uma borda de 0,5 cm para evitar queda dos animais, os braços fechados possuem as paredes de cor escura, pois de acordo com Hagenbuch; Feldon; Yee (2006) para camundongos da espécie C57BL/6 o LCE indicado para verificação de efeito ansiolítico do fármaco é o que possui paredes opacas e não transparentes (2006).

FIGURA 3. Labirinto em Cruz Elevado (A) com suporte de Elevação e (B) vista superior.



Fonte: a autora (2017)

A aplicação do teste baseia-se na recusa natural dos animais pelos braços abertos e na atividade exploratória, sendo o tempo gasto nos braços abertos e o número de entradas nesses braços considerados parâmetros responsivos a drogas ansiolíticas (PELLOW *et al.*, 1985) e o tempo gasto nos braços fechados considerados parâmetros de atividade locomotora (BARRETA *et al.*, 2012). Portanto, de acordo com esse teste, quanto maior a ansiedade, menor o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos (PELLOW *et al.*, 1985).

Os animais foram colocados no centro do labirinto e deixados durante 5 minutos com livre movimentação. No momento em que cada animal foi colocado no aparato, seu corpo foi posicionado de forma que ficasse com o segmento cefálico voltado para o mesmo braço aberto e o executor do teste estando em posição oposta, como forma de padronização. Após a saída de cada animal, o aparato foi higienizado com álcool a 10% para eliminação das pistas odoríferas possivelmente deixadas pelo animal anteriormente analisado.

Foram considerados os tempos gastos nos braços abertos e fechados e o número de vezes que os camundongos entraram nos braços abertos. A entrada foi considerada somente quando o animal entrou com as 4 patas dentro dos braços. Os registros foram feitos por filmagens dos camundongos e as análises realizadas posteriormente com o Software PlusMZ.

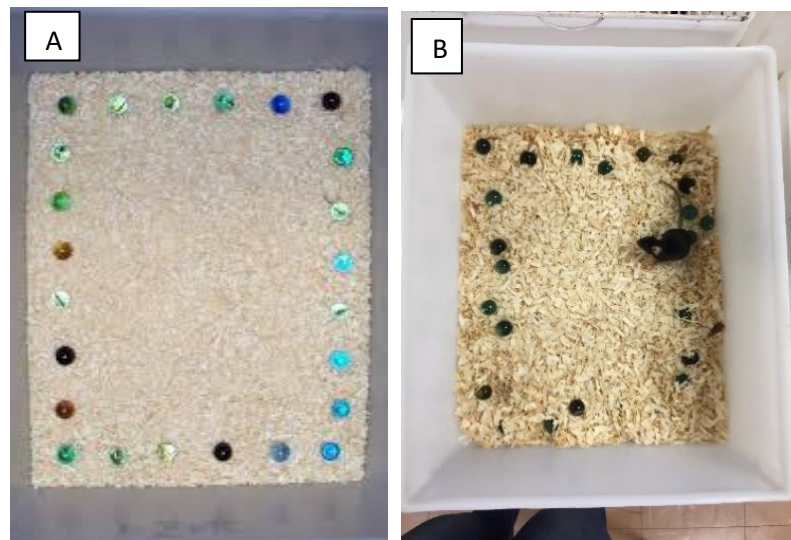
4.7.4 Teste de Esconder Esferas

Devido ao comportamento apresentado por roedores de enterrar objetos hostis ou alimentos nocivos, houve a adaptação do teste de esconder esferas (TEE), utilizado em ratos,

para camundongos (BROEKKAMP *et al.*, 1986). O teste de esconder esferas representa uma ferramenta de grande valia no comportamento dos animais, já que avalia comportamentos ansiosos e compulsivos, apesar das diferenças metodológicas entre laboratórios (DE BROUWER; WOLMARANS, 2018).

O teste de esconder esferas foi realizado em uma caixa de polietileno (40 X 34 X 16 cm), contendo o fundo coberto com uma camada de 5 cm de maravalha. Nesta caixa foram distribuídas uniformemente na periferia, 24 esferas de vidro (15 mm de diâmetro), conforme a Figura 4. Para realização do teste, os camundongos foram colocados individualmente no centro da caixa, a grade de proteção foi colocada na superfície para evitar a saída dos animais. Após 20 minutos o animal foi removido e o número de esferas cobertas por maravalha foi determinado. As esferas consideradas escondidas foram aquelas que estavam totalmente cobertas ou aquelas que possuíam pelo menos 2/3 da sua superfície coberta por maravalha. As caixas com maravalha foram trocadas a cada animal testado e as esferas lavadas com álcool 10%, para que não houvesse interferência do cheiro dos animais retirados anteriormente (HAYASHI *et al.*, 2010).

FIGURA 4. Teste de Esconder esferas, demonstrando a caixa de polietileno com a distribuição das 25 esferas de vidro e (B) o camundongo C57BL6J escondendo as esferas na maravalha.



Fonte: a autora (2017)

4.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para a análise histológica foram retirados os cérebros dos animais após o sacrifício. Os órgãos foram imediatamente dispostos em frascos de vidro contendo o fixador Alfac (solução contendo 85% de álcool 80%, 10% de formol e 5% de ácido acético). Nessa solução os órgãos permaneceram por 12 horas e para que ocorra a insolubilização das proteínas e manutenção dos tecidos de forma próxima a encontrada no organismo vivo. Após esse período utilizou-se o álcool 70% para o acondicionamento das amostras.

Após esse processo, seguiu-se a desidratação das amostras, com passagens dos órgãos por soluções alcoólicas de 70% a 100%. E na sequência da preparação, foram realizados dois banhos em xilol por 30 minutos para que ocorresse o clareamento do material para análise.

Após clareamento, as amostras seguiram para inclusão, realizada em parafina a 60° C. Nessa etapa do processo, o xilol é evaporado e os espaços livres são preenchidos com parafina. Então foram preparados os blocos contendo os órgãos.

Os blocos foram cortados em micrótomo para obtenção de cortes histológicos com espessura de 5 µm. Em seguida foram confeccionadas as lâminas de vidro, com posterior secagem em estufa a 37°C. Após a secagem completa, procedeu-se a desparafinização em xilol e hidratação com soluções alcólicas crescentes e utilizando-se a coloração convencional com hematoxilina-eosina (HE).

Nas lâminas a região de interesse observada foi a região da substância nigra, local onde ocorre a de produção da dopamina. Foram obtidas as imagens microscópicas da região e analisadas através do software Image J.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism 7 e Software Statistica. Os resultados obedeceram a distribuição paramétrica e foram analisados de acordo com cada experimento por ANOVA- 1 VIA (MTT e crescimento tumoral) ou ANOVA- 2 VIAS, com pos hoc Tukey e Nelman-Keuls (testes comportamentais). Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTAÇÃO CELULAR

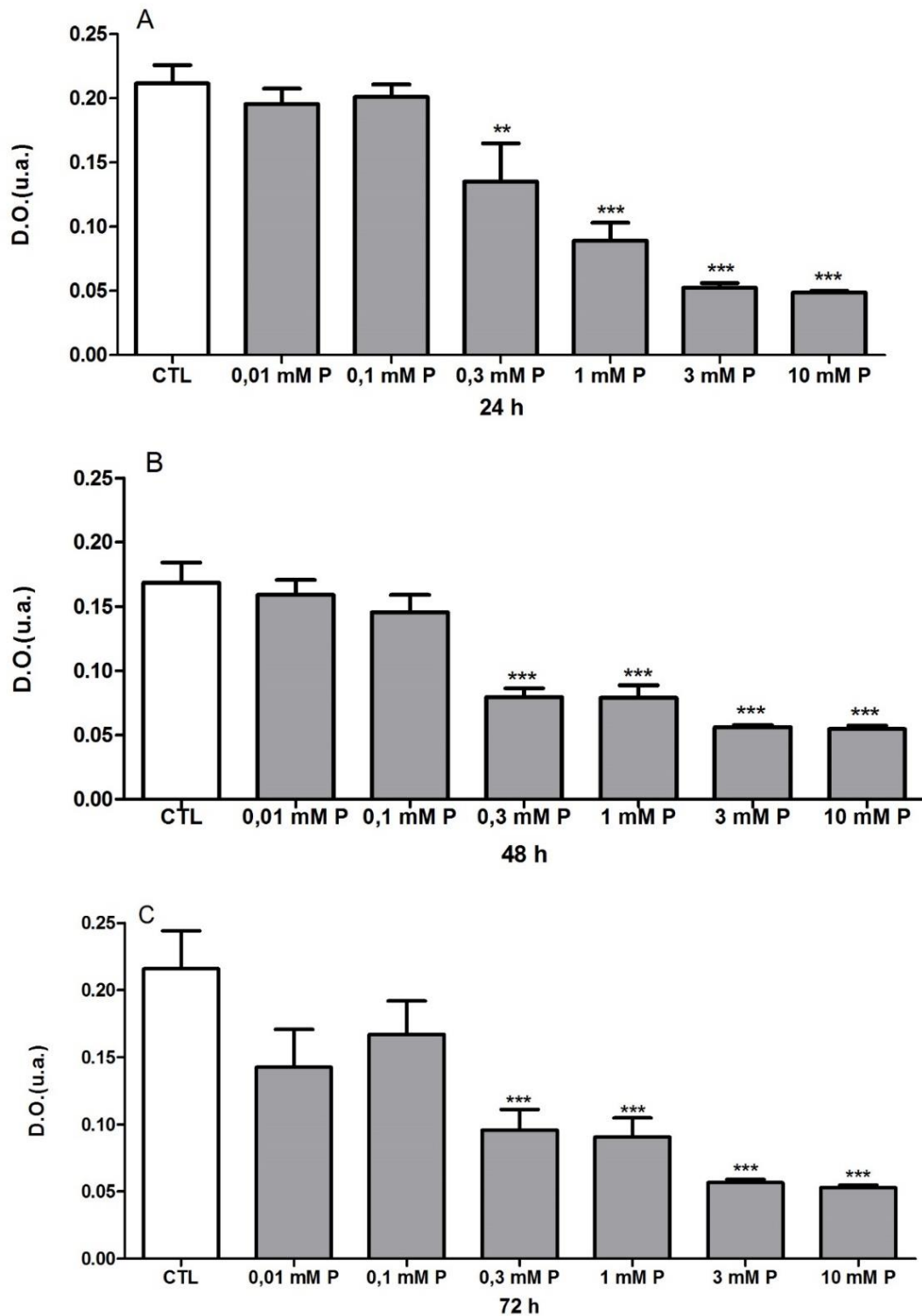
5.1.1 Avaliação da Viabilidade Celular em Linhagem B16F10

A viabilidade das células B16F10 foi avaliada após 24, 48 e 72 horas de tratamento (utilizando-se as seguintes concentrações de propranolol: 0,01 mM, 0,1mM, 0,3 mM, 1 mM, 3 mM e 10 mM e o controle), conforme metodologia descrita no item 4.2. Os dados mostrados na Figura 6 representam três repetições independentes, duas com n=3 e uma com n=4 em cada repetição do ensaio MTT.

Na Figura 5 (5-A, 5-B e 5-C), observou-se a limitação do crescimento celular em relação ao controle nas seguintes concentrações testadas: 0,3; 1,0; 3,0 e 10 mM de propranolol com diferença estatística. As concentrações 0,01 e 0,1 mM de propranolol não foram estatisticamente significativas em relação ao controle em 24, 48 e 72 horas.

A concentração de 0,3 mM de propranolol apresentou crescimento celular diminuído estatisticamente diferente em relação ao controle com $p < 0,05$ em 24 horas (Figura 5-A); e em 48 horas (5-B) e 72 horas (5-C) apresentou o valor de $p < 0,001$. As concentrações de 1,0; 3,0 e 10 mM de propranolol obtiveram $p < 0,001$ quando avaliadas em 24, 48 e 72 horas.

FIGURA 5. Teste de viabilidade celular (MTT) com células B16F10. Células B16F10 (CTL), soluções de propranolol (P) nas concentrações 0,01, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 e 10 mM, 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=10/grupo). Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo Controle. ** $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.



Fonte: a autora

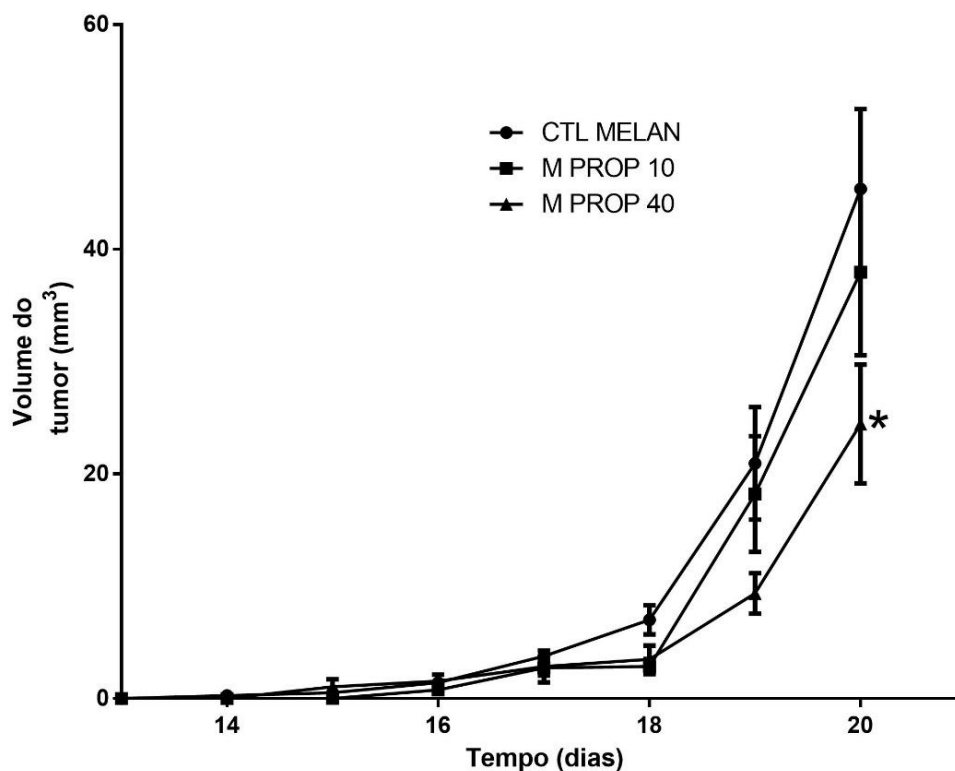
5.2 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

5.2.1 Avaliação do Volume Tumoral

Os camundongos foram submetidos ao implante tumoral com células B16F10 conforme descrito no item 4.4. O volume tumoral foi avaliado durante 20 dias de tratamento nos camundongos C57BL6/J, conforme descrito no item 4.6.

De acordo com os resultados obtidos no estudo *in vivo*, os grupos tratados com propranolol 10 e 40 mg apresentaram volume tumoral diminuído quando comparado ao grupo controle portador de melanoma, tratado com veículo, até o vigésimo dia de tratamento. O grupo propranolol 10 mg não foi diferente estatisticamente e o grupo propranolol 40 mg apresentou diferença estatisticamente significativa (valor de $p > 0,05$), quando comparado aos dois outros grupos testados, nas condições experimentais utilizadas, como pode ser observado na Figura 6.

FIGURA 6. Avaliação do volume tumoral após tratamentos com veículo (salina), propranolol 10 e 40 mg nos tumores B16F10 em camundongos C57BL6/J portadores de melanoma ($n=13/\text{grupo}$), durante 20 dias. ANOVA - 1 VIA, post hoc Tukey, valores expressos como média $\pm$ EPM, com $*p < 0,05\%$.



Fonte: a autora

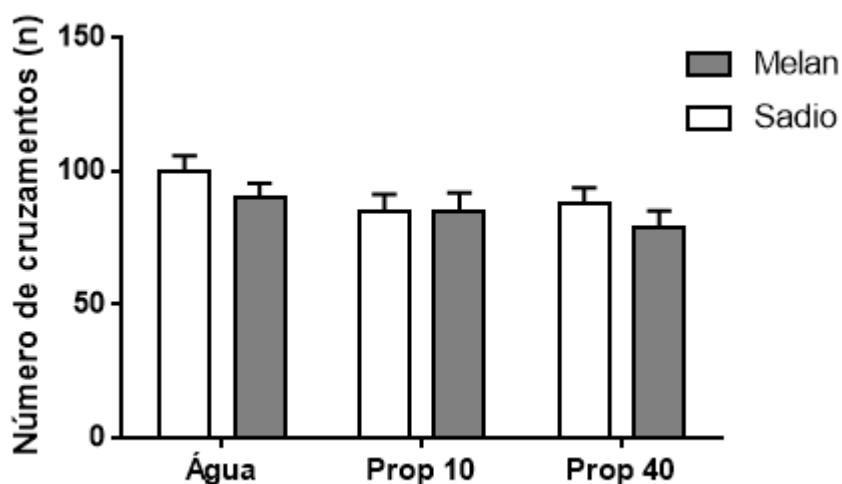
5.2.2 Avaliação dos Testes Comportamentais no Tempo 1

5.2.2.1 Avaliação da atividade locomotora no Campo Aberto

O teste de CA foi realizado conforme descrito no item 4.7.1. Um dos parâmetros determinados nos grupos de camundongos C57BL6/J avaliados foi quanto ao número de cruzamentos totais realizados durante o teste. Os resultados obtidos foram apresentados na Figura 7.

Os grupos portadores de melanoma tratados com água e propranolol nas doses de 10 e 40 mg realizaram o mesmo número de cruzamentos que o realizado pelos grupos sádios tratados com água ou propranolol nas doses de 10 e 40 mg/Kg, não havendo diferença estatística significativa quando comparados.

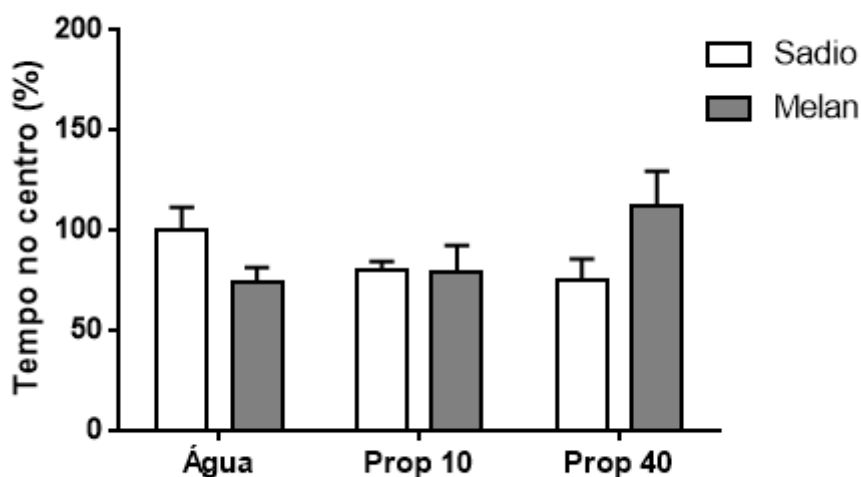
Figura 7. Número de cruzamentos totais (n) em teste Campo Aberto (Tempo 1 = 5 min), realizado com camundongos C57BL6/J (n=13/grupo), onde Sadio = ausência de melanoma e Melan = Portador de Melanoma, tratados com água, propranolol 10 mg e propranolol 40 mg. Os resultados foram analisados com ANOVA-2 vias, com pos-hoc Newman-Keuls, valores expressos como média $\pm$ EPM.



Fonte: a autora

Quanto ao tempo de permanência no centro do campo aberto, segundo ANOVA-2 Vias houve efeito significativo na interação melanoma/propranolol com $[F(2,72)=3,9266; p=0,02407]$ e não houve diferença significativa entre os grupos portadores de melanoma tratados com água ou com propranolol nas doses de 10 e 40 mg/Kg e os grupos sádios tratados com propranolol nas doses de 10 e 40 mg/Kg, conforme mostra figura 8.

Figura 8. Tempo de permanência no centro em teste Campo Aberto (Tempo 1 = 5 min), realizado com camundongos C57BL6/J (n=13/grupo), onde Sadio = ausência de melanoma e Melan = Portador de Melanoma, tratados com água, propranolol 10 mg e propranolol 40 mg. Os resultados foram analisados com ANOVA-2 vias, com pos-hoc Newman-Keuls, valores expressos como média $\pm$ EPM.



Fonte: a autora

Foram também determinados e analisados em todos os grupos os seguintes dados: tempo de permanência na periferia (Tabela 1) e tempo de levantar (Tabela 2) que não apresentaram diferença estatística significativa no Tempo 1.

Tabela 1 - Avaliação da atividade locomotora na periferia do campo aberto (5 min), tempo 1. Dados representam a média $\pm$ DP, n = 13/grupo.

Grupos	Tempo de Permanência na Periferia		
Controle Sadio	238,964	$\pm$	24,6714
Propranolol 10 mg	251,351	$\pm$	6,68753
Propranolol 40 mg	254,403	$\pm$	21,5005
Portador de Melanoma	254,635	$\pm$	15,4634
Melanoma Propranolol 10 mg	251,61	$\pm$	28,7837
Melanoma Propranolol 40 mg	230,557	$\pm$	40,2495

Fonte: a autora

Tabela 2 - Avaliação do tempo de levantar no campo aberto (5 min), tempo 1. Dados representam a média $\pm$ DP, n = 13/grupo.

Grupos	Tempo de Levantar		
Controle Sadio	11,87	$\pm$	10,52
Propranolol 10 mg	9,03	$\pm$	7,64
Propranolol 40 mg	8,67	$\pm$	6,77
Portador de Melanoma	10,15	$\pm$	8,33
Melanoma Propranolol 10 mg	8,01	$\pm$	6,42
Melanoma Propranolol 40 mg	7,78	$\pm$	7,98

Fonte: a autora

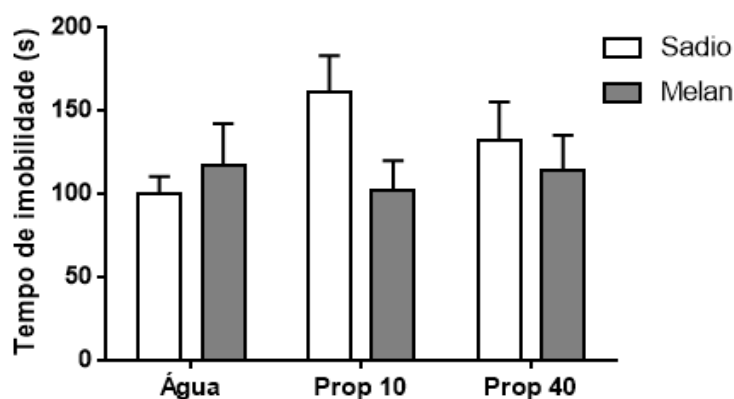
5.2.2.2 Avaliação do comportamento animal no Nado Forçado

O TNF foi realizado conforme descrito no item 4.7.2. Foram analisados os tempos de imobilidade, natação e escalada para todos os grupos no pré-teste e teste.

5.2.2.2.1 Pré-teste Nado Forçado

No pré-teste no Tempo 1 (Figura 9), no tempo de Imobilidade não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

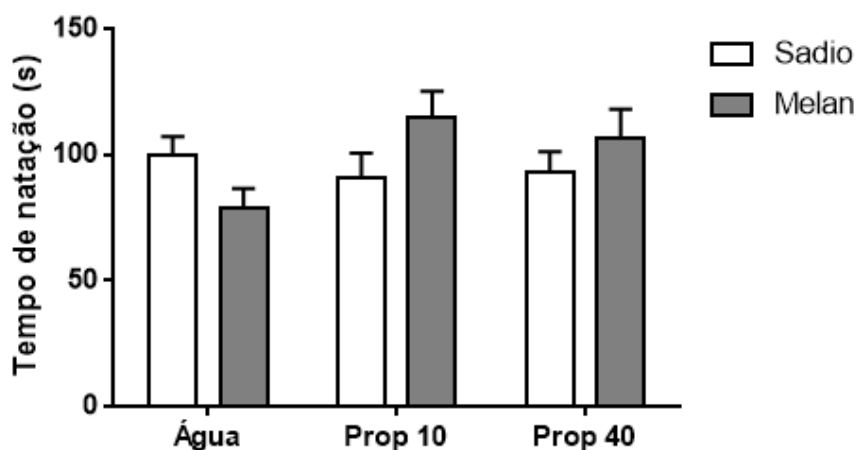
FIGURA 9. Tempo de imobilidade (segundos) no pré-teste do Nado Forçado (Tempo 1 = 5 min), realizado com camundongos C57BL6/J (n=13/grupo), onde Sadio = ausência de melanoma e Melan = Portador de Melanoma, tratados com água, propranolol 10 mg e propranolol 40 mg. Os resultados foram analisados com ANOVA-2 vias, com pos-hoc Newman-Keuls, valores expressos como média $\pm$ EPM.



Fonte: a autora

Com relação ao tempo de natação no pré-TNF no tempo 1 (Figura 10), o ANOVA indicou efeito significativo para a interação melanoma/propranolol [$F(2,71)=3,2622$; $p=0,04412$], porém não apresentou diferença entre os grupos testados.

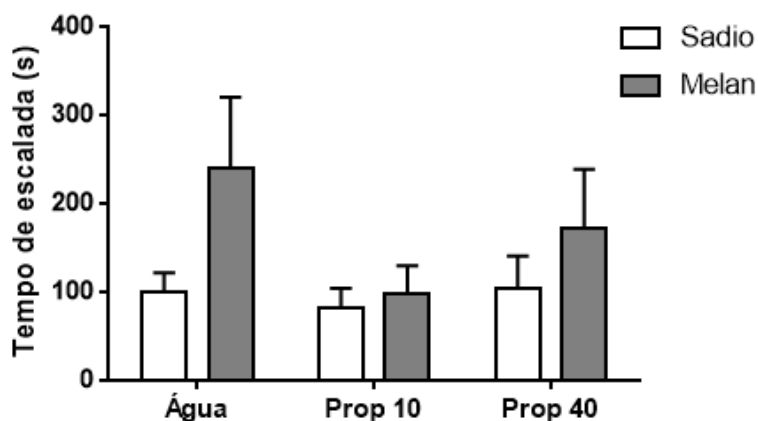
FIGURA 10. Tempo de natação (segundos) no pré-teste Nado Forçado (Tempo 1 = 5 min), realizado com camundongos C57BL6/J ($n=13$ /grupo), onde Sadio = ausência de melanoma e Melan = Portador de Melanoma, tratados com água, propranolol 10 mg e propranolol 40 mg. Os resultados foram analisados com ANOVA-2 vias, com pos-hoc Newman-Keuls, valores expressos como média $\pm$ EPM, com $*p < 0,05\%$.



Fonte: a autora

Quanto ao tempo dedicado ao comportamento de escalada no pré-TNF no tempo 1, de acordo o ANOVA, os grupos testados não apresentaram diferença significativa frente ao melanoma ou tratamentos, conforme mostrado na Figura 11.

FIGURA 11. Tempo de escalada (segundos) no pré-teste do Nado Forçado (Tempo 1 = 5 min), realizado com camundongos C57BL6/J (n=13/grupo), onde Sadio = ausência de melanoma e Melan = Portador de Melanoma, tratados com água, propranolol 10 mg e propranolol 40 mg. Os resultados foram analisados com ANOVA-2 vias, com pos-hoc Newman-Keuls, valores expressos como média $\pm$ EPM, com *p <0,05%.

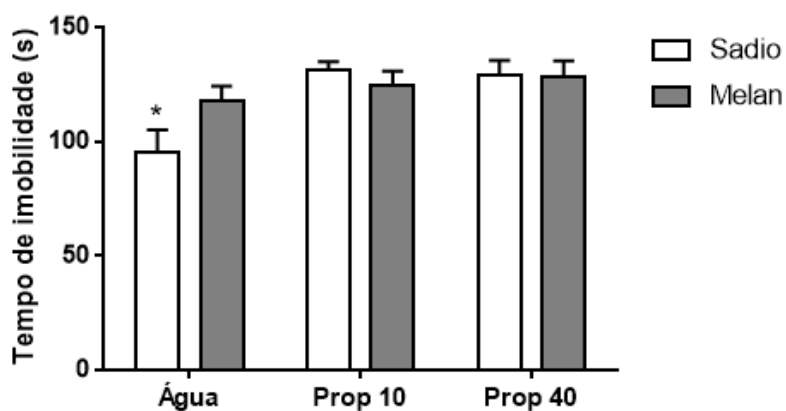


Fonte: a autora

5.2.2.2.2 Teste Nado Forçado

No Teste de Nado Forçado no tempo 1, o tempo de imobilidade foi diferente estatisticamente no grupo sadio tratado com água, sendo o efeito apresentado pelo ANOVA no propranolol [$F(2,70)=6,7865$; $p=0,00202$], conforme mostrado na Figura 12.

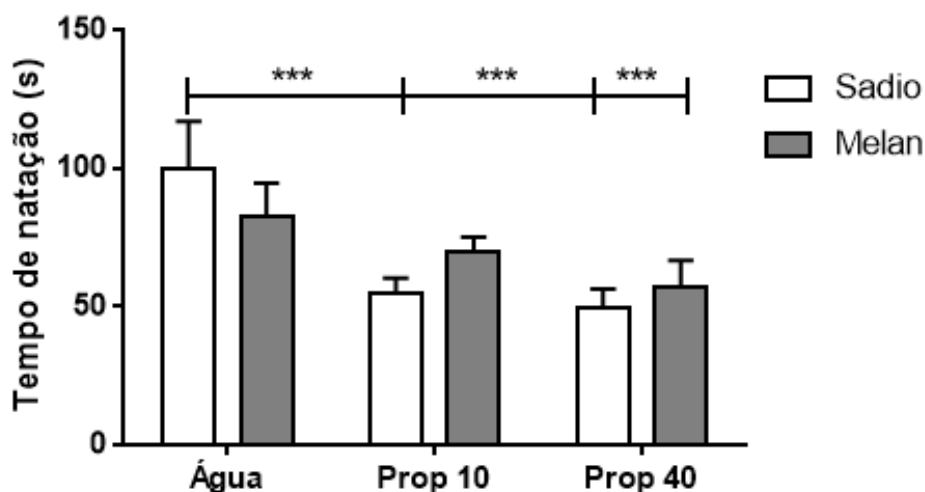
FIGURA 12. Tempo de imobilidade (segundos) no teste do Nado Forçado (Tempo 1 = 5 min), realizado com camundongos C57BL6/J (n=13/grupo), onde Sadio = ausência de melanoma e Melan = Portador de Melanoma, tratados com água, propranolol 10 mg e propranolol 40 mg. Os resultados foram analisados com ANOVA-2 vias, com pos-hoc Newman-Keuls, valores expressos como média $\pm$ EPM, com *p <0,05%.



Fonte: a autora

O tempo de natação no TNF tempo 1, segundo ANOVA-2 VIAS houve diferença estatística para o propranolol [$F(2,71)=7,6395$; $p=0,00099$], sendo o grupo portador de melanoma tratado com propranolol na dose de 40 mg, o grupo sadio tratado com propranolol na dose de 10 mg e o grupo sadio tratado com propranolol na dose de 40 mg menores que o grupo sadio tratado com água, conforme mostra a Figura 13.

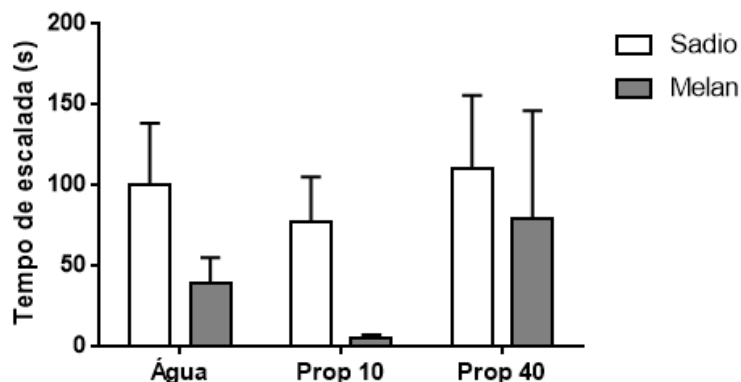
FIGURA 13. Tempo de natação (segundos) no teste do Nado Forçado (Tempo 1 = 5 min), realizado com camundongos C57BL6/J ($n=13$ /grupo), onde Sadio = ausência de melanoma e Melan = Portador de Melanoma, tratados com água, propranolol 10 mg e propranolol 40 mg. Os resultados foram analisados com ANOVA-2 vias, com pos-hoc Newman-Keuls, valores expressos como média $\pm$ EPM, com $*p < 0,05\%$.



Fonte: a autora

Quanto ao tempo dedicado ao comportamento de escalada, de acordo o ANOVA, os grupos testados não apresentaram diferença significativa frente ao melanoma ou tratamentos, conforme mostrado na Figura 14.

FIGURA 14. Tempo de escalada (segundos) no teste do Nado Forçado (Tempo 1 = 5 min), realizado com camundongos C57BL6/J (n=13/grupo), onde Sadio = ausência de melanoma e Melan = Portador de Melanoma, tratados com água, propranolol 10 mg e propranolol 40 mg. Os resultados foram analisados com ANOVA-2 vias, com pos-hoc Newman-Keuls, valores expressos como média $\pm$ EPM, com *p <0,05%.

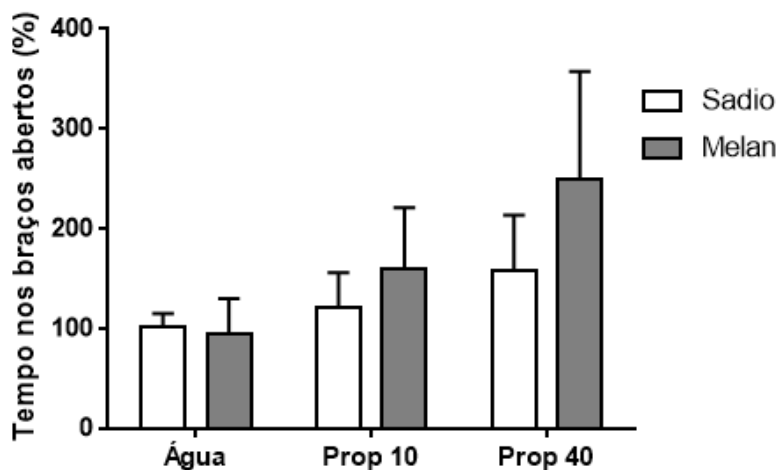


Fonte: a autora

5.2.3 Avaliação do comportamento no Labirinto em Cruz Elevado

O teste de LCE foi realizado conforme descrito no item 4.7.3. Como mostra a Figura 15, não houve diferença estatística entre o tempo gasto pelos grupos portadores de melanoma ou sadios nos braços abertos. Os dados dos números de cruzamentos nos braços abertos também foram avaliados e não apresentaram diferença estatística (Tabela 3).

FIGURA 15. Tempo gasto nos braços abertos (%) no Labirinto em Cruz Elevado (Tempo 1 = 5 min), realizado com camundongos C57BL6/J (n=13/grupo), onde Sadio = ausência de melanoma e Melan = Portador de Melanoma, tratados com água, propranolol 10 mg e propranolol 40 mg. Os resultados foram analisados com ANOVA-2 vias, com pos-hoc Newman-Keuls, valores expressos como média $\pm$ EPM.



Fonte: a autora

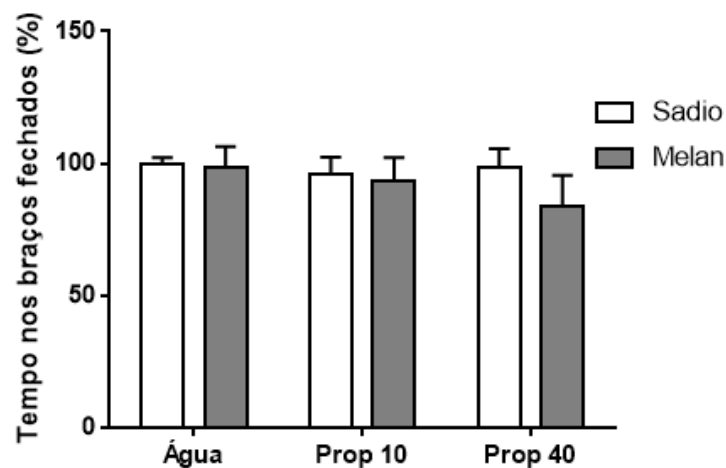
Tabela 3 - Avaliação do número de entradas nos braços abertos no labirinto em cruz elevado (5 min), tempo 1. Dados representam a média $\pm$ DP, n = 13/grupo.

Grupos	Número de entradas nos Braços Abertos		
Controle Sadio	4,85	$\pm$	2,34
Propranolol 10 mg	3,62	$\pm$	3,01
Propranolol 40 mg	4,15	$\pm$	3,74
Portador de Melanoma	3,15	$\pm$	3,29
Melanoma Propranolol 10 mg	4,77	$\pm$	3,79
Melanoma Propranolol 40 mg	4,23	$\pm$	2,68

Fonte: a autora

A Figura 16 mostra que o ANOVA-2 vias não apresentou diferença entre os grupos no tempo gasto com os braços fechados no LCE.

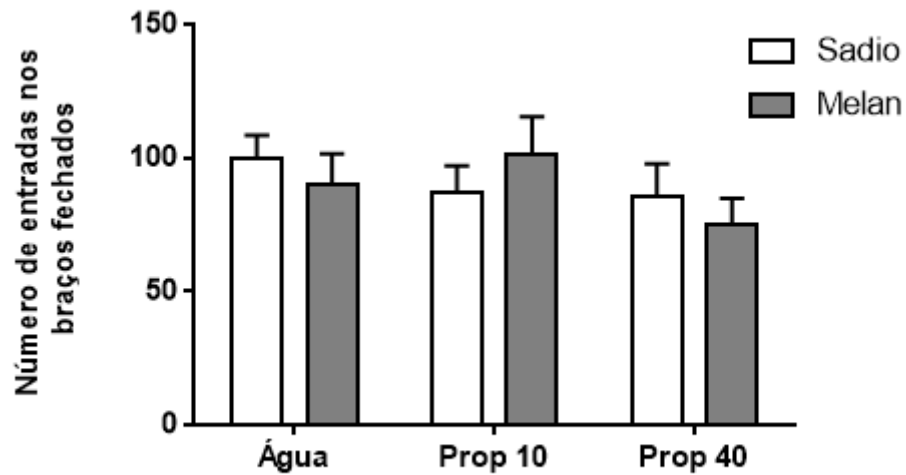
FIGURA 16. Tempo gasto nos braços fechados (%) no Labirinto em Cruz Elevado (Tempo 1 = 5 min), realizado com camundongos C57BL6/J (n=13/grupo), onde Sadio = ausência de melanoma e Melan = Portador de Melanoma, tratados com água, propranolol 10 mg e propranolol 40 mg. Os resultados foram analisados com ANOVA-2 vias, com pos-hoc Newman-Keuls, valores expressos como média $\pm$ EPM.



Fonte: a autora

De acordo com os dados, em relação ao número de entradas nos braços fechados, não houve diferença estatisticamente significativa, como pode ser observado na Figura 17.

FIGURA 17. Número de entradas nos braços fechados (n) no Labirinto em Cruz Elevado (Tempo 1 = 5 min), realizado com camundongos C57BL6/J (n=13/grupo), onde Sadio = ausência de melanoma e Melan = Portador de Melanoma, tratados com água, propranolol 10 mg e propranolol 40 mg. Os resultados foram analisados com ANOVA-2 vias, com pos-hoc Newman-Keuls, valores expressos como média $\pm$ EPM.



Fonte: a autora

Os dados de número de cruzamentos no centro foram avaliados e não apresentaram diferença significativa. Os dados são mostrados na tabela 4 a seguir.

Tabela 4 - Avaliação do número de cruzamentos no centro no labirinto em cruz elevado (5 min), tempo 1.

Dados representam a média $\pm$ DP, n = 13/grupo.

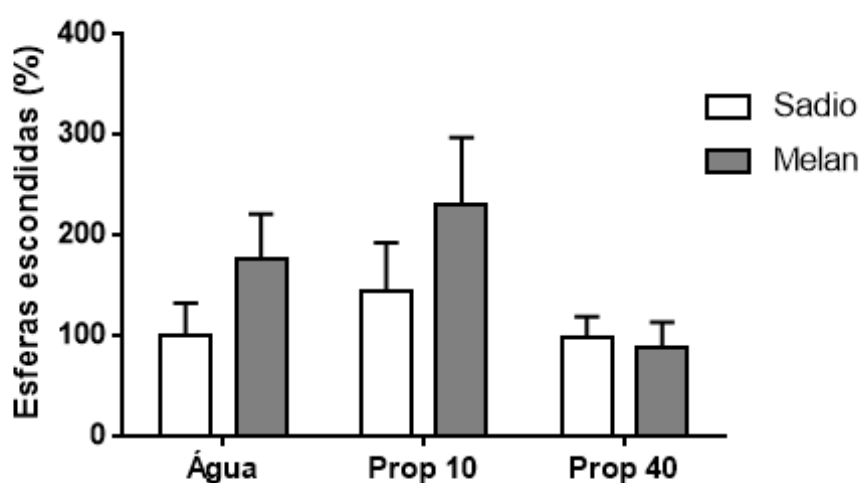
Grupos	Número de cruzamentos no Centro		
Controle Sadio	15,77	$\pm$	6,61
Propranolol 10 mg	12,46	$\pm$	4,99
Propranolol 40 mg	12,62	$\pm$	5,52
Portador de Melanoma	12,15	$\pm$	4,91
Melanoma Propranolol 10 mg	15,38	$\pm$	6,89
Melanoma Propranolol 40 mg	11,54	$\pm$	6,57

Fonte: a autora

5.2.4 Avaliação do comportamento no Teste de Esconder Esferas

O TEE foi realizado conforme descrito no item 4.7.4. O comportamento de esconder esferas não apresentou diferença estatística significativa pelo ANOVA-2 vias, como pode ser observado na Figura 18.

FIGURA 18. Comportamento no teste de esconder esferas (Tempo 1 = 20 min), realizado com camundongos C57BL6/J (n=13/grupo), onde Sadio = ausência de melanoma e Melan = Portador de Melanoma, tratados com água, propranolol 10 mg e propranolol 40 mg. Os resultados foram analisados com ANOVA-2 vias, com pos-hoc Newman-Keuls, valores expressos como média $\pm$ EPM.



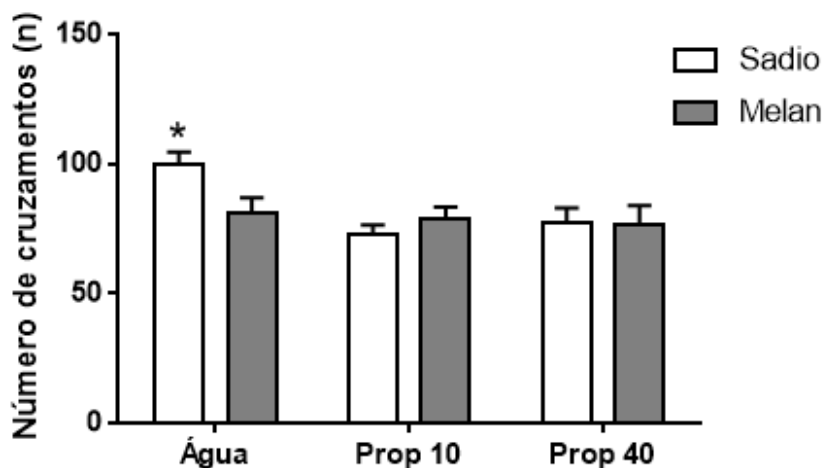
Fonte: a autora

5.2.5 Avaliação dos testes comportamentais no Tempo 2

5.2.5.1 Avaliação da atividade locomotora no Campo Aberto

Os resultados obtidos na atividade locomotora do campo aberto podem ser observados na Figura 19. Houve influência do fator propranolol na locomoção [$F(2,70)=4,9246$, $p=,00998$]. Os camundongos dos grupos propranolol (10 e 40 mg) e melanoma propranolol (10 e 40 mg) ambularam significativamente menos do que os sadios tratados com água.

FIGURA 19. Número de cruzamentos (n) totais em teste Campo Aberto (Tempo 2 = 5 min), realizado com camundongos C57BL6/J (n=13/grupo), onde Sadio = ausência de melanoma e Melan = Portador de Melanoma, tratados com água, propranolol 10 mg e propranolol 40 mg. Os resultados foram analisados com ANOVA-2 vias, com pos-hoc Newman-Keuls, valores expressos como média $\pm$ EPM.



Fonte: a autora

Os dados de tempo de permanência no centro (Tabela 5), tempo de permanência na periferia (Tabela 6), tempo de levantar (Tabela 7) e número de cruzamentos no centro (Tabela 8), foram avaliados e analisados no tempo 2, embora não tenham alcançado diferença estatística significativa.

Tabela 5 - Avaliação da atividade locomotora no centro do campo aberto (5 min), tempo 2. Dados representam a média $\pm$ DP, n = 13/grupo.

Grupos	Tempo de Permanência no Centro		
Controle Sadio	51,29	$\pm$	31,56
Propranolol 10 mg	34,94	$\pm$	18,01
Propranolol 40 mg	42,37	$\pm$	14,42
Portador de Melanoma	57,36	$\pm$	24,82
Melanoma Propranolol 10 mg	51,00	$\pm$	43,80
Melanoma Propranolol 40 mg	41,05	$\pm$	33,04

Fonte: a autora

Tabela 6 - Avaliação da atividade locomotora na periferia do campo aberto (5 min), tempo 2. Dados representam a média $\pm$ DP, n = 13/grupo.

Grupos	Tempo de Permanência na Periferia		
Controle Sadio	248,71	$\pm$	31,57
Propranolol 10 mg	265,07	$\pm$	18,01
Propranolol 40 mg	257,65	$\pm$	14,42
Portador de Melanoma	242,64	$\pm$	24,81
Melanoma Propranolol 10 mg	225,93	$\pm$	43,80
Melanoma Propranolol 40 mg	235,88	$\pm$	33,06

Fonte: a autora

Tabela 7 - Avaliação do comportamento de levantar no campo aberto (5 min), tempo 2. Dados representam a média $\pm$ DP, n = 13/grupo.

Grupos	Tempo de Levantar		
Controle Sadio	8,03	$\pm$	6,62
Propranolol 10 mg	10,17	$\pm$	9,67
Propranolol 40 mg	8,11	$\pm$	4,34
Portador de Melanoma	7,45	$\pm$	4,29
Melanoma Propranolol 10 mg	9,85	$\pm$	8,43
Melanoma Propranolol 40 mg	6,11	$\pm$	4,70

Fonte: a autora

Tabela 8 - Avaliação do número de cruzamentos no centro do campo aberto (5 min), tempo 2. Dados representam a média $\pm$ DP, n = 13/grupo.

Grupos	Número de cruzamentos no Centro		
Controle Sadio	23,15	$\pm$	9,04
Propranolol 10 mg	15,38	$\pm$	8,00
Propranolol 40 mg	17,92	$\pm$	4,96
Portador de Melanoma	19,92	$\pm$	7,44
Melanoma Propranolol 10 mg	20,08	$\pm$	8,75
Melanoma Propranolol 40 mg	19,23	$\pm$	11,92

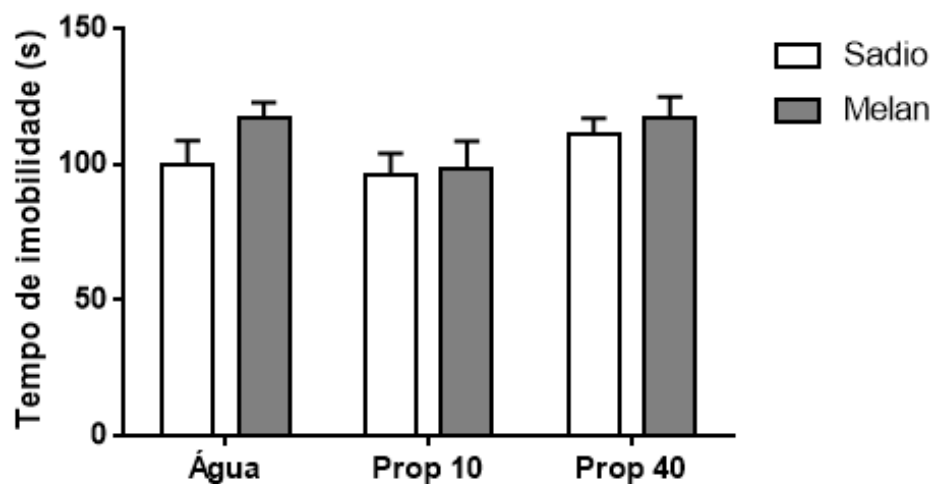
Fonte: a autora

5.2.5.2 Avaliação do comportamento animal no Nado Forçado

5.2.5.2.1 Tempo de Imobilidade

Como mostra a Figura 20, no ANOVA-2 vias não houve efeito significativo nos grupos sadios ou tratados com propranolol no comportamento de imobilidade.

FIGURA 20. Tempo de imobilidade (segundos) no teste do Nado Forçado (Tempo 2 = 5 min), realizado com camundongos C57BL6/J (n=13/grupo), onde Sadio = ausência de melanoma e Melan = Portador de Melanoma, tratados com água, propranolol 10 mg e propranolol 40 mg. Os resultados foram analisados com ANOVA-2 vias, com pos-hoc Newman-Keuls, valores expressos como média $\pm$ EPM, com *p <0,05%.

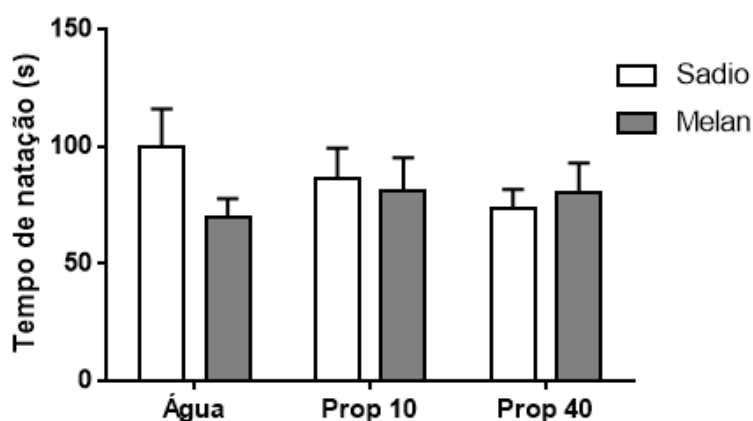


Fonte: a autora

5.2.5.2.2 Tempo de Natação

Os resultados podem ser observados na Figura 21, no qual ANOVA-2 vias não apontou efeito significativo nos grupos sadios ou tratados no tempo de natação.

FIGURA 21. Tempo de natação (segundos) no teste Nado Forçado (Tempo 2 = 5 min), realizado com camundongos C57BL6/J (n=13/grupo), onde Sadio = ausência de melanoma e Melan = Portador de Melanoma, tratados com água, propranolol 10 mg e propranolol 40 mg. Os resultados foram analisados com ANOVA-2 vias, com pos-hoc Newman-Keuls, valores expressos como média $\pm$ EPM, com *p <0,05%.

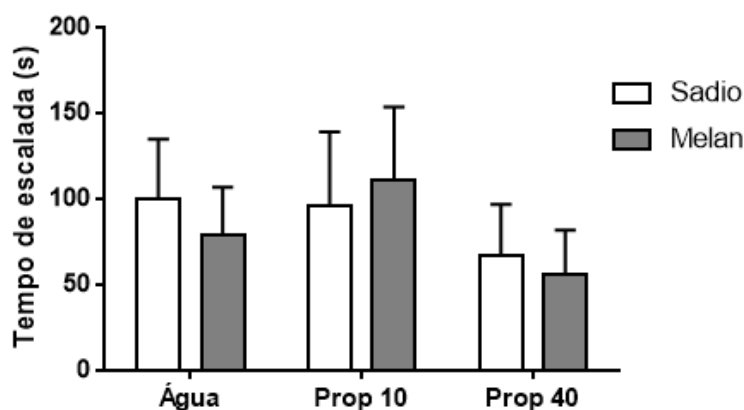


Fonte: a autora

5.2.5.2.3 Tempo de Escalada

Neste teste, o ANOVA-2 duas vias não apontou diferença estatística significativa entre os grupos testados, conforme pode ser observado na Figura 22.

FIGURA 22. Tempo de escalada (segundos) no teste do Nado Forçado (Tempo 2 = 5 min), realizado com camundongos C57BL6/J (n=13/grupo), onde Sadio = ausência de melanoma e Melan = Portador de Melanoma, tratados com água, propranolol 10 mg e propranolol 40 mg. Os resultados foram analisados com ANOVA-2 vias, com pos-hoc Newman-Keuls, valores expressos como media $\pm$ EPM.

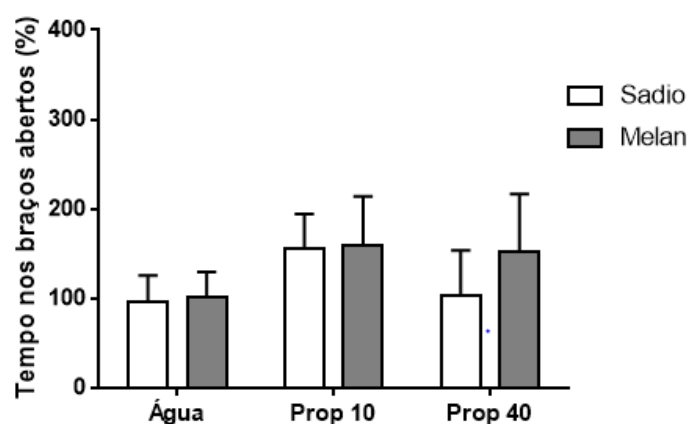


Fonte: a autora

5.2.6 Avaliação do comportamento no Labirinto em Cruz Elevado

No tempo gasto nos braços abertos quando tumor consolidado não houve diferença estatística significativa, conforme Figura 23.

FIGURA 23. Tempo gasto nos braços abertos (%) no Labirinto em Cruz Elevado (Tempo 2 = 5 min), realizado com camundongos C57BL6/J (n=13/grupo), onde Sadio = ausência de melanoma e Melan = Portador de Melanoma, tratados com água, propranolol 10 mg e propranolol 40 mg. Os resultados foram analisados com ANOVA-2 vias, com pos-hoc Newman-Keuls, valores expressos como média $\pm$ EPM.



Fonte: a autora

Com relação ao número de entradas nos braços abertos e número de cruzamentos no centro do LCE, os dados observados e analisados estão na tabela 9 e 10, respectivamente, porém não apresentaram diferença estatística.

Tabela 9 - Avaliação do número de entradas nos braços abertos no labirinto em cruz elevado (5 min), tempo 2. Dados representam a média $\pm$ DP, n = 13/grupo.

Grupos	Número de entradas nos Braços Abertos		
Controle Sadio	2,00	$\pm$	1,83
Propranolol 10 mg	2,54	$\pm$	1,76
Propranolol 40 mg	2,00	$\pm$	2,35
Portador de Melanoma	2,31	$\pm$	2,59
Melanoma Propranolol 10 mg	2,82	$\pm$	2,64
Melanoma Propranolol 40 mg	2,42	$\pm$	2,95

Fonte: a autora

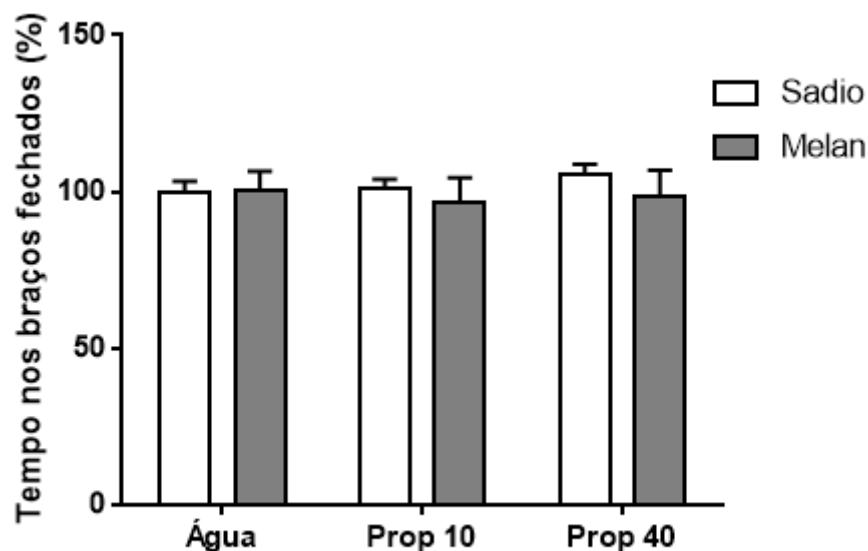
Tabela 10 - Avaliação do número de cruzamentos no centro no labirinto em cruz elevado (5 min), tempo 2. Dados representam a média $\pm$ DP, n = 13/grupo.

Grupos	Número de cruzamentos no Centro		
Controle Sadio	13,38	$\pm$	4,91
Propranolol 10 mg	11,31	$\pm$	4,07
Propranolol 40 mg	8,54	$\pm$	4,41
Portador de Melanoma	11,00	$\pm$	6,32
Melanoma Propranolol 10 mg	11,75	$\pm$	7,17
Melanoma Propranolol 40 mg	9,46	$\pm$	5,77

Fonte: a autora

Com relação ao tempo gasto nos braços fechados, para o Tempo 2, o ANOVA-2 vias não apontou diferença estatística significativa, como está mostrado na Figura 24.

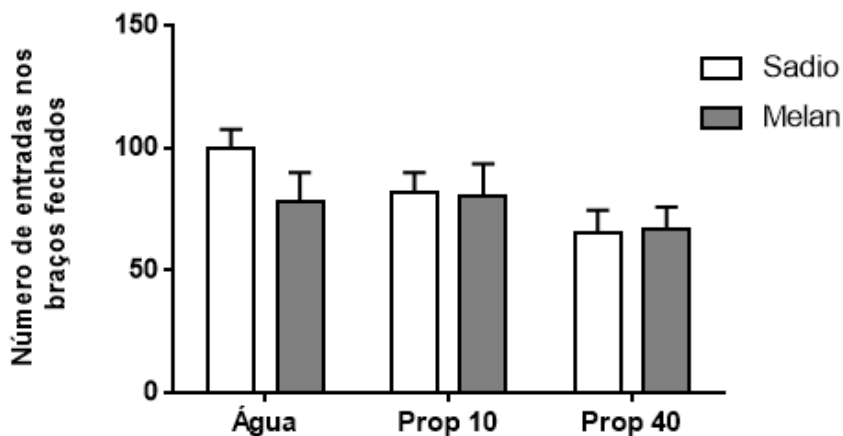
FIGURA 24. Tempo gasto nos braços fechados (%) no Labirinto em Cruz Elevado (Tempo 2 = 5 min), realizado com camundongos C57BL6/J (n=13/grupo), onde Sadio = ausência de melanoma e Melan = Portador de Melanoma, tratados com água, propranolol 10 mg e propranolol 40 mg. Os resultados foram analisados com ANOVA-2 vias, com pos-hoc Newman-Keuls, valores expressos como média $\pm$ EPM.



Fonte: a autora

Quanto ao número de entradas nos braços fechados, no Tempo 2, não houve diferença estatística significativa entre os grupos, conforme mostrado na Figura 25.

FIGURA 25. Número de entradas nos braços fechados (n) no Labirinto em Cruz Elevado (Tempo 2 = 5 min), realizado com camundongos C57BL6/J (n=13/grupo), onde Sadio = ausência de melanoma e Melan = Portador de Melanoma, tratados com água, propranolol 10 mg e propranolol 40 mg. Os resultados foram analisados com ANOVA-2 vias, com pos-hoc Newman-Keuls, valores expressos como média $\pm$ EPM.

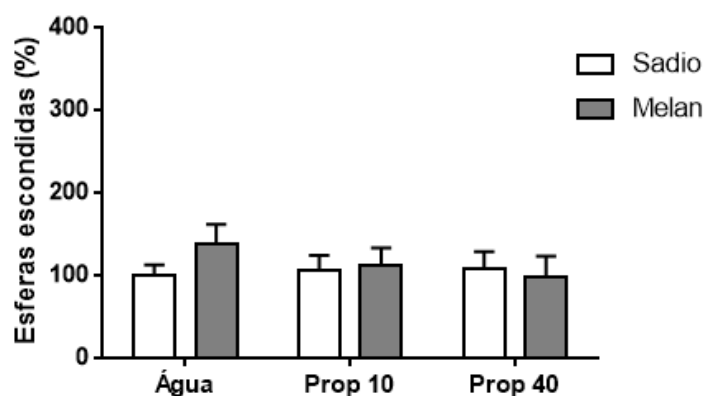


Fonte: a autora

5.2.7 Avaliação do comportamento no Teste de Esconder Esferas

Com relação ao teste de esconder esferas, tempo 2, analisado pelo ANOVA 2-vias, não foi encontrada diferença significativa, de acordo com a análise estatística realizada, como apresentado na Figura 26.

FIGURA 26. Número de esferas escondidas (n) no teste de esconder esferas (Tempo 2 = 5 min), realizado com camundongos C57BL6/J (n=13/grupo), onde Sadio = ausência de melanoma e Melan = Portador de Melanoma, tratados com água, propranolol 10 mg e propranolol 40 mg. Os resultados foram analisados com ANOVA-2 vias, com pos-hoc Newman-Keuls, valores expressos como média $\pm$ EPM.



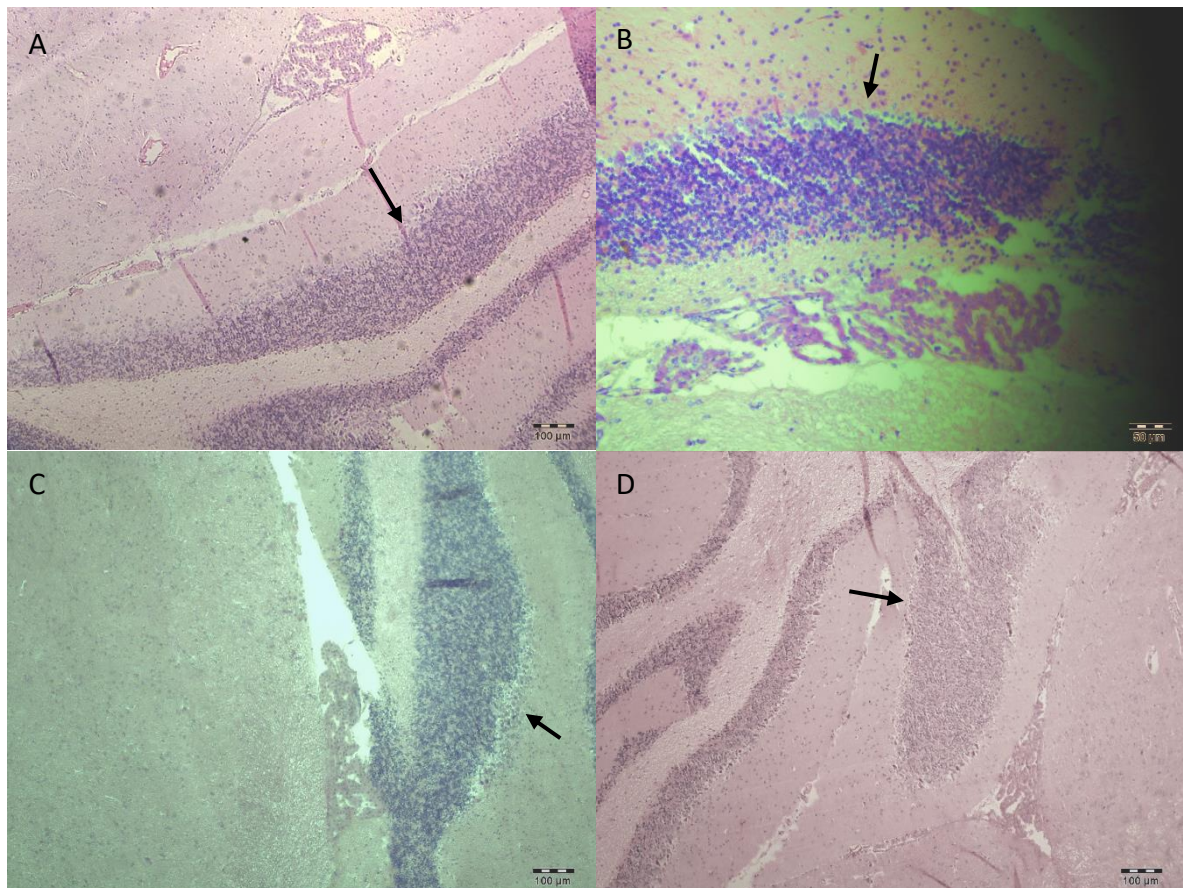
Fonte: a autora

5.3 Análise Histológica

A análise histológica foi realizada nos cérebros dos camundongos com o objetivo de identificar possíveis alterações na região onde se localiza a substância nigra decorrentes da presença do melanoma e dos tratamentos realizados com propranolol nas doses de 10 e 40 mg/kg. Há interesse nessa região devido à produção de dopamina ocorrer nessa área.

Na Figura 27 pode-se observar imagens dos cortes histológicos realizados, nos quais foi avaliada a área da substância nigra, porém não foram observadas diferenças na área calculada entre os grupos.

FIGURA 27. Micrografias de cortes histológicos de cérebros de camundongos C57BL6/J. Coloração HE. Exemplo obtido de várias amostras. (A) Grupo Propranolol 10 mg no aumento de 10 X, (B) Grupo Controle Sadio no aumento de 20 X, (C) Grupo Propranolol 40 mg no aumento de 10 X e (D) Grupo Melanoma/Propranolol 40 mg no aumento de 10 X.



6 DISCUSSÃO

Devido à etiologia multifatorial do melanoma, associação dos fatores genéticos e fatores de risco como pele clara, exposição aumentada à luz UV, desregulação do sistema imune e estresse, há necessidade de avançar no entendimento sobre a doença e tratamento, pois é uma das condições clínicas com aumento de incidência nas últimas décadas, que possui malignidade e alta letalidade (FOIATO *et al.*, 2018). Além dos agentes causadores já descritos, o fator associado que contribui com risco de desenvolvimento do melanoma é o estresse, sendo que indivíduos que possuem ocupações altamente estressantes estão mais suscetíveis ao desenvolvimento da doença (SYNNIA; DE'AMBROSIS, 2013). Em resposta ao estresse, as catecolaminas, que são os hormônios liberados pelo sistema nervoso simpático, pioram o prognóstico do portador, sendo relacionadas a aceleração da progressão do tumor e diminuição da sobrevida (LUTGENDORF; SOOD; ANTONI, 2010).

As células de melanoma são células tumorais malignas produtoras de melanina de forma exacerbada (PAN *et al.*, 2012). A função de produção de melanina em quantidades normais é cabível aos melanócitos, células originárias da crista neural que através da via da tirosinase, podem produzir, tanto catecolaminas, quanto melanina, sendo que as alterações neste processo podem dar origem ao melanoma e não há clareza total sobre esse desenvolvimento. A dopamina, agente precursor da adrenalina e noradrenalina está envolvida nos processos da doença e sua produção aumentada (MORETTI *et al.*, 2013) é uma hipótese para a alteração comportamental.

As alterações no comportamento apresentam-se como um fator adicional ao tumor com envolvimento na progressão da doença. A depressão, a ansiedade e um comportamento de arrependimento de tomadas de decisões estão presentes na maioria dos pacientes com tumores, sendo o tratamento medicamentoso necessário para 25% desses pacientes (SCHUERMEYER *et al.*, 2016). Na depressão, os sintomas são agravados por componentes inflamatórios oriundos do tumor e da reação inflamatória sistêmica (LEBEÑA *et al.*, 2014) e através de observações não quantitativas dos animais com melanoma, há a aparência de que comportam-se de maneira diferenciada dos animais controle, demonstrando agitação e inquietude constante, partindo dessa observação o interesse na aplicação dos testes comportamentais para aferição destes comportamentos.

O uso dos β -bloqueadores foi inicialmente utilizado em um estudo envolvendo hemangiomas, que provou a existência da estimulação dos receptores β -adrenérgicos nessa patologia (ERBAY *et al.*, 2010; SARIALIOGLU *et al.*, 2010) e despertou a comunidade

científica para estudos que verificassem a possibilidade do uso dos β -bloqueadores em tumores, para conter a proliferação e migração das células tumorais.

Dessa forma, elucidar o papel dos β -bloqueadores na contenção da progressão do melanoma e realizar a identificação do subtipo de receptor associado ao efeito protetor faz-se necessário através de diversos estudos (DE GIORGI *et al.*, 2018).

O antagonista não seletivo propranolol tem sido amplamente utilizado como adjuvante na terapia anti-câncer, sendo um fármaco de domínio público, de fácil acesso e custo acessível, porém sua atuação difere nos diferentes tipos de tumores testados. O melanoma é um tumor com propriedades imunogênicas e expressa os receptores α - e β -adrenérgicos, sendo $\beta 1$ e $\beta 2$ identificados em melanoma maligno (KAO; LUU, 2019) e que são ativados pelas catecolaminas durante o estresse (SANZO *et al.*, 2010). O receptor β -adrenérgico tem maior expressão no melanoma quando comparado aos outros tipos de receptores; e com maior envolvimento no efeito pró-tumorigênico das catecolaminas (MORETTI *et al.*, 2013). O receptor β -3 também está presente no tumor e células estromais, relacionado com a agressividade do melanoma (CALVANI *et al.*, 2015).

Dessa forma, no presente estudo a viabilidade celular perante o tratamento com o β -bloqueador propranolol foi avaliada *in vitro*, bem como a progressão tumoral e o comportamento foram avaliados *in vivo* nos camundongos C57BL6/J. Para a avaliação *in vitro* utilizou-se o teste de viabilidade celular MTT, que objetiva a verificação da ação do fármaco propranolol sobre a viabilidade celular. Os ensaios de toxicologia são aplicados rotineiramente em estudos *in vitro*, e dentre eles, o MTT está entre os mais comuns para a detecção de citotoxicidade ou de viabilidade celular após a exposição a substâncias tóxicas, podendo detectar sensibilidades diferentes para a mesma substância (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). Neste estudo, o propranolol limitou o crescimento das células B16F10 em quatro das concentrações utilizadas (0,3, 1, 3 e 10 mM), mostrando que a viabilidade celular diminuiu com aumento da dose, sendo que a concentração de 10 mM de propranolol foi a mais eficaz nos três tempos de tratamentos testados (24, 48 e 72 h).

Estudos semelhantes foram realizados para verificar a viabilidade celular utilizando-se o propranolol, porém, as concentrações utilizadas foram menores que as utilizadas no presente estudo, sendo de 0,01 a 10 μ M de propranolol, testadas pelo método de MTT, em células B16F10, e não ocorreu diminuição do crescimento celular em 24, 48 ou 72 horas (MACCARI *et al.*, 2017). Entretanto, no estudo com células A-375 (melanoma maligno humano), sendo a viabilidade celular testada pelo método de AlamarBlue®, utilizando-se as

concentrações de 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M e 400 μ M de propranolol, houve inibição da proliferação celular em 24, 48 e 72 h (ZHOU *et al.*, 2016).

Para a avaliação do crescimento tumoral *in vivo*, foram utilizados os camundongos C57BL6/J que possibilitam o implante de células tumorais B16F10, pois modelos murinos de melanoma predispõem melhor análise da neoplasia e de seu desenvolvimento, embora dados obtidos dessas pesquisas não possam ser extrapolados diretamente para os seres humanos. Os modelos murinos experimentais de câncer são de suma importância na compreensão da tumorigênese e do ambiente do tumor *in vivo*, e tendem a minimizar a dificuldade de avaliação de novos métodos diagnósticos e as ações terapêuticas de drogas contra tumores em pacientes (PANTALEAO; LUCHS, 2010). O uso de camundongos isogênicos, como o C57BL6/J tem como vantagem o rápido aparecimento do melanoma e como desvantagem o curto espaço de tempo entre o aparecimento das metástases, o que prejudica a análise de eficácia dos agentes antimelanoma (LIU *et al.*, 2018), devido a este fato, o tempo de duração do experimento realizado neste estudo, teve duração de 20 dias, pois neste modelo murino o tumor é 100% letal em 3 a 5 semanas (HILL, LITTLEJONH, 1971).

A utilização de camundongos machos foi preferida, devido à tendência crescente da incidência de melanoma no sexo masculino e como forma de subtrair as diferenças fisiológicas do sistema imunológico, da estrutura da pele e hormônios sexuais (ROH *et al.*, 2017); adicionalmente em testes comportamentais de nado forçado realizado e comparado entre machos e fêmeas, foram encontradas diferenças sutis nos tempos das fêmeas, atribuídos a fatores hormonais, então considerou-se que a utilização de machos garante resultados representativos para a espécie (MICHELAN *et al.*, 2006).

Em relação ao crescimento tumoral, o grupo portador de melanoma tratado com 40 mg/kg/dia de propranolol obteve crescimento tumoral diminuído diferente estatisticamente do grupo tratado com propranolol na dose de 10 mg/kg/dia e também do controle portador de melanoma não tratado com propranolol. Os resultados encontrados corroboram com os resultados obtidos com camundongos C57BL6/J portadores de melanoma implantados com células B16F10 e tratados com doses de 10, 20, 30 e 40 mg/kg de propranolol, que foi considerado como efeito positivo do tratamento na redução do volume tumoral (MACCARI *et al.*, 2017). Adicionalmente, resultados de redução tumoral também foram encontrados no estudo de Wrobel & Le Gal (2015), que mostram que o tratamento diário realizado com propranolol atrasa o desenvolvimento do tumor em camundongos imunodeficientes transplantados com linhagem de células de melanoma humano, no qual o volume tumoral foi reduzido após tratamento por dois meses com propranolol em água potável.

No crescimento do tumor, as hipóteses de que a sinalização β -adrenérgica favorece a progressão do tumor e o seu bloqueio pode desacelerar seu crescimento, confere ao melanoma resposta positiva aos β -bloqueadores, cujos alvos são β -1 e β -2, como o propranolol (DAL MONTE *et al.*, 2013; KAO; LUU, 2019). E adicionalmente, os tumores possuem inervações pós-ganglionares do sistema nervoso simpático que secretam noradrenalina quando estimulados por estresse. Com essa sinalização adrenérgica ocorre a progressão do tumor e metástases (ASCIERTO *et al.*, 2019). Os hormônios do estresse: ACTH, noradrenalina e corticosterona foram encontrados em quantidades aumentadas no plasma de camundongos implantados com células B16F10 quando comparados à plasma de camundongos sadios (VALLES *et al.*, 2013).

As hipóteses apontam que a progressão do tumor é devido a ação da noradrenalina, que regula o crescimento através da diminuição das respostas imunes antitumorais, contribuindo para o acúmulo de células imunossupressoras e perturbando a função dos linfócitos. Com o uso do propranolol ocorre redução na infiltração de células mieloides como neutrófilos no microambiente tumoral e desencadeia um controle maior do tumor através do acúmulo de células citotóxicas (WROBEL *et al.*, 2016). Os estudos também mostraram que o uso de β -bloqueador não seletivo obteve maior eficácia na sobrevida de portadores de melanoma quando comparado à pacientes que utilizaram bloqueador β 1 ou que não utilizaram β -bloqueador (KOKOLUS, 2017).

Devido aos resultados obtidos com o uso do propranolol *in vitro*, estudos pré-clínicos que utilizam o fármaco foram desenvolvidos, nos quais houve diminuição do crescimento do tumor, redução das metástases e redução de efeitos tóxicos nas células tumorais, devido à inibição da estimulação da noradrenalina em câncer ovariano, de cólon, pâncreas e adenocarcinoma pulmonar (SOOD *et al.*, 2006, GUO *et al.*, 2009, ISERI *et al.*, 2014). Di Giorgi e colaboradores (2018) foram os primeiros a estudar o uso de betabloqueadores em pacientes com melanoma.

Com relação aos testes comportamentais, vários modelos são utilizados para determinação de ansiedade e depressão em animais, porém essas metodologias possuem algumas limitações, já que alguns comportamentos parecem ser intrinsecamente próprios aos animais, como exemplo a ansiedade, característica de perfil humano, podendo ser somente modelada em animais (MARTIN, 1998); mas com o avanço no entendimento da neurobiologia da ansiedade e desenvolvimento de novos fármacos, os modelos de ansiedade têm sido aplicados em murinos com segurança. Nestes modelos, os animais são expostos à estímulos externos capazes originar comportamentos defensivos, e esses comportamentos podem ser antagonizados por fármacos ansiolíticos, onde a ansiedade pode ser medida como uma antecipação emocional em resposta

ao sentimento de aversão, um comportamento não-controlável (LACERDA, 2006). Além disso, há hipóteses de que os receptores da neurotransmissão noradrenérgica (α e β -adrenérgicos), estejam envolvidos no transtorno de ansiedade em reações defensivas (SOUZA, 2016). Quanto ao comportamento depressivo, ele pode apresentar-se como: depressão reativa, a qual ocorre em resposta a um fato desfavorável, ou depressão endógena, quando trata-se de um transtorno psiquiátrico (TEIXEIRA-SILVA *et al.*, 2006). A depressão e o estresse foram relacionados com a progressão tumoral em estudos clínicos (SANSO *et al.*, 2010) e esses dois fatores foram associados à progressão do melanoma cutâneo em estudos *in vitro* (GLASNER *et al.*, 2010).

Dessa forma, os testes comportamentais foram realizados neste estudo e, em modelos murino, eles são aplicados em conjunto para que possam representar resultados verdadeiros, com ausência de resultados falso-positivos. Os testes comportamentais apresentaram variabilidade interindividual, que pode ser observada através dos erros-padrão apresentados, embora tenham sido realizados em ambiente e horários adequados, com padronização da metodologia, porém sem isolamento acústico.

No teste do campo aberto ou “open field” são verificados os movimentos de exploração (movimentos sem deslocamento, como levantar ou realizar a autolimpeza) e locomotores (deslocamentos dentro do campo) e têm importância na avaliação de fármacos ansiolíticos ou psicoestimulantes (EILAM, 2003). Neste estudo, utilizou-se a arena quadrada e os movimentos locomotores foram avaliados (tempo de permanência no centro e na periferia e número de cruzamentos totais) e como atividade exploratória o tempo de levantar. Na tomada de tempo 1, considerado tumor inicial, os grupos não apresentaram diferença estatística no número de cruzamentos totais. Não havendo efeito significativo neste parâmetro, é comprovada a ausência de comprometimento motor dos animais, sendo os resultados dos testes comportamentais realizados na sequência podem ser considerados validados.

Com relação ao tempo gasto no centro do campo aberto, ocorreu interação entre as variáveis melanoma e tratamento com significância estatística, porém não foram observadas diferenças entre os grupos testados, não permitindo sugerir um efeito ansiolítico neste teste comportamental.

Outro teste utilizado foi o teste do nado forçado, que é amplamente utilizado devido à facilidade de execução, resultados confiáveis em diferentes laboratórios e aplicável a várias classes de antidepressivos (CRYAN; LUCKI, 2000). No presente estudo, no pré-teste nado forçado no tempo 1, apesar de uma aparente maior agitação no início do teste, na avaliação em 5 minutos não houve diferença entre os grupos nos tempos de imobilidade e escalada. A agitação inicial é logo substituída por movimentos de menor vigor, que apenas os mantêm na

superfície da água, impedindo o afogamento (PORSOLT *et al.*, 1977). Neste modelo experimental clássico, a imobilidade é interpretada como comportamento de desesperança, um sintoma depressivo comum em pacientes, além de que a maioria dos antidepressivos, reduz a imobilidade, estimulando o comportamento ativo (LUCKI *et al.*, 1997).

No TNF em tempo 1, quando determinado o tempo de imobilidade, do ponto de vista estatístico foi encontrada diferença no comportamento, pois todos os grupos tratados com propranolol e o grupo controle melanoma obtiveram maiores tempos de imobilidade quando comparados ao controle sadio tratado com água, indicando um efeito tipo-depressivo. Como consequência disso, o grupo controle sadio apresentou o maior tempo no comportamento de natação, sendo diferente estatisticamente dos outros grupos que dispensaram mais tempo na manutenção do comportamento de imobilidade. O re-teste ou teste, propriamente dito, foi realizado no dia subsequente ao treino do TNF, sob as mesmas condições, exceto tempo de duração menor. O tempo de imobilidade pode ser interpretado como ausência comportamental ou abandono aprendido (BARROS; FERIGOLO, 1998), com possibilidade de variar, bem como seu significado adaptativo, considerando o modelo experimental utilizado (CALIL *et al.*, 2002). Apesar do teste de natação forçada ser amplamente utilizado nos estudos de antidepressivos em roedores, a imobilidade definida como principal medida do comportamento vem sendo discutida em estudos que a relacionam com a memória aprendida resultante do estado de estresse, da extinção de fuga (CAMPUS *et al.*, 2015). É possível que o propranolol afete mais de uma via de sinalização, e que doses mais altas desse fármaco causem efeito simpatolítico central não específico, tendo como consequências, além do efeito hipotensor, também a diminuição da atividade nervosa simpática central (MACCARI *et al.*, 2017). Adicionalmente podem ser considerados os efeitos colaterais do propranolol como a depressão e outros: diminuição da energia, a fadiga, a anorexia, a diminuição da libido, e a baixa concentração, também acredita-se que o β -bloqueador propranolol possa causar um distúrbio do humor orgânico, resultando em um quadro deprimido (PATTEN, 1990). Além disso, foi observada relação positiva entre fadiga e depressão, os pacientes que possuem escalas maiores de depressão também apresentaram maiores escalas de fadiga (SALVETTI *et al.*, 2020).

Já o comportamento ativo de natação é indicador de luta (LUCKI *et al.*, 1997), embora o nado faça parte dos comportamentos defensivos, essa defesa é de natureza distinta, podendo, portanto, possuir origens filogenéticas baseadas em mecanismos neurais distintos (MICHELAN *et al.*, 2006).

No tempo de escalada, no TNF, o comportamento entre os grupos não apresentou diferença estatística, possivelmente devido a ação do antagonista noradrenérgico empregado.

Os antidepressivos noradrenérgicos e serotoninérgicos influenciam de maneira diferenciada o comportamento de escalada e de natação nos modelos murinos. O sistema serotoninérgico é melhor representado na ação de natação do TNF, enquanto os fármacos antidepressivos noradrenérgicos demonstram atuar no comportamento de escalada (DETKE; RICKELS; LUCKI, 1995), isso pode ser importante para distinguir esses comportamentos (BARROS; FERIGOLO, 1998). No presente estudo, os grupos não apresentaram diferença estatística no comportamento de escalada. Os receptores β -adrenérgicos estão fortemente envolvidos no comando da transmissão noradrenérgica: controle da síntese e liberação de noradrenalina; na regulação das respostas para noradrenalina; e podem regular a liberação de outros neurotransmissores e aumentam as atividades de escalada e natação simultaneamente (YIN; GUVEN; DIETI, 2016). Os hormônios do estresse, principalmente a noradrenalina estão aumentados no ambiente tumoral (YANG *et al.*, 2009). Analisando os tempos dos movimentos realizados, é percebido que não houve alteração no comportamento de escalada, o que pode ser avaliado como consequência do tratamento realizado.

Outro teste comportamental aplicado, o teste labirinto em cruz elevado expõe o animal a um comportamento considerado como uma avaliação de risco, que está relacionado com a hipervigilância presente nos indivíduos ansiosos (BLANCHARD *et al.*, 2001). A avaliação de risco simboliza uma antecipação à potencial situação de perigo, comportamento defensivo com valor adaptativo na tentativa de antecipar a ameaça para melhor lidar com ela, comportamento que é visível com mais frequência em indivíduos ansiosos (LACERDA, 2006). Sendo assim, prevenindo o comportamento ansioso, os animais tendem a explorar os braços abertos do labirinto, permanecer mais tempo nesses braços e aumentar o número de vezes que entram nesse ambiente, reduzindo a aversão natural e promovendo a exploração (BADGUJAR; SURANA, 2010). Em decorrência da exposição a ambientes novos surgem as reações defensivas e de medo, que são semelhantes às reações humanas em transtornos de ansiedade (LACERDA, 2006). Nos roedores, em situações de estresse, as respostas psicológicas ocorrem para afastá-los do perigo. O olfato é o responsável por gerar o estado de alerta e pode garantir a sobrevivência. Os sinais oriundos do bulbo olfatório, dirigem-se ao trato olfatório e seguem ao córtex olfatório, local onde existem neurônios noradrenérgicos, colinérgicos e serotoninérgicos. Odores aversivos ao atingirem o córtex olfatório originam sinais para amígdala resultando em comportamentos de medo ou fuga no animal (ZABORSZKY *et al.*, 1986), portanto relaciona-se ao movimento ou controle motor. Áreas da amígdala e o hipotálamo têm influência no conteúdo da memória e auxiliam na elaboração dos planos mentais de resposta aos agentes do estresse e são moduladas pela via adrenérgica central e periférica (MARGATHO; PALERMO

NETO, 2016). Neste estudo, quanto ao tempo de permanência nos braços abertos e quanto ao número de entradas nos braços abertos não houve diferença do ponto de vista estatístico entre os grupos testados. Quanto ao tempo de permanência nos braços fechados, e número de entradas nesses braços, não houve diferença estatística significativa entre os grupos. A permanência nos braços fechados no labirinto em cruz elevado representa a atividade locomotora dos animais e pode ser utilizado como confirmação da atividade locomotora do teste do campo aberto. Essa informação confirma que não houve prejuízo na atividade locomotora dos animais no tempo 1, devido à ausência de diferença entre os grupos tanto no teste do campo aberto, quanto no teste do labirinto em cruz elevado.

Com relação ao teste de esconder esferas, que tem como finalidade realizar uma triagem ansiolítica; o teste vem sendo utilizado com bons resultados em ratos e camundongos (HAYASHI *et al.*, 2010), nele os camundongos utilizam o movimento de cavar e tentam esconder as esferas, inócuas, na maravalha, demonstrando um comportamento defensivo; quando estes se encontram em estado menos ansioso, diminuem o número de esferas escondido (BARRETA *et al.*, 2012). Os fármacos utilizados em transtornos de ansiedade, independente do mecanismo de ação, têm apresentado perfil ansiolítico neste teste e sem causar prejuízos à atividade locomotora (HAYASHI *et al.*, 2010). No teste de esconder esferas não foi encontrada diferença estatística significativa no tempo 1, não sendo o tratamento com propranolol capaz de interferir na ação de esconder esferas nos grupos tratados sadios ou portadores, retratando um estado não ansioso devido à presença do melanoma.

O teste de esconder esferas possui bom valor preditivo, mas recomenda-se que seja utilizado mais de um modelo de ansiedade para evitar que possam ser obtidos resultados falso-positivos (BOURIN *et al.*, 2007; CRYAN; SWEENEY, 2011), por isso o teste do labirinto em cruz elevado foi aplicado concomitantemente neste estudo, que é o modelo mais utilizado para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade (PELLOW *et al.*, 1985). Em estudo relacionado à abstinência de cocaína, no teste de LCE, o propranolol usado como controle na dose de 10 mg/kg apresentou resultados aumentados em relação ao controle salina para os tempos: permanência dos braços abertos, número de entradas nos braços abertos e porcentagem de entrada nos braços abertos e diminuiu a ação de enterramento no teste de esconder esferas (CITÓ *et al.*, 2012). Esses resultados não corroboram com os encontrados no presente estudo em relação ao propranolol nos grupos sadios.

No tempo 2, quando o tumor está consolidado e o fármaco utilizado cronicamente, os testes comportamentais foram reaplicados com intuito de avaliar as diferenças entre os tempos e evolução tumoral. O teste de campo aberto, no tempo 2, revelou diminuição da atividade

locomotora nos grupos sadios tratados com propranolol e nos grupos portadores de melanoma tratados com água e com as doses de 10 mg/kg/dia e 40 mg/kg/dia de propranolol, diferentes estatisticamente do grupo controle sadio, o que interfere na análise de resultados de comportamento no tempo 2, não permitindo compreender se as diferenças encontradas são oriundas do comportamento depressivo ou ansioso, ou ao fato da motilidade estar comprometida. Esse resultado corrobora com o de Sun e colaboradores (2011) que ao realizar tratamento com 10 mg/Kg de propranolol em camundongos, observou a diminuição da locomoção e o aumento a autolimpeza.

O propranolol, quando aplicado como controle em animais na dose de 10 mg/Kg, em estudo de investigação da abstinência causada por cocaína, conseguiu reduzir a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto (CITÓ *et al.*, 2012). E quando utilizado na dose de 20 mg/Kg no teste de campo aberto por 5 dias consecutivos, a motilidade foi diariamente sendo reduzida (ANGRINI; LESLIE; SHEPHARD, 1997), possibilitando avaliar a interferência do uso crônico do fármaco na redução da locomoção no campo aberto. Pode-se considerar ainda que os animais tratados com propranolol quando reinseridos em um ambiente que deveria ser familiar, comportam-se como se não conhecessem aquele local e mais estudos são necessários para verificar a influência dos adrenoreceptores na memória de curto prazo (KEMP; MANAHAN-VAUGHAN, 2008). O propranolol possui eficácia reconhecida sobre o sistema circulatório, atravessa a barreira hematoencefálica devido à porção lipofílica da molécula (WEBB; FISCHER; ROTHWELL, 2011) e quando utilizado nos transtornos circulatórios podem ocorrer efeitos adversos neurológicos mais comuns como: sonolência e alterações motoras (fadiga, lassidão) e são bem mais raros os efeitos de alucinações e confusões mentais, desorientações de tempo e espaço, confusão cognitiva e depressão mental (LACY *et al.*, 2006), porém podem ocorrer, demonstrando que o β -bloqueador interfere na atividade autonômica periférica e no SNC, justificando seu uso em transtornos de ansiedade devido a diminuição de efeitos como taquicardia, tremores e palpitações.

Além disso, o propranolol, através do bloqueio β -adrenérgico, pode provocar sintomas semelhantes ao estado depressivo (letargia, distúrbios do sono: insônia e pesadelos) (BORTOLOTO; CONSOLIM-COLOMBO, 2009), que pode ter contribuído para redução da motilidade com o uso crônico do medicamento. Uma outra hipótese considerada, seria a de que o tumor consolidado teria interferido no sistema motor dos animais, já que o grupo controle portador também apresentou redução da motilidade.

A fim de encontrar dados que pudessem complementar o entendimento dos dados desse estudo obtidos nos testes comportamentais, os cérebros dos camundongos foram utilizados após

o sacrifício para observação através dos cortes histológicos, nos quais foi observada a região da substância nigra.

A via dopaminérgica central principal origina-se na região chamada *pars compacta* da substância nigra e são os neurônios desse local que são projetados ao corpo estriado (LENT, 2010). Na ocorrência de perda dos neurônios dopaminérgicos, ocorre diminuição da dopamina e surgem os sintomas de desordem neurológica (MARTINEZ *et al.*, 2004). A dopamina é a substância mediadora dos processos de recompensa e cognição (STUCHLIK *et al.*, 2007) e nos mamíferos, os neurônios dopaminérgicos encontram-se principalmente na substância nigra (MARGATHO; PALERMO NETO, 2016). A tempos a dopamina está relacionada ao controle de movimentos e sua depleção associada aos déficits motores que ocorrem na doença de Parkinson (BERNHEIMER; HORNYKIEWICZ, 1965). Também está associada em uma série de doenças psiquiátricas e neurológicas como: hiperatividade, déficit de atenção e esquizofrenia (ARIAS-CARRIÓN *et al.*, 2010).

Estudos têm abordado a importância dos neurônios dopaminérgicos em ações que envolvem apresentação ou omissão associados à estímulos exteroceptivos. Os neurônios dopaminérgicos poderiam estar relacionados, portanto com alterações em processos cognitivos que envolvam atenção, emoção e aprendizado (SCHULTZ; DAYAN; MONTAGUE, 1997; TAVARES; JUDICE-DAHER; BUENO, 2019) e estudos avaliaram alterações nestas regiões em ratos com lesões no SNC nas regiões dopaminérgicas e os efeitos nos comportamentos de memória espacial e motivação motora (ÁVILA *et al.*, 2009). No presente estudo, a região da substância nigra não apresentou diferença entre os grupos analisados.

7 CONCLUSÃO

- a) A viabilidade celular foi diminuída na linhagem celular de melanoma murino B16F10 com o uso de propranolol nas concentrações de 0,3, 1,0 3,0 e 10 mM em 24, 48 e 72 horas.
- b) Houve redução do volume tumoral em camundongos C57BL6/J com o tratamento de propranolol na dose de 40 mg/Kg/dia por 15 dias.
- c) Não houve alteração na região da substância nigra nos cortes histológicos.
- d) Ocorreu comportamento tipo-depressivo no teste de nado forçado possivelmente devido ao melanoma e tratamento realizado com propranolol nas doses de 10 mg/Kg/dia e 40 mg/Kg/dia no Tempo 1.
- e) Houve redução na atividade locomotora no teste de campo aberto nos animais no Tempo 2, que prejudicou a análise do seu efeito comportamental.
- f) Não ocorreu comportamento tipo-ansioso nos testes realizados nem efeito ansiolítico do tratamento realizado com propranolol nas doses de 10 mg/Kg/dia e 40 mg/Kg/dia e houve alteração da motilidade em alguns testes.

REFERÊNCIAS

- ABDIN, A. A.; SOLIMAN, N. A.; SAIED, E. M. Effect of propranolol on IL-10, visfatin, Hsp70, iNOS, TLR2, and survivin in amelioration of tumor progression and survival in Solid Ehrlich Carcinoma-bearing mice, **Pharmacological Reports**, v. 66, n. 6, p. 1114–1121, 2014.
- AL-WADEI, H.A. *et al.* Gamma-amino butyric acid inhibits the nicotine-imposed stimulatory challenge in xenograft models of non-small cell lung carcinoma. **Current Cancer Drug Targets**, v. 12, p. 97–106, 2012.
- ANGRINI, M., LESLIE, J. C., SHEPHARD, R. A. Effects of Propranolol, Buspirone, pCPA, Reserpine, and Chlordiazepoxide on Open-Field Behavior. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 59, p. 387–397, 1998.
- ARIAS-CARRIÓN, O. Dopaminergic reward system: a short integrative review. **International Archives of Medicine**, v. 3, n. 24, 2010.
- ASCIERTO, P.A. *et al.* Perspectives in melanoma: meeting report from the Melanoma Bridge. **Journal of Translational Medicine**, v. 17, n. 234, 2019.
- AVILA, I. *et al.* Modeling operant behavior in the Parkinsonian rat. **Behavioural Brain Research**, v. 198, p. 298–305, 2009.
- BADGUJAR, V. B.; SURANA, S. J. Anxiolytic effects of Dolichandrone falcata Seem., Bignoniaceae, stem-bark in elevated plus maze and marble burying test on mice. **The Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 5, p. 773-780, 2010.
- BALDWIN, K. J.; ZIVKOVIC, S. A.; LIEBERMAN, F. S., Neurologic Emergencies in Patients Who Have Cancer: Diagnosis and Management, **Neurologic Clinics**, v. 30, n.1, p. 101–128, 2012.
- BARETTA, I.P. *et al.* Anxiolytic-like effects of acute and chronic treatment with Achillea millefolium L. extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 46-54, 2012.
- BARROS, H. M. T., FERIGOLO, M. Ethopharmacology of imipramine in the forced-swimming test: gender differences. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 2, p. 279-286, 1998.
- BEUTEL, M. E. *et al.* Depression, anxiety and quality of life in long-term survivors of malignant melanoma: a register-based cohort study. **PLoS One**, v. 10, n. 1, 2015.
- BERNHEIMER, H., HORNYKIEWICZ, O. Decreased homovanillic acid concentration in the brain in parkinsonian subjects as an expression of a disorder of central dopamine metabolism. **Klinische Wochenschrift**, v. 43, n. 13, p. 711-715, 1965.
- BLACK, J.W.; DUNCAN, W.A.M.; SHANKS, R.G. Comparison of some properties of pronethalol and propranolol. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 25, p. 577–591, 1965.

BLANCHARD, C. *et al.* Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 205- 218, 2001.

BROEKKAMP, C. L. *et al.* Major tranquilizers can be distinguished from minor tranquilizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 126, n. 3, p. 223- 229, 1986.

BORTOLOTTI, L. A.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M. Betabloqueadores adrenérgicos. **Revista Brasileira Hipertensão**, v. 16, n. 4, p. 215 - 220, 2009.

BOURIN, M. *et al.* Animal models of anxiety in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 21, p. 567–574, 2007.

BOURNEUF, E. **The MeLiM Minipig: An Original Spontaneous Model to Explore Cutaneous Melanoma Genetic Basis.** *Front Genet*, v. 8, n. 146, 2017.

BUITRAGO, E. *et al.* Are Human Tyrosinase and Related Proteins Suitable Targets for Melanoma Therapy? **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 27, p. 3033-3047, 2016.

BUCSEK, M. J. *et al.* β -Adrenergic signaling in mice housed at standard temperatures suppresses an effector phenotype in CD8⁺ T cells and undermines checkpoint inhibitor therapy. **Cancer Research**, v. 77, p. 5639–51, 2017.

BYLUND, D. B. *et al.* IV International Union of pharmacology nomenclature of adrenoceptors. **Pharmacological Reviews**, v. 46, n. 2, p. 121–136, 1994.

CALIL, C. M. *et al.* Análise do significado do tempo de imobilidade em modelos experimentais de natação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, 2002.

CALVANI, M. *et al.* Norepinephrine promotes tumor microenvironment reactivity reactivity through β 3-adrenoreceptors during melanoma progression. **Oncotarget**, v. 6, n. 7, p. 4615–32, 2015.

CAMPUS, P. *et al.* Evidence for the involvement of extinction-associated inhibitory learning in the forced swimming test. **Behavioural Brain Research**, v. 278, p. 348–355, 2015.

CANDIDA, T. *et al.* Evaluation of antitumoral and antimicrobial activity of Morinda citrifolia L. grown in Southeast Brazil. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 10-14, 2014.

CHANG, P.-Y. *et al.* Propranolol Reduces Cancer Risk: A Population-Based Cohort Study. **Medicine**, v. 94, n. 27, p. 1097, 2015.

CITÓ, M. C. O. *et al.* Reversal of cocaine withdrawal-induced anxiety by ondansetron, buspirone and propranolol. **Behavioural Brain Research**, v. 231, p. 116-123, 2012.

COLE, S. W.; SOOD, A. K. Molecular pathways: beta-adrenergic signaling in cancer. **Clinical Cancer Research**, v.18, p. 1201–1206, 2012.

COSTA, A. P. R. **Estudos da estrutura comportamental de camundongos nos testes de nado forçado e da suspensão pela cauda.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

CORICOVAC, D. *et al.* Cutaneous Melanoma-A Long Road from Experimental Models to Clinical Outcome: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, 2018.

CRUZ, A.P.M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. Em: J. Landeira-Fernandez e Sérgio Fukusima (org), **Métodos em Neurociência**. São Paulo: Manole, p. 192 – 217, 2012.

CRYAN, J. F.; LUCKI, I. Antidepressant-like behavioral effects mediated by 5-hydroxytryptamine 2C receptors1. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 295, p. 1120-1126, 2000.

CRYAN, J.F.; SWEENEY, F. F. The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, p. 1129-1161, 2011.

DAL MONTE, M. *et al.* Functional involvement of b3-adrenergic receptors in melanoma growth and vascularization. **Journal of Molecular Medicine**, v. 91, p. 1407–19, 2013.

DE BROUWER, G.; WOLMARANS, D. W. Back to basics: A methodological perspective on marble-burying behavior as a screening test for psychiatric illness. **Behavioural Processes**. 2018.

DE GIORGI, V. *et al.* β -blockers: a new and emerging treatment for melanoma. **Recenti Progressi in Medicina**, v. 103, n. 1, p. 11–6, 2012.

DEGROOT, A., NOMIKOS, G. Fluoxetine disrupts the integration of anxiety and aversive memories. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, p.391-400, 2005.

DETKE, M. J., RICKELS, M., LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology**. 121, 66-72, 1995.

DRELL, T.L. *et al.* Effects of neurotransmitters on the chemokinesis and chemotaxis of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 80, p. 63–70, 2003.

EILAM, D. Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. **Behavioural Brain Research**, v. 142, p. 53–62, 2003.

ERBAY, A. *et al.* Propranolol for infantile hemangiomas: A preliminary report on efficacy and safety in very low birth weight infants. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v. 52, p. 450–6, 2010.

ERLICH, T. H.; FISHER, D. E. Pathways in melanoma development. **Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia**, v. 15, n. 1, p. 68-76, 2018.

ESPARZA, M. M. *et al.* Transforming Growth Factor-b1 Inhibits Basal Melanogenesis in B16/F10 Mouse Melanoma Cells by Increasing the Rate of Degradation of Tyrosinase and

Tyrosinase-related Protein-1, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 7, p. 3967–3972, 1997.

FAIÃO-FLORES, F.; SMALLEY, K. S. M. Get with the Program! Stemness and Reprogramming in Melanoma Metastasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, n. 1, p. 10-13, 2018.

FAWZY, I. *et al.* Malignant Melanoma Effects of an Early Structured Psychiatric Intervention, Coping, and Affective State on Recurrence and Survival 6 Years Later. **JAMA Psychiatric**, v. 50, n. 9, 1993.

FERNANDES, E. V. *et al.* Efeitos Comportamentais e Imunológicos da Fluoxetina em Ratos Submetidos ao Nado Forçado, **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 28, n. 4, 2012.

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

FLAHERTY, K. T.; HODI, F.S., FISHER, D.E. From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 5, p. 349–361, 2012.

FOIATO, T. F. *et al.* Analysis of patients diagnosed with primary cutaneous melanoma in the last six years in Hospital Erasto Gaertner: epidemiologic profile. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 93, n. 3, p. 332-336, 2018.

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.

FONTANELLA, B. J. B. Ansiedade social e abuso de propranolol: relato de caso. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. 4, 228-230, 2003.

FRANK, N. Y. *et al.* ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. **Cancer Research**, v. 65, n.10, p. 4320–4333, 2005.

GARCIA, A. *et al.* Estado mutacional de BRAF y parámetros histopatológicos en melanoma maligno cutáneo. **Medicina (B. Aires)**, v. 79, n. 4, p. 265-270, 2019.

GLASNER, A. *et al.* Improving survival rates in two models of spontaneous postoperative metastasis in mice by combined administration of a β -adrenergic antagonist and a cyclooxygenase-2 inhibitor. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 5, p. 2449-2457, 2010.

GUO, K. *et al.* Norepinephrine-induced invasion by pancreatic cancer cells is inhibited by propranolol. **Oncology Reports**, v. 22, p. 825–30, 2009.

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

HAGENBUCH, N., FELDON, J., YEE, B. K. Use of the elevated plus-maze test with opaque or transparent walls in the detection of mouse strain differences and the anxiolytic effects of diazepam. **Behavioural Pharmacology**, v. 17, n.1, p. 31-41, 2006.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, p. 385-403, 1934.

HAYASHI, E. *et al.* Pharmacologically distinctive behaviors other than burying marbles during the marble burying test in mice. **Pharmacology**, v. 86, p. 293-296, 2010.

HERING, D.; LACHOWSKA, K.; SCHLAICH, M. Role of the sympathetic nervous system in stress-mediated cardiovascular disease. **Current Hypertension Reports**, v.17, p. 80, 2015.

HERLYN, M.; FUKUNAGA-KALABIS, M., What is a good model for melanoma? **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 4, p. 911-2, 2010.

HILL, G. J., LITTLEJONH, K. B16 melanoma in C57 black 6J mice: kinetics and effects of heterologous serum. **Journal of Surgical Oncology**, v. 3, n. 1, 1971.

HIROBE, T. *et al.* Stimulation of the proliferation and differentiation of mouse pink-eyed dilution epidermal melanocytes by excess tyrosine in serum-free primary culture. **Journal of Cellular Physiology**, v. 19, n. 2, p. 162-72, 2002.

HOOGDUIJN, M. J. *et al.* Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H₂O₂-induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca²⁺. **Experimental Cell Research**, v. 294, n.1, p. 60-67, 2004.

HUIXU, X. *et al.* Chronic stress promotes oral cancer growth and angiogenesis with increased circulating catecholamine and glucocorticoid levels in a mouse model. **Oral Oncology**, v. 51, n. 11, p. 991–997, 2015.

İŞERI, Ö. D. *et al.* Beta-Adrenoreceptor antagonists reduce cancer cell proliferation, invasion, and migration, **Journal Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 11, p. 1374-1381, 2014.

ISLAM, M. P. Neurocutaneous melanosis. In: ISLAM, M. P.; ROACH, E. S. **Neurocutaneous Syndromes**. 3. ed. USA: **Handbook of Clinical Neurology**, p. 111–117, 2015.

IVANOV, V. N.; HEI, T. K. Regulation of viability, differentiation and death of human melanoma cells carrying neural stem cell biomarkers: a possibility for neural trans-differentiation. **Apoptosis**, v. 20, n. 7, p. 996–1015, 2015.

JANIK, M. E. *et al.* Diversified β -2-adrenergic Receptor Expression and Action in Melanoma Cells. **Anticancer Research**, v. 37, n. 6, p. 3025–3033, 2017.

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

KADEKARO, A. L. *et al.* Significance of the melanocortin 1 receptor in regulating human melanocyte pigmentation, proliferation, and survival. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 994, p. 359–365, 2003.

KALUEFF, A. V.; WHEATON, M.; MURPHY, D. L. What's wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression. **Behavioural Brain Research**, v. 179, p. 1-18, 2007.

KAO, J., LUU, B. Can propranolol prevent progression of melanoma? **Journal of the American Academy of Physician Assistants**, v. 32, n. 6, p. 1-5, 2019.

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

KEDIA, S., CHATTARJI, S. Marble burying as a test of the delayed anxiogenic effects of acute immobilisation stress in mice. **Journal Neuroscience Methods**, v. 233, p. 150-154, 2014.

KEILHOLZ, U. *et al.* Dacarbazine, Cisplatin, and Interferon-Alfa-2b With or Without Interleukin-2 in Metastatic Melanoma: A Randomized Phase III Trial (18951) of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n.27, p. 6747-6755, 2005.

KEMP, A., MANAHAN-VAUGHAN, D. Beta-adrenoreceptors comprise a critical element in learning-facilitated long-term plasticity. **Cerebral Cortex**, v. 18, p. 1326-1334, 2008.

KOKOLUS, K. M. *et al.* Beta blocker use correlates with better overall survival in metastatic melanoma patients and improves the efficacy of immunotherapies in mice. **Oncoimmunology**, v. 7, 2017.

KUBERA, M. *et al.* Stimulatory effect of antidepressant drug pretreatment on progression of B16F10 melanoma in high-active male and female C57BL/6J mice, **Journal of Neuroimmunology**, v. 240-241, p. 34-44, 2011.

KUMARI, N. *et al.* N. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. **Tumour Biology**, v. 37, n. 9, p. 11553-11572, 2016.

KUNISADA, T. *et al.* The stemness of neural crest cells and their derivatives. **Birth Defects Research C Embryo Today**, v. 102, n. 3, p. 251-62, 2014.

KRIZANOVA, O.; BABULA, P.; PACAK, K. Stress, catecholaminergic system and cancer. **Stress**, v. 19, n. 4, p. 419-428, 2016.

LACERDA, G. F. M. L. Ansiedade em modelos animais: efeito de drogas nas dimensões extraídas da análise fatorial. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, 2006.

LACY, C. F. *et al.* Drug Information Handbook International. 14. ed. Hudson: Lexi-Comp. Inc, **American Pharmaceutical Association**, 2006.

LAMKIN, D.M. *et al.* Chronic stress enhances progression of acute lymphoblastic leukemia via b-adrenergic signaling. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 26, p. 635-41, 2012.

LEBEÑA, A. *et al.* Melanoma tumors after proinflammatory cytokine production and monoamine brain function, and induce depressive-like behavior in male mice, **Behavioural Brain Research**, v. 272, p. 83–92, 2014.

LEE, N.; BARTHEL, S. R.; SCHATTON, T. Melanoma stem cells and metastasis: mimicking hematopoietic cell trafficking? **Laboratory Investigation**, v. 94, n. 1, p. 13–30, 2014.

LENT, R. **100 Bilhões de Neurônios: conceitos fundamentais de Neurôciências**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2010.

LISTER, R. G. The use of a plus maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 180-185, 1987.

LIU, Q. *et al.* Targeted drug delivery to melanoma. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 127, p. 208-221, 2018.

LUCHS, Adriana; PANTALEAO, Claudia. Apoptose e modelos in vivo para estudo das moléculas relacionadas a este fenômeno. **Einstein (São Paulo)**, São Paulo, v. 8, n. 4, p. 495-497, 2010.

LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behavioral Pharmacology**, v. 8, p. 523–532, 1997.

LUTGENDORF, S. K., SOOD, A. K., ANTONI, M. H. Host factors and cancer progression: biobehavioral signaling pathways and interventions. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 28, n. 26, p. 4094–4099, 2010.

MACCARI, S. *et al.* Biphasic effects of propranolol on tumour growth in B16F10 melanoma-bearing mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 2, p. 139–149, 2017.

MANU, P.; ROGOZEA, L. M. Propranolol for Angina Pectoris. **American Journal of Therapeutics**, v. 23, n. 6, p. 1285–1286, 2016.

MARGATHO, R. O.; PALERMO NETO, J. **Efeitos de beta-bloqueadores sobre parâmetros comportamentais e imunes no modelo de coabitação com parceiros doentes**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

MARTÍ, J., ARMARIO, A. Effects of diazepam and desipramine in the forced swimming test: influence of previous experience with the situation. **European Journal of Pharmacology**, v. 236, n. 2, p. 295-299, 1993.

MARTIN, P. Animal models sensitive to anti-anxiety agents. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, 1998.

MARTINEZ, H. J. *et al.* Actividad motora espontánea y Catecolaminas en Cerebro de ratones negros C57BL/6 y albinos tratados con Manganeso. **Investigacion Clinica**, v. 45, n. 1, p. 3-15, 2004.

MELO, I. S.; GONÇALVES, V.; ANJOS, R. Propranolol nos hemangiomas infantis: casuística nacional com 30 doentes. **Acta Pediátrica Portuguesa**, v. 43, p. 190-4, 2012.

MERVIC, L. Prognostic factors in patients with localized primary cutaneous Melanoma. **Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica**, v. 21, n. 2, p. 27-31, 2012.

MICHELAN, C. M. *et al.*, Imobilidade Tônica e Imobilidade do Nado Forçado em Cobaias, **Revista de Etologia-Faculdade de Ciências Universidade Estadual Paulista**, v. 8, n. 2, p. 89-95, 2006.

MORETTI, S. *et al.* Beta-adrenoceptors are upregulated in human melanoma and their activation releases protumorigenic cytokines and metalloproteases in melanoma cell lines. **Laboratory Investigation**, v. 93, p. 279–290, 2013.

MOUSSAS G.I., *et al.*, Psychological and psychiatric problems in cancer patients: relationship to the localization of the disease. **Psychiatrik**, v. 23, n.1, p. 46-60, 2012.

NAVES, L.B., *et al.* Nanotechnology for the treatment of melanoma skin cancer. **Progress in Biomaterials**, v. 6, n. 1-2, p. 13-26, 2017.

NARDI, A. E. O tratamento farmacológico da fobia social, **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, n. 4, 249-257.

OLIVEIRA, I. de O.; JUNIOR, A. H. L. Conhecimentos atuais sobre a biologia dos melanócitos no folículo piloso humano **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 3, p. 331-343, 2003.

PALUNCIC, J. *et al.* Roads to Melanoma: Key Pathways and Emerging Players in Melanoma Progression and Oncogenic Signaling, **Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 4, p. 770-784, 2016.

PAN. T. *et al.* The Role of Alpha-Synuclein in Melanin Synthesis in Melanoma and Dopaminergic Neuronal Cells. **Plos One**, v. 7, n. 9, 2012.

PANTALEAO, C.; LUCHS, A. Câncer e modelos experimentais de tumores murinos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 4, 2010.

PARDOLL, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**. v. 12, n. 4, p. 252–264, 2012.

PATTEN, S. B. Propranolol and depression: evidence from the antihypertensive trials. **Canadian Journal of Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 257–9, abr. 1990.

PELLOW, S. *et al.* **Journal Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149, 1985.

PERRON, L. *et al.* Antihypertensive drug use and the risk of prostate cancer (Canada). **Cancer Causes Control**, v. 15, n. 6, p. 535-41, 2004.

PIRES, L. Optical strategies for diagnosis and treatment of melanoma. (Tese Doutorado) Instituto de Física de São Carlos, USP - São Carlos, 2017.

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.

PREZIOSO, J. A. *et al.* Enhancement of pulmonary metastasis formation and gamma-glutamyltranspeptidase activity in B16 melanoma induced by differentiation *in vitro*. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 11, n. 3, p. 263-74, 1993.

PORSOLT, R. D., LePICHON, M., JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-32, 1977.

RICO, J. L.; BONUTI, R.; MORATO, S. The elevated gradient of aversion: a new apparatus to study the rat behavior dimensions of anxiety, fear, and impulsivity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 52, n. 11, 2019.

ROH, M. R. *et al.* Cutaneous melanoma in women. **Journal of Women's Dermatology**, v. 3, p. 11–15, 2017.

SALVETTI, M. G. *et al.* Prevalence of symptoms and quality of life of cancer patients. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 73, n. 2, 2020.

SANZO, M. *et al.* Stress as a possible mechanism in melanoma progression. **Dermatology Research and Practice**, n. 2, p. 483-493, 2010.

SARIALIOGLU, F.; ERBAY, A.; DEMIR, S. Response of infantile hepatic hemangioma to propranolol resistant to high-dose methylprednisolone and interferon- α therapy. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 55, p. 1433–4, 2010.

SCARPARO, A. C. *et al.* Adrenoceptors in normal and malignant human melanocytes, **Archives of Dermatological Research**, v. 292, n. 5, p. 265–267, 2000.

SCHALLREUTER, K. U. *et al.* Calcium transport and regulation in human primary and metastatic melanoma. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1160, p. 127–133, 1992a.

SCHALLREUTER K. U. *et al.* Production of catecholamines in the human epidermis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 189, p. 72–78, 1992b.

SCHUCHTER, L. M. Review of the AJCC staging system for cutaneous malignant melanoma. **Current Oncology Reports**, v. 3, n. 4, p. 332-337, 2001.

SCHUERMEYER, I. *et al.* Depression, Anxiety, and Regret Before and After Testing to Estimate Uveal Melanoma Prognosis. **JAMA Ophthalmology**, v. 134, n. 1, p. 51, 1 jan. 2016.

SCHULLER, H. M., *et al.* Regulation of pancreatic cancer by neuropsychological stress responses: a novel target for intervention. **Carcinogenesis**, v. 33, p. 191–6, 2012.

SCHULTZ, W., DAYAN, P., MONTAGUE, P. R. A neural substrate of prediction and reward. **Science**, v.275, p. 1593–1599, 1997.

SEKINE, Y. *et al.* STAP-2 Protein Expression in B16F10 Melanoma Cells Positively Regulates Protein Levels of Tyrosinase, Which Determines Organs to Infiltrate in the Body. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 28, p.17462-73, 2015.

SIMÃO, D. A. S. *et al.* Qualidade de vida, sintomas depressivos e de ansiedade no início do tratamento quimioterápico no câncer: desafios para o cuidado. **Enfermagem em Foco**, v. 8, n. 2, p. 82-6, 2017.

SLOAN, E. K. *et al.* The sympathetic nervous system induces a metastatic switch in primary breast cancer. **Cancer Research**, v. 70, n. 18, p. 7042-7052, 2010.

STUCHLIK, A. *et al.* Morris water maze learning in Long-Evans rats is differentially affected by blockade of D1-like and D2-like dopamine receptors. **Neuroscience Letters**, v. 422, n. 3, p. 169-74, 2007.

SLOMINSKI, A.; PAUS, R. Towards defining receptors for L-tyrosine and L-dopa. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 99, n.2, p. 7-11. 1994.

SLOMINSKI, A. *et al.* Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiological reviews**, v. 84, n. 4, p. 1155-1228, 2004.

SOOD, A. K. *et al.* Adrenergic modulation of focal adhesion kinase protects human ovarian cancer cells from anoikis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 1515–1523, 2010.

SOOD, A. K. *et al.* Stress hormone-mediated invasion of ovarian cancer cells. **Clinical Cancer Research's**, v. 12, p. 369–75, 2006.

SOUZA, D. **Participação de receptores noradrenérgicos na substância cinzenta periaquedutal dorsal na modulação de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade.** (Dissertação de Mestrado) - Ciências Farmacêuticas-Universidade Federal Do Espírito Santo, 2016.

SINNYA, S.; DE'AMBROSIS, B. Stress and melanoma: increasing the evidence towards a causal basis. **Archives of Dermatological Research**, v. 305, n. 9, p. 851–856, 6 nov. 2013.

ŠITUM, M. *et al.* Melanoma - Clinical, dermatoscopical, and histopathological morphological characteristics. **Acta Dermatovenereologica Croatica**, v. 22, n. 1, p. 1–12, 2014.

SUN, H. *et al.* Effects of beta-adrenergic antagonist, propranolol on spatial memory and exploratory behavior in mice Huaying. **Neuroscience Letters**, v. 498, p. 133–137, 2011.

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

TADAIESKY, M.T.; ANDREATINI, R.; VITAL, M.A. Different effects of 7-nitroindazole in reserpine-induced hypolocomotion in two strains of mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 535, p. 199-207, 2006.

TALARICO, G. *et al.* Aspirin and atenolol enhance metformin activity against breast cancer by targeting both neoplastic and microenvironment cells. **Scientific Reports**, n. 6, 2016.

TANG, J. *et al.* Beta-Adrenergic system, a backstage manipulator regulating tumour progression and drug target in cancer therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 23, p. 533–542, 2013.

TAVARES, T. F.; JUDICE-DAHER, D. M.; BUENO, J. L. O. Reinforcement omission effects in rats with bilateral lesions in the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 52, n. 7, 2019.

THAKER, P.H.; SOOD A.K. Neuroendocrine influences on cancer biology. **Seminars in Cancer Biology**, v. 18, p. 164–170, 2008.

TEIXEIRA-SILVA, C. *et al.* **Métodos para avaliar drogas antidepressivas. In: ALMEIDA, R. N., Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 262–274, 2006.

TORRES, L. G.; MARADEI, S.; TABAK, D. E. Complicações neurológicas no paciente oncológico. **Revista Onco &**, 2012.

TSUJI, M. *et al.* β -Adrenergic receptors of B16 melanoma cell. **Archives of Dermatological Research**, v. 275, n. 6, p. 415–416, 1983.

UONG, A., ZON, L. I. The stemness of neural crest cells and their derivatives. **Journal of Cellular Physiology**. V. 222, n.1, p. 38–41, 2010.

VALLES, S. L. *et al.* Stress hormones promote growth of B16-F10 melanoma metastases: an interleukin 6- and glutathione-dependent mechanism. **Journal of Translational Medicine**, v. 11, n. 1, p. 72, 2013.

XU, T. *et al.* Antiangiogenic effect of propranolol on the growth of the neuroblastoma xenografts in nude mice. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 48, n. 12, p. 2460–2465, 2013.

WALKER, G. J., HAYWARD, N. K. Pathways to melanoma development: Lessons from the mouse. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 119, p. 783–792, 2002.

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, N., HEBERT, D. N. Tyrosinase maturation through the mammalian secretory pathway: bringing color to life. **Pigment Cell Research**, v. 19, n. 1, p. 3–18, 2006.

WEBB, A. J. S., FISCHER, U., ROTHWELL, P. M. Effects of blocker selectivity on blood pressure variability and stroke: a systematic review. **Neurology**, v. 77, n. 8, p. 231–7, 2011.

WEINSTEIN D. *et al.* Diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. **Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v.7, n. 6, p.13–24, 2014.

WROBEL, L. J.; GAL, F. A. L. Inhibition of Human Melanoma Growth by a Non-Cardioselective β -Blocker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 2, p. 525–531, 2015.

WROBEL, L. J. *et al.* Propranolol induces a favourable shift of anti-tumor immunity in a murine spontaneous model of melanoma. **Oncotarget**, v. 7, p. 77825–77837, 2016.

YAJIMA, I.; LARUE L. The location of heart melanocytes is specified and the level of pigmentation in the heart may correlate with coat color. **Pigment Cell and Melanoma Research**. v. 21, n. 4, p. 471–476, 2008.

YANG, E. *et al.* Norepinephrine upregulates VEGF, IL-8, and IL-6 expression in human melanoma tumor cell lines: Implications for stress-related enhancement of tumor progression. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 23, p. 267–275, 2009.

YANG, E. V. Role for catecholamines in tumor progression Possible use for β -blockers in the treatment of cancer. **Cancer Biology & Therapy**, v. 101, p. 30–32, 2010.

YANG, M. *et al.* Hippocampal dysfunctions in tumor-bearing mice, **Brain, Behavior and Immunity**, v. 36, p. 147–155, 2014.

YIN, X.; GUVEN, N.; DIETIS, N. Stress-based animal models of depression: Do we actually know what we are doing? **Brain Research**, v. 1652, p. 30–42, 2016.

ZÁBORSZKY, L. *et al.* Cholinergic and GABAergic afferents to the olfactory bulb in the rat with special emphasis on the projection neurons in the nucleus of the horizontal limb of the diagonal band. **Journal of Comparative Neurology**, v. 243, n. 4, p. 488–509, 1986.

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.

ZHU, S. *et al.* A genomic screen identifies TYRO3 as a MITF regulator in melanoma. **National Academy of Sciences of the United States of America**, v.106, p.17025–30, 2009.

ZHOU, C. *et al.* Propranolol induced G0/G1/S phase arrest and apoptosis in melanoma cells via AKT/MAPK pathway. **Oncotarget**, v. 7, n. 42, p. 68314–68327, 2016.

ANEXO - CARTA DE APROVAÇÃO CEUA

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 – 002/2017

Protocolo UEPG – 16209/2016

Título – "Projeto de pesquisa "Avaliação do propranolol na via da tirosinase e as consequências sobre a produção de catecolaminas e o comportamento animal em um modelo murino". **Interessado –** Prof. Dr. Giovani Marino Fávero

Data de Entrada – 27/09/2017

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – 17/02/2017 a 17/02/2019

Considerações

Professor Giovani Marino Fávero (DEBIO, gmfavero@yahoo.com.br)

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 24 (vinte e quatro) camundongos isogênicos (12 fêmeas e 12 machos) de 6 a 8 semanas, com peso de 20-30 gramas.

Ponta Grossa, 17 de fevereiro de 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CEUA - Comissão de Ética do Uso de Animal

Dra. Daniele Xavier Scarpieri
Coordenadora da Comissão de Ética no UEPG - Pontal CEUA-UEPG

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, n° 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa - Paraná
Beco da Reitoria - anexo a PROESP
Fone: (042) 3220-3264