UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS: FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA

Efeito do tratamento com células-tronco em modelos animais para melanoma: uma revisão sistemática seguida de meta-análise

Marcos Freitas Cordeiro

Dissertação defendida no âmbito do programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profª. Drª. Ana Paula Horn

Rio Grande – RS
2016

Efeito do tratamento com células-tronco em modelos animais para melanoma: uma revisão sistemática seguida de meta-análise

MARCOS FREITAS CORDEIRO

Dissertação defendida no âmbito do programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profª. Drª. Ana Paula Horn

Rio Grande, abril de 2016

“He who receives an idea from me, receives instruction himself without lessening mine;
as he who lights his taper at mine, receives light without darkening me.”

Trecho de carta de Thomas Jefferson a Isaac McPherson (12 de Agosto de 1813)

Sumário

1. Resumo geral.....5
2. Introdução.....6
2.1. Melanoma.....6
2.2. Células-tronco e células estromais mesenquimais multipotentes.....19
2.3. Meta-análises para ensaios pré-clínicos.....23
2.4. Justificativa.....25
3. Objetivo.....25
4. Metodologia.....26
4.1. Revisão sistemática.....26
4.2. Meta-análise.....29
5. Manuscrito.....35
6. Discussão geral.....68
7. Bibliografia geral.....71

1. Resumo geral

O melanoma é o mais agressivo dentre os tipos de câncer de pele, levando à morte em 20% dos casos. Apesar de poder ser tratado com sucesso quando nos estágios iniciais, o melanoma carece de terapias eficientes e seguras a partir da observação de processos metastáticos. Por esta razão, muitos grupos têm focados seus esforços no desenvolvimento de terapias mais direcionadas, que possam interagir somente com as células cancerosas. Dentre estas, está a terapia celular com células-tronco. Esta abordagem tem como base o fato dessas células indiferenciadas possuírem forte tropismo a células cancerosas, podendo ser empregadas como carreadoras direcionadas de agentes antitumorais, como fármacos, citocinas, genes, entre outros. Entretanto, os efeitos resultantes da interação entre células-tronco com as células do melanoma ainda não são bem compreendidos, e este conhecimento é fundamental para atestar a segurança desse tipo de intervenção. Assim sendo, o trabalho desenvolvido se propôs a uma revisão sistemática seguida de meta-análise englobando todos ensaios *in vivo* disponíveis testando células-tronco de qualquer tipo em modelos animais para melanoma. A busca sistemática retornou 494 ocorrências únicas, das quais 11 se demonstraram elegíveis para a meta-análise. Em todos artigos, os testes foram realizados em camundongos, e as células carreadoras testadas foram invariavelmente células estromais mesenquimais multipotentes (*mesenchymal stromal cells*, MSCs), ou advindas de tecido adiposo ou de medula óssea. As células tumorais utilizadas foram ou da linhagem B16 (B16-F0 e B16-F10) ou derivadas de melanomas humanos (A375 e M_4Beu). O protocolo de coinjeção foi o adotado em todos trabalhos selecionados, no qual as MSCs são misturadas com as células tumorais para injeção simultânea, que em todos casos se deu pela via subcutânea. Dados referentes à incidência do tumor e sua dinâmica de crescimento foram extraídos e analisados a partir da razão de chances e da padronização das médias por G de Hedges, respectivamente. De modo geral, a partir de meta-análise por efeitos aleatórios, os resultados obtidos sugerem que MSCs advindas de tecido adiposo ou medula óssea são pró-carcinogênicas quando coadministradas com células tumorais em camundongos, sendo isto verdade tanto em modelos de transplante singênico quanto de xenogênico.

Palavras-chave: células estromais mesenquimais, melanoma, meta-análise, terapia celular.

2. Introdução

2.1. Melanoma

O melanoma é o mais agressivo dentre os tipos de câncer de pele. É um neoplasma maligno derivado da proliferação descontrolada de melanócitos, que são células situadas em contato com a lâmina basal da epiderme (LINARES; ZAKARIA; NIZRAN, 2015). O processo proliferativo patológico geralmente é consequência de uma série de mutações que culminam no acúmulo de oncogenes, inativação de genes antitumorais e deficiência na capacidade reparadora de DNA.

Estima-se que aproximadamente 90% dos casos de melanoma sejam decorrentes da exposição excessiva aos raios solares, por conta da radiação ultravioleta (UV), presente nesses raios (GALLAGHER et al., 2010). Apesar da sujeição parcimoniosa aos raios solares estar associada a importantes efeitos benéficos (como a síntese de vitamina D), a exposição mais intensa pode culminar em efeitos mutagênicos (RIVAS et al., 2015). Os riscos aumentam em casos de exposições isoladas de grande intensidade (IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, 2012), sendo ainda maiores quando culminam em queimaduras (GANDINI et al., 2005a). Inclusive, a frequência de exposições intensas e de queimaduras ao longo do histórico de vida aumentam os riscos de forma cumulativa (DENNIS et al., 2008).

A função dos melanócitos é a produção de melanina, um pigmento bastante eficiente na absorção de luz e, consequentemente, na dispersão de raios UV. Assim sendo, a melanina atua como um protetor solar natural, protegendo a pele da radiação incidente (MEREDITH; RIESZ, 2004). Interessantemente, o principal estímulo para a produção da melanina é exatamente a exposição aos raios UV, sendo o bronzeamento da pele um sinal visual do aumento em sua produção. Acredita-se ser o efeito protetor da melanina o responsável pela fraca associação da exposição moderada crônica aos raios UV como um fator de risco para o melanoma, dado que a pele se torna mais protegida (GANDINI

et al., 2005a). De fato, as chances para desenvolver melanoma em áreas geralmente não expostas é maior (CAINI et al., 2009), assim como também o são em pessoas com pele mais clara e maior dificuldade para adquirir bronzeamento (USHER-SMITH et al., 2014). A exposição crônica, porém, é mais difícil de avaliar, e os estudos disponíveis não estão livres de possíveis artefatos. Afinal, a exposição crônica resulta na presença de queratoses solares, que têm forte associação positiva com o risco para o desenvolvimento de melanoma (BATAILLE et al., 1998).

O número de nevos e suas características denotam predisposição ao melanoma. Através de uma meta-análise, Gandini *et al*., (2005b) puderam estimar que indivíduos com mais de 100 nevos comuns chegam a apresentar risco sete vezes maior de desenvolver melanoma se comparados com pessoas com menos de 15 nevos. No mesmo estudo foi também observado que pacientes com dois nevos atípicos têm risco dobrado de desenvolver a doença, enquanto pacientes com cinco ou mais têm o risco sextuplicado (GANDINI et al., 2005b).

Como também ocorre com outros tipos de tumores, a idade avançada também representa um fator de risco. Este efeito é resultado do enfraquecimento do sistema imunológico, que também tem como consequência o desenvolvimento de tumores mais agressivos do que os observados em indivíduos mais jovens (SCHLOTTMANN et al., 2015). Entretanto, a idade média para o diagnóstico do melanoma é de 57 anos, o que é quase uma década antes de outros tipos comuns de tumor, como câncer de mama e de pulmão (SCHADENDORF et al., 2015).

Várias características genéticas já foram fortemente correlacionadas com o risco de desenvolvimento de melanomas (POTRONY et al., 2015). Não surpreendentemente, alguns dos genes mais importantes identificados estão associados com a regulação da pigmentação (BISHOP, 2005). Assim como é observado em outros tipos de tumor, a predisposição para o desenvolvimento da doença é aumentada com a presença de histórico parental, com aproximadamente 10% das ocorrências

ocorrendo em contexto familiar (POTRONY et al., 2015). Fatores genéticos também fazem com que diferentes subtipos de melanoma tenham ocorrência diferenciada entre diferentes grupos étnicos (FENG; ZHANG; WU, 2013).

A incidência para o melanoma, bem como sua taxa de mortalidade, é notavelmente variável por disposição geográfica (Figura 1) (FERLAY et al., 2013). A heterogeneidade não se explica somente pela predisposição genética de cada grupo étnico, mas também pelo *status* socioeconômico de cada país. Por exemplo, a doença é mais frequentemente diagnosticada onde as políticas de prevenção são mais eficientes. De fato, em países desenvolvidos, a maioria dos melanomas são diagnosticados em estágio inicial (0 e I), com menos de 1 mm de espessura e confinados na epiderme, sendo os estágios mais avançados observados em apenas 15-20% dos casos (DE ANGELIS et al., 2014). Ao longo das últimas décadas, foi observado um aumento dramático na ocorrência de melanoma em todo o mundo. De 1975 a 2010, nos Estados Unidos da América e na Europa central, estima-se que a incidência para o melanoma tenha mais que triplicado (BERWICK et al., 2016; GARBE; LEITER, 2009). A mortalidade, por outro lado, têm reduzido, atualmente culminando em morte em aproximadamente 20% dos casos (SCHADENDORF; HAUSCHILD, 2014).

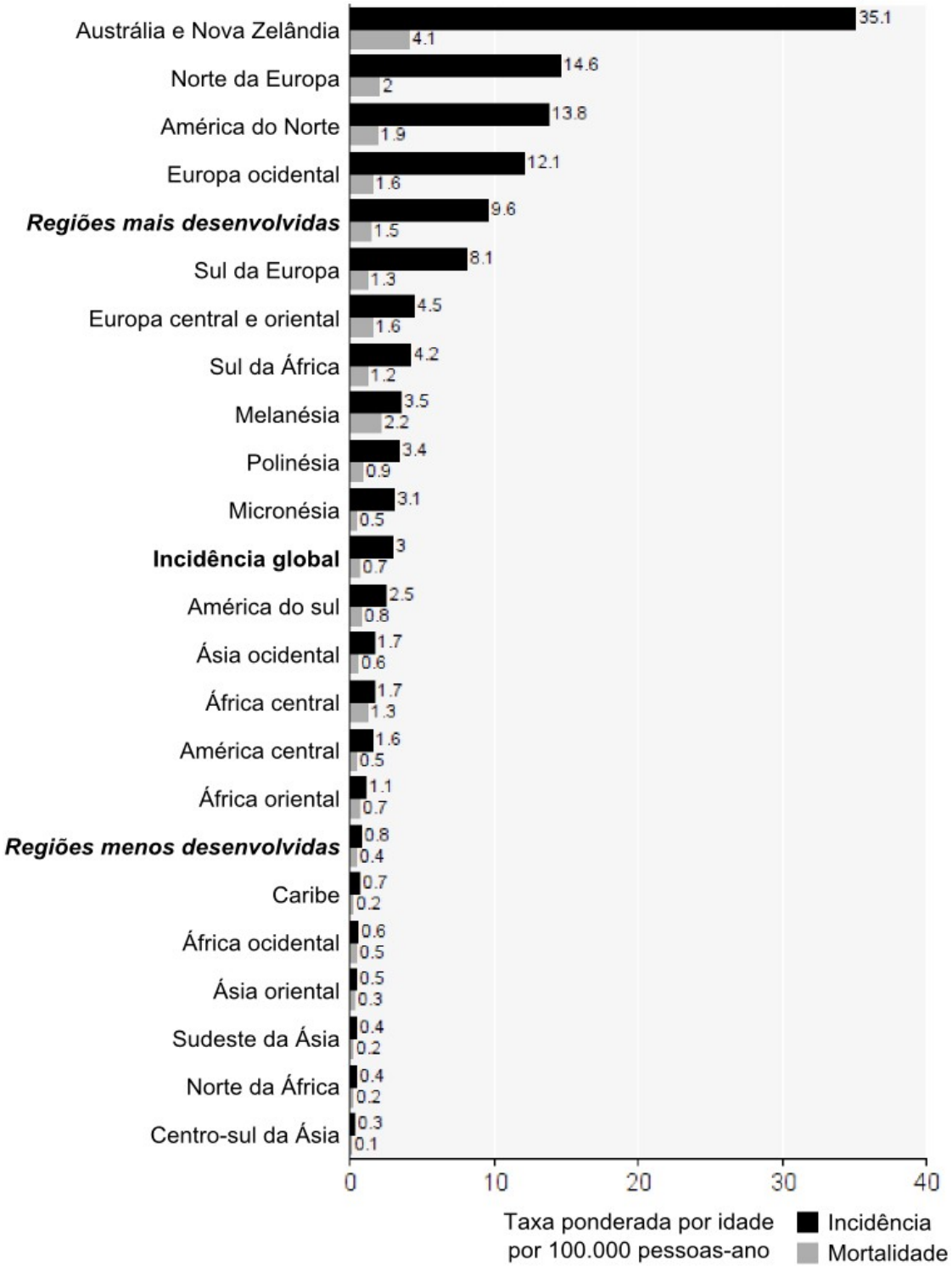


Figura 1. Incidência para o melanoma por região e nível de desenvolvimento. Dados apresentados em taxa ponderada por idade por 100.000 pessoas-ano, compreendendo ambos os sexos. Adaptado de Ferlay et al. (2013).

Diagnóstico

É importante que a população tenha conhecimento de como se autoexaminar, dado que a chance de recuperação de um melanoma é muito maior quando a doença é identificada em seus estágios iniciais. Por sua praticidade, o método de autoexame mais difundido se tornou o ABCD (RIGEL; RUSSAK; FRIEDMAN, 2010), proposto em 1985 (FRIEDMAN; RIGEL; KOPF, 1985) e, quase vinte anos depois, atualizado para ABCDE (ABBASI et al., 2004). A mnemônica com as cinco primeiras letras do alfabeto se refere às seguintes características do nevo suspeito: (A) assimetria, (B) bordas irregulares, (C) cor heterogênea, (D) diâmetro maior que 6 mm (frequentemente comparado com o diâmetro de uma borracha de lápis) e (E) evolução em cor, forma e/ou tamanho e em alterações como sangramento ou encrostamento (ABBASI et al., 2004). Recentemente, foi proposta a adição de uma sexta letra, com a letra "F" se referindo a *funny looking sign* ("ponto de aparência esquisita", em tradução livre) (DANIEL JENSEN; ELEWSKI, 2015). Esta proposta abarca o critério-chave de outro popular método de autoexame conhecido como "o sinal patinho feio" ("*the ugly duckling sign"*), proposto por Grob e Bonerandi (1998). Esta abordagem tem como base a avaliação visual de nevos individuais sempre em comparação com os em volta, sendo então possível identificar algum possível sinal patológico.

Por mais que as avaliações visuais por pessoas não treinadas sejam importantes e consigam ajudar a determinar a presença de um melanoma em estágios iniciais (EBELL, 2008; GACHON et al., 2005; SCOPE et al., 2008), sendo inclusive a maioria detectada por pacientes (MCPHERSON et al., 2006), elas são imprecisas e frequentemente levam a tanto a falsos positivos quanto a falsos negativos (ALDRIDGE et al., 2011; BRÄNSTRÖM et al., 2002). O procedimento necessário para o diagnóstico definitivo não é simples, e requer métodos mais refinados e maior expertise. O padrão ouro para o diagnóstico se dá pela análise histológica do tecido por biópsia, que além de acusar a ocorrência da doença, permite a clara discriminação do tipo de melanoma (LINARES; ZAKARIA; NIZRAN, 2015).

Entretanto, a invasividade do procedimento levou ao desenvolvimento de técnicas como dermatoscopia, dermatoscopia sequencial e mapeamento corporal. A dermatoscopia consiste na análise de nevos individuais pelo uso de um dermatoscópio, um equipamento portátil que possibilita a análise de cores, estruturas e padrões imperceptíveis ao olho nu. Apesar de ser um método eficaz (VESTERGAARD et al., 2008), não é universalmente difundido pela necessidade de profissionais com treinamento altamente especializado (SCHADENDORF et al., 2015). Já a dermatoscopia sequencial consiste do acompanhamento de nevos ao longo do tempo por fotografias dermatoscópicas obtidas ao longo do tempo, o que permite a análise da evolução das lesões. Este procedimento se demonstrou eficiente tanto para evitar falsos positivos (TROMME et al., 2012) quanto falsos negativos (KITTLER et al., 2006) obtidos por dermatoscopia. Por fim, o mapeamento corporal consiste na análise de fotografias de diferentes regiões do corpo do paciente, com o objetivo de comparar nevos uns com os outros e acompanhar o eventual surgimento de novos nevos. Quando combinadas de modo complementar, essas três técnicas se demonstram ferramentas de diagnóstico bastante confiáveis, especialmente evitando a excisão desnecessária de nevos benignos (MOLONEY et al., 2014; SALERNI et al., 2012).

Classificação

Existem quatro tipos de melanoma, classificados de acordo com o perfil histológico observado por biópsia (LINARES; ZAKARIA; NIZRAN, 2015). São denominados melanoma superficial, melanoma nodular, lentigo maligno e acral lentiginoso.

O melanoma superficial é o mais comum, representando aproximadamente 75% dos casos. É caracterizado pela presença de uma fase de crescimento radial que antecede o crescimento vertical para tecidos mais profundos. No melanoma superficial, a fase de crescimento vertical tem início somente quando o tumor ultrapassa a derme papilar. Em homens, ocorre mais comumente na região das costas,

enquanto nas mulheres é mais frequente nas extremidades inferiores. Pode apresentar diversas colorações, e suas bordas são irregulares e pouco definidas. (LINARES; ZAKARIA; NIZRAN, 2015)

Diferente do melanoma superficial, o melanoma nodular não apresenta uma fase de crescimento radial. Como consequência, o melanoma nodular cresce mais rapidamente em profundidade do que em largura, atingindo tecidos mais profundos com mais velocidade. Assim, não somente é um subtipo mais agressivo como também tem um desenvolvimento mais discreto quando observado sobre a pele. Em um primeiro momento, pode ser similar a um sinal comum, com aparência escura. Com seu crescimento, porém, adquire forma pedunculada ou de nódulo polipoide. Estima-se que sua frequência dentre os tipos de melanoma esteja em 9-15% (MALVEHY et al., 2012).

O melanoma lentigo maligno correspondendo de 4 a 15% dos casos (MCKENNA et al., 2006). Pode se desenvolver em qualquer área com exposição ao sol, sendo as mais comuns a cabeça ou o pescoço (TIODOROVIC-ZIVKOVIC et al., 2015). Tem forma de máculas pequenas, planas, irregulares e assimétricas. Em estágios iniciais, a coloração é bronzeada, mas pode adquirir cores variadas com o desenvolvimento (LINARES; ZAKARIA; NIZRAN, 2015). Pode ter um desenvolvimento bastante lento, às vezes levando décadas para atingir sua forma invasiva (SAMANIEGO; REDONDO, 2013), o que acontece em aproximadamente 5% dos casos (MCKENNA et al., 2006).

De forma geral, o acral lentiginoso é o subtipo mais raro de melanoma, correspondendo a menos de 5% dos casos (LINARES; ZAKARIA; NIZRAN, 2015). Entretanto, sua proporção é notavelmente maior em leste-asiáticos, africanos e árabes (GOYDOS; SHOEN, 2016; LINARES; ZAKARIA; NIZRAN, 2015). Costuma se desenvolver nas extremidades do corpo, notavelmente nas palmas das mãos, solas dos pés e unhas (GOYDOS; SHOEN, 2016; PHAN et al., 2006). É o subtipo de melanoma com o pior prognóstico, possivelmente em função da idade mais avançada dos pacientes e

da identificação mais difícil e, consequentemente, mais tardia (BALCH et al., 2009).

Tratamento

Em estágios iniciais, que antecedem o princípio de processos metastáticos, o paciente pode ser curado pela excisão do melanoma (Tabela 1). Havendo a observância de processos metastáticos, os pacientes deverão ser submetidos a tratamentos sistêmicos. Há menos de uma década, as drogas mais comumente utilizadas eram dacarbazina, fotemustina e temozolomida, que possuíam resposta completa e parcial em torno de 10% e sem qualquer efeito no prolongamento da sobrevivência (ATKINSON, 2015). Na última década, porém, várias outras alternativas têm sido desenvolvidas.

Aproximadamente metade dos melanomas apresentam uma mutação na proteína quinase BRAF, superativando-a (FLAHERTY et al., 2010). Esta superativação culmina no crescimento celular descontrolado, dado que a quinase BRAF exerce um papel-chave na via da MAP quinase, que tem papel regulatório no crescimento celular (ATKINSON, 2015). Assim sendo, medicamentos têm sido desenvolvidos visando inibição da própria quinase BRAF (como o vemurafenib (CHAPMAN et al., 2011; SOSMAN et al., 2012) e dabrafenib (HAUSCHILD et al., 2012; LONG et al., 2012)) ou das enzimas MEK1 e MEK2 (como o trametinib (FLAHERTY et al., 2012) e cobimetinib (LARKIN et al., 2014)), ativadas pela BRAF quinase na cascata de sinalização da MAP quinase.

Atualmente, o ipilimumab, com o nome comercial Yervoy® (Bristol-Myers Squibb), tem se tornado o tratamento mais utilizado para o melanoma (SCHADENDORF et al., 2015). O ipilimumab é um anticorpo monoclonal humano, e tem como mecanismo de ação a ativação do sistema imunológico (MORSE, 2005). Apesar de ter se mostrado eficiente no prolongamento da sobrevivência, o ipilimumab pode ser bastante agressivo, inclusive levando à morte (HODI et al., 2010; ROBERT et al., 2011). Atualmente, novos imunoterápicos estão em fase de testes, como o nivolumab (ROBERT et al., 2015; WEBER et al., 2014) e o pembrolizumab (ROBERT et al., 2014), visando terapias mais eficientes e

com menor agressividade possível.

Tabela 1. Intervenção e sobrevivência estimada para o melanoma por grau da doença.

Estágio	Característica do melanoma	Intervenção	Sobrevivência para 10 anos
0	Confinado na epiderme	Excisão com margem entre 0,5 e 1 cm	100%
I	Menor ou igual a 1 mm de espessura	Excisão com margem de 1 cm	92%
II	1,01 a 4,00 mm de espessura	Excisão com margem de 2 cm	80%
III	Espalhamento até linfonodo próximo	Terapia sistêmica	63%
IV	Espalhamento para órgão interno, linfonodo distante ou encontrado em pele distante.	Terapia sistêmica	50%

Adaptado de AJCC Cancer Staging Manual (EDGE; AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2010).

Camundongos como modelos animais para melanoma

Camundongos são animais amplamente utilizados na pesquisa de diversas patologias, e são também os mais empregados para o estudo do melanoma. Existem diversas razões para isso. Murinos são fáceis de manipular e armazenar, sendo sua manutenção considerada de baixo custo. Além disso, sua biologia é bem conhecida, e camundongos contam com uma vasta oferta de produtos especializados para uso em pesquisa.

O transplantante das células tumorais costuma ser realizado pela via subcutânea e, mais raramente, intramuscular. Pelo padrão de crescimento de melanomas em humanos, a via de injeção mais fiel à patologia seria a intradermal. Este procedimento, porém, se demonstra inviável pela ulceração da pele dos animais (KUZU et al., 2015).

O modelo pré-clínico mais comum para melanoma é o de xenotransplante. Este modelo foi primeiramente empregado em 1969, e desde então tem sido bastante utilizado para a investigação da patologia. É caracterizado pelo transplante de células cancerosas derivadas de animais de uma espécie em animais de outra espécie. Neste caso, a imunodeficiência é uma característica necessária para que o

tumor se desenvolva nos animais, que devem ser ou *nude* (atímicos, com deficiência de células T), SCID (*severe combined immunodeficient*, com deficiência de células T e B) ou ainda SCID diabéticos não obesos (NOD, *non-obese diabetic*) (FLANAGAN, 1966).

De modo geral, são utilizadas linhagens celulares estabelecidas, por serem de fácil aquisição, manutenção e propagação. Pelo interesse clínico, as linhagens tumorais mais comumente utilizadas têm origem em tumores humanos, e as variedades são diversas (SU et al., 2009). As células da linhagem A375 são altamente metastáticas, que rapidamente geram nódulos pulmonares em camundongos (CLARK et al., 2000; GIARD et al., 1973). As células M_4Beu (também conhecidas como M_4Be ou M_4), por outro lado, apesar de altamente tumorigênicas, são pouco metastáticas, sendo mais convenientes para a análise do crescimento do tumor primário (BOUKERCHE et al., 2008; THOMASSET; QUASH; DORÉ, 1982). Ambas as linhagens citadas possuem inúmeras sublinhagens com diferentes características, que devem ser consideradas de acordo com o foco de cada estudo. Para o modelo de xenotransplante também são utilizadas células não-humanas, como por exemplo, caninas (INOUE et al., 2004), equinas (CHAPMAN et al., 2009; SELTENHAMMER et al., 2014) e suínas (GREEN et al., 1992).

As células tumorais de linhagens estabelecidas são mantidas em condições *in vitro* por longos períodos de tempo. Essa forma de manutenção das células tumorais acarreta em uma importante limitação para a validade desse modelo. Afinal, enquanto as células são mantidas em condições não fisiológicas, os processos proliferativos ainda se mostram ativos, se fazendo presente um fenômeno de seleção. O inevitável acúmulo de mutações faz com que essas linhagens já não representem os tumores originais, com células já bastante diferentes daquelas que as originaram (KERBEL, 2003). Por isso, o modelo de xenotransplante com linhagens pré-estabelecidas tem um baixo sucesso translacional (MERLINO et al., 2013). Entretanto, em função da interação direta do tumor com vasos linfáticos e

sanguíneos, o modelo de xenotransplante se demonstra útil para o estudo do comportamento do crescimento tumoral (HUH et al., 2010a, 2010b; SHARMA et al., 2014).

Para contornar os problemas da manutenção de células tumorais em cultura, há o modelo de xenotransplante utilizando tumores derivados de pacientes. Este modelo foi adotado pela primeira vez na década de 1980 (FIEBIG et al., 1984). Este modelo reflete a patologia com mais acurácia em diversos níveis, com similaridades em perfil histológico, de transcriptoma, polimorfismo e conservação da arquitetura cromossomal (SIOLAS; HANNON, 2013). As desvantagens desse modelo residem em sua dificuldade de aplicação, sendo um processo complicado e demorado: requer a remoção cirúrgica do tumor, dissecação em pequenos pedaços e o transplante direto em camundongos severamente imunossuprimidos (KHALED; LIU, 2014). O tempo para o desenvolvimento de um melanoma palpável pode levar mais de nove meses, ainda existindo a possibilidade de não se desenvolver (KUZU et al., 2015).

Todos os modelos de transplante xenogênico requerem animais imunossuprimidos, o que limita a análise das reações fisiológicas ao tumor. Afinal, é sabido que o sistema imunológico contribui com o tumor em sua iniciação, progressão, metástase e, claro, na resposta aos agentes testados (DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006; PARDOLL, 2003).

Outro modelo amplamente utilizado é o de transplante de células tumorais da mesma espécie do doador. Tem como grande vantagem a possibilidade de utilização de animais imunocompetentes, compreendendo assim a ação de respostas imunes sobre o tumor (KUZU et al., 2015). Este é considerado um bom modelo para o estudo do comportamento do tumor e de seus processos metastáticos, bem como do efeito do sistema imunológico sobre a patologia.

Assim como para o modelo de xenotransplantes, geralmente são empregadas linhagens tumorais estabelecidas, sendo a B16 a mais frequentemente utilizada. Foi criada na década de 1970 a partir de

um melanoma espontâneo de um camundongo da linhagem C57BL/6 (FIDLER, 1973). Após indução química, estas células formam tumores em camundongos de sua mesma linhagem de origem. Existem diversas linhagens de subclones das células B16. Algumas das linhagens mais utilizadas têm origem em metástases pulmonares provocadas pela injeção intravenosa das células parentais B16-F0 (RUDDON, 2007). A linhagem B16-F1 teve origem nas metástases pulmonares geradas pela injeção intravenosa de células B16-F0, enquanto as demais foram obtidas de nódulos pulmonares resultantes da injeção intravenosa de células obtidas de nódulos pulmonares anteriores. Este procedimento foi repetido 10 vezes, até a obtenção da linhagem B16-F10 (Figura 2). Enquanto as células B16-F1 possuem capacidade metastática reduzida, sendo o modelo de escolha para o estudo do crescimento tumoral primário, as células B16-F10 são altamente metastáticas e apresentam crescimento notavelmente rápido, levando à morte em 2 a 4 semanas (GEHLSEN; HENDRIX, 1986; HERLYN; FUKUNAGA-KALABIS, 2010; POSTE et al., 1980). Infelizmente, tanto as linhagens B16-F0 quanto B16-F10 são abreviadas como B16, uma por se tratar da linhagem parental e a outra por ser a utilizada com mais frequência. Já as células B16-BL6 são derivadas da linhagem B16-F10, e contam com um potencial invasivo ainda maior (NAKAMURA et al., 2002).

O modelo de transplante singênico também possui suas limitações. As células tumorais de camundongos divergem das células tumorais humanas em diversos níveis, como em proteínas de adesão, produção de fatores tróficos e perfil genético (HERLYN; FUKUNAGA-KALABIS, 2010). Outra limitação translacional se dá pela agressividade das células B16 em camundongos, que impossibilita análises de longo prazo e traz estimativas pouco realistas de crescimento e ação metastática. Portanto, os resultados obtidos a partir do uso de células da linhagem B16 devem ser analisados com cautela.

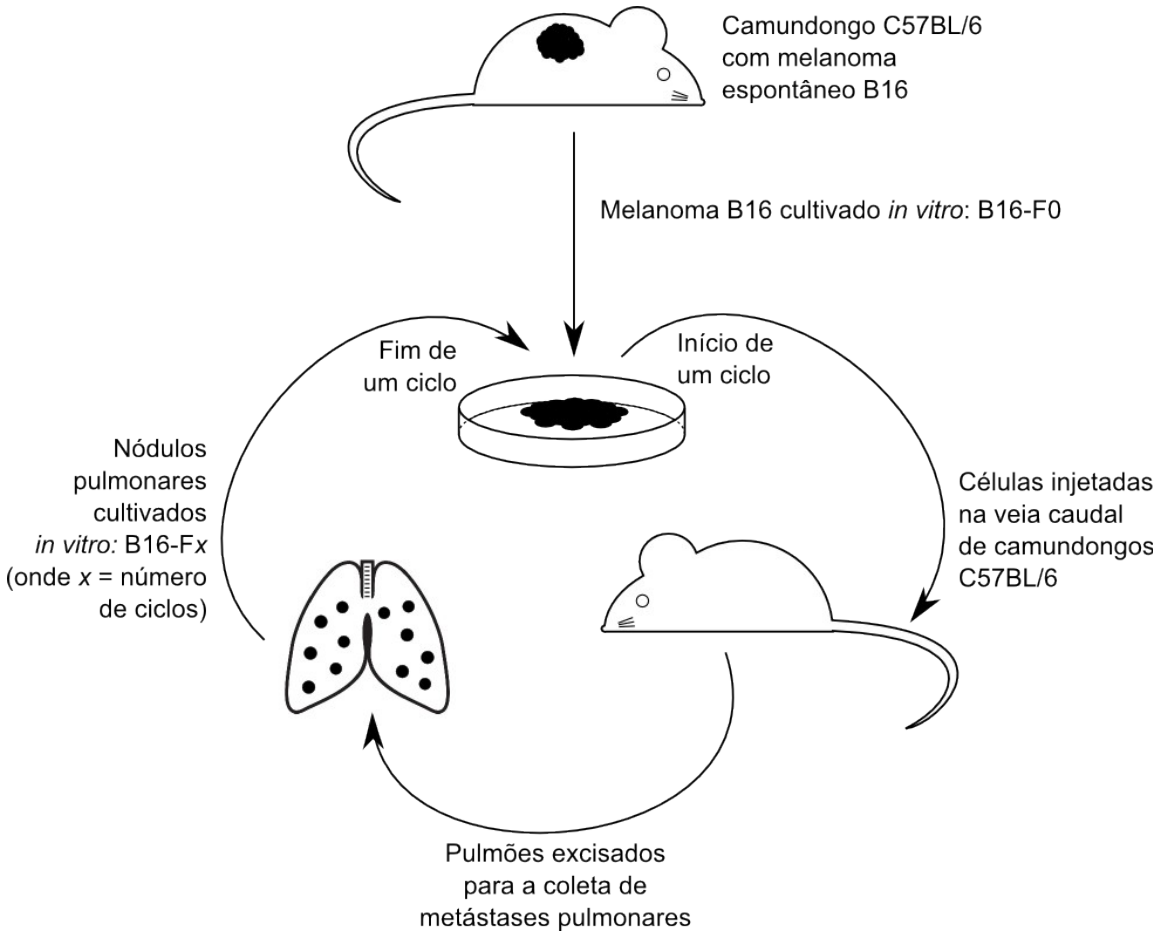


Figura 2. Origem das diferentes linhagens B16. Todas as linhagens B16 tiveram origem em um melanoma primário em camundongos C57BL/6, cujas células foram denominadas B16-F0 quando postas em cultivo in vitro. As demais são advindas de nódulos pulmonares derivados de injeções intravenosas sucessivas. Fidler et al. (1973) repetiram o ciclo 10 vezes, até a obtenção das células B16-F10.

Pelo uso bastante difundido das células B16 e de seus subclones, a linhagem de camundongos C57BL/6 é a mais amplamente utilizada para estudos de melanoma. Este modelo é chamado singênico, dado que as células provêm de animais com mesmo *background* genético. Outra linhagem das mais populares é a linhagem BALB/C, empregada como modelo para diversas patologias por seu temperamento mais dócil. Como modelo de melanoma, BALB/C podem ser receptores de células B16, caracterizando o modelo alogênico, dado que se tratam de animais de mesma espécie dos doadores (C57BL/6), mas com genética diferente. Já os BALB/C atímicos são mais comumente utilizados como

receptores de células tumorais humanas (KUCEROVA et al., 2010). Camundongos da linhagem C3H (também conhecidos como C3 e C3H/He) apresentam alta suscetibilidade para o desenvolvimento de tumores, e por essa razão também são utilizados como modelo para melanoma. Em função de um vírus transmitido pelo leite, camundongos dessa linhagem apresentam 90% de chance de espontaneamente desenvolver câncer de mama ao atingirem 11 meses de vida. Além disso, por causa de uma doença genética, murinos dessa linhagem ficam cegos por volta de 6 semanas de vida por conta da degeneração da retina (HESTON; PARKS, 1975).

Estima-se que o sucesso translacional a partir de estudos com camundongos para melanoma se encontre em torno de 5% (HUTCHINSON; KIRK, 2011). A fim de suprir essa deficiência, novos modelos têm sido explorados, como cachorros (SIMPSON et al., 2014), cavalos tordilhos (HEINZERLING et al., 2001), peixes (*Danio rerio***,** *Xiphophorus* sp. e Medaka) (PATTON; MITCHELL; NAIRN, 2010), porcos (suínos miniatura Sinclair (MILLIKAN et al., 1974; MISFELDT; GRIMM, 1994) e minipigs Libechov (VINCENT-NAULLEAU et al., 2004)) e marsupiais (HARRINGTON, 2015). Entretanto, estes modelos ainda são pouco utilizados.

2.2. Células-tronco e células estromais mesenquimais multipotentes

As características que definem as células-tronco são a habilidade de autorrenovação (produção de cópias idênticas a si mesmas) e a capacidade de diferenciação em diferentes células funcionais. Desde a sua descoberta, as células-tronco se tornaram fortes candidatas para uso clínico, especialmente para regeneração de órgãos e tecidos lesionados.

As células capazes de se diferenciar em qualquer célula do corpo e dos anexos embrionários são denominadas totipotentes, e são encontradas somente nos estágios iniciais pós-fertilização (~1-3 dias). As chamadas células-tronco embrionárias são as que detêm pluripotência, o que significa que podem

dar origem a células dos três folhetos embrionários (endoderme, mesoderme e ectoderme). Como são difíceis de isolar e são estigmatizadas por questões éticas, sociais e religiosas, células-tronco embrionárias foram progressivamente perdendo espaço como candidatas a possíveis agentes terapêuticos (ISHII; ETO, 2014). A fim de contornar as problemáticas enfrentadas pelas células-tronco embrionárias, Takahasi e Yamanaka (2006) desenvolveram as chamadas células-tronco pluripotentes induzidas (*induced Pluripotent Stem Cells*, iPSCs). Essas células têm origem em células somáticas reprogramadas para adquirir pluripotência.

Organismos adultos também possuem células indiferenciadas, com capacidade de diferenciação em células do seu mesmo folheto embrionário de origem (multipotência). A história de sua descoberta tem origem em 1867, quando Cohnheim observou a presença de células hematopoiéticas na medula óssea, hipotetizando que estas células possuíam a capacidade de migrar para locais de lesão, contribuindo para a regeneração tecidual (COHNHEIM, 1867). Quase um século depois, na segunda metade da década de 1960, Friedenstein *et al*. efetuaram o isolamento, manutenção em cultura e indução da diferenciação óssea de células isoladas da medula óssea (FRIEDENSTEIN et al., 1968; FRIEDENSTEIN; PIATETZKY-SHAPIRO; PETRAKOVA, 1966).

Somente em 1991, a partir de um trabalho escrito por Arnold Caplan, que o termo “células-tronco mesenquimais” passou a ser utilizado para designar essas células (CAPLAN, 1991). Por possuírem características biológicas diferentes de outras células-tronco e por contarem com atribuitos heterogêneos dentro de sua população, foi sugerido que essas células fossem designadas células estromais mesenquimais (MSCs, *mesenchymal stromal cells*), cuja sigla em inglês coincide com o termo já popularizado desde Caplan (*mesenchymal stromal cells*) (DOMINICI et al., 2006, 2009; HORWITZ et al., 2005). Por serem encontradas em organismos adultos, muitos autores as chamam de “células-tronco adultas” ou “células multipotentes adultas”, mas esses termos são problemáticos e têm

caído em desuso, dado que essas células também se fazem presentes em embriões que já passaram do estágio de blastocisto (MONTI et al., 2012).

Em princípio, acreditava-se que MSCs teriam origem exclusiva na medula óssea, mas o avanço das pesquisas demonstrou que, na realidade, poderiam ser encontradas em praticamente todos órgãos e tecidos (MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006; ZOU et al., 2010). Entretanto, com uma larga margem, as duas populações de MSCs mais amplamente estudadas são as de medula óssea (BMSCs, *bone marrow-derived stromal cells*) e de tecido adiposo (ASCs, *adipose derived stromal cells*). Entre as razões para isso estão a relativa abundância de MSCs nesses tecidos e as técnicas bem estabelecidas para isolamento e cultura. Ambas possuem capacidade de diferenciação em células de linhagens mesodérmicas, como osteoblastos, condroblastos, adipócitos e mioblastos (AUGELLO; DE BARI, 2010), mas a predisposição para cada via de diferenciação é diferente para MSCs de cada origem (AL-NBAHEEN et al., 2013; LIU et al., 2006; VISHNUBALAJI et al., 2012). Além disso, foi recentemente constatado que MSCs não se tratam de populações homogêneas, implicando em diferentes subtipos celulares por tecido de origem (ELAHI et al., 2016).

A ampla disponibilidade, acesso relativamente simples e desvencilhamento de controvérsias fez das MSCs as candidatas favoritas para terapia celular. Inicialmente, a expectativa dos seus efeitos benéficos se justificava quase que exclusivamente por sua capacidade de multiplicação e diferenciação, sendo teorizado o simples repovoamento dos tecidos lesados pelas novas células. Apesar dessas ações de fato se fazerem presentes, tem se mostrado cada vez mais evidente que seus principais mecanismos terapêuticos são outros. Uma vez em local de lesão, as MSCs são responsáveis por interações celulares complexas, incluindo a produção e secreção de uma série de fatores tróficos, citocinas, miRNAs e siRNAs, que modulam o microambiente de lesão com efeitos proliferativos, angiogênicos, antiapoptóticos e imunosupressores (DAS; SUNDELL; KOKA, 2013). MSCs já foram testadas para o

tratamento de uma vasta gama de doenças neurológicas, musculoesqueletais, cardiovasculares, hepáticas, pulmonares, autoimunes e degenerativas, muitas vezes com resultados promissores (FARINI et al., 2014; STOLTZ et al., 2015; SUTTON; BONFIELD, 2014).

Interações de células estromais mesenquimais multipotentes com tumores

O trabalho publicado por Maestroni *et al*. (1999) foi o primeiro a demonstrar o tropismo de MSCs a células tumorais. Este fenômeno também é observado com outros tipos de lesões, dado que tumores também produzem e liberam citocinas inflamatórias, dentre outros mediadores, sinalizando tal como "uma ferida que nunca cura" (SPAETH et al., 2008). O fenômeno de migração e incorporação de MSCs em microambientes tumorais já pôde ser observado em diversos tipos de neoplasias malignas, como câncer de mama (PATEL et al., 2010), de pele (STUDENY et al., 2002), de pulmão (LOEBINGER et al., 2009), cerebral (SASPORTAS et al., 2009) e pancreático (ZISCHEK et al., 2009). Este comportamento abriu portas para o possível desenvolvimento de uma estratégia clínica mais eficiente e menos agressiva contra o câncer, dado que as MSCs poderiam ser empregadas como entregadoras seletivas de agentes terapêuticos.

Como tratamento para o melanoma, MSCs já foram testadas de diversas maneiras, como carreadoras de fármacos (PESSINA et al., 2011) e de genes (ZHANG et al., 2015) e como agentes moduladores do sistema imunológico pela superexpressão de moléculas como interleucina 2 (IL-2) (BAHRAMBEIGI et al., 2015), interleucina 12 (IL-12) (CHEN et al., 2006, 2008; ELIOPOULOS et al., 2008; ELZAOUK; MOELLING; PAVLOVIC, 2006; SEO et al., 2011; STAGG et al., 2004), interferon alfa (INF-α) (XU et al., 2014), interferon beta (IFN-β) (AHN et al., 2013; STUDENY et al., 2002) e fator de necrose tumoral α (TNF-α) (HAN et al., 2011; REN et al., 2012; TYCIAKOVA et al., 2015).

Entretanto, os efeitos da interação de MSCs com o melanoma, assim como com outros tipos de

tumor, ainda não são bem compreendidos. O conhecimento acumulado proveniente tanto de ensaios *in vitro* quanto *in vivo* são inconclusivos e, em última análise, contraditórios (HONG; LEE; KANG, 2014; KLOPP et al., 2011). Enquanto alguns grupos relataram a redução do tamanho do tumor seguida do tratamento com MSCs selvagens (AHN et al., 2013; STAGG et al., 2004), outros reportaram seu incremento (AKAY et al., 2010; HAN et al., 2011; KUCEROVA et al., 2010), além de outros ensaios não terem resultado em efeitos observáveis (CHEN et al., 2012, 2008; ELIOPOULOS et al., 2008; ELZAOUK; MOELLING; PAVLOVIC, 2006). Alguns autores atribuíram os efeitos antitumorais à secreção de fatores que induzem o bloqueio da fase G_1-S do ciclo celular, assim impedindo o crescimento do tumor (COUSIN et al., 2009; KHAKOO et al., 2006; TORSVIK; BJERKVIG, 2013). Já os efeitos pró-carcinogênicos são principalmente relacionados à atividade imunossupressora das MSCs e ao efeito angiogênico mediado pela secreção de VEGF (DA SILVA MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008; HAN et al., 2011; KUCEROVA et al., 2010). Interessantemente, foi recentemente reportado que a administração do meio de cultivo sem células resultou na redução do melanoma *in vivo*, sugerindo que as moléculas secretadas por MSCs desencadeiam efeitos antitumorais (LEE et al., 2015). É importante salientar que os fenômenos migratórios são comuns tanto a MSCs exógenas quanto endógenas, sendo salientada não somente a importância clínica como também a fisiológica dessas interações (LIN et al., 2010), uma vez que MSCs estão distribuídas em quantidades consideráveis por todo o organismo (MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006).

2.3. Meta-análises para ensaios pré-clínicos

O objetivo de uma revisão sistemática seguida de meta-análise é fazer uma varredura de todos trabalhos publicados em determinado sentido e estimar o efeito combinado de resultados obtidos pelos diversos estudos independentes comparáveis, trazendo consigo um resultado original. Quando os

resultados se apresentam demasiadamente heterogêneos, meta-análises também compreendem procedimentos estatísticos que têm como objetivo detectar as possíveis fontes para variabilidade (como, por exemplo, variáveis procedimentais, características da amostra, tempos para intervenção e análise, etc) (VESTERINEN et al., 2014).

Os primeiros estudos a combinarem os resultados de outros trabalhos para análise datam do século XVII, na área da astronomia (O'ROURKE, 2007). Entretanto, somente no início do século XX que os primeiros métodos meta-analíticos foram introduzidos, em um trabalho publicado pelo matemático e bioestatístico britânico Karl Pearson (1904), apesar do termo meta-análise ter sido introduzido somente na metade dos anos 1970 por Gene Glass (1976).

Desde os anos 1970, as meta-análises referentes a ensaios clínicos se tornaram comuns, trazendo importantes resultados a partir de resultados combinados de uma série de estudos. Interessantemente, mesmo com os ensaios clínicos geralmente tendo como base os achados de ensaios pré-clínicos, as meta-análises para esse tipo de estudo ainda são pouco numerosas. Isto que acarreta em uma série de inconsistências no conhecimento acumulado, não somente com relação aos benefícios ou malefícios de determinada intervenção como também quanto à variabilidade determinada pela aplicação de determinados protocolos. Além disso, meta-análises contam com métodos para determinar o perfil dos artigos publicados quanto à consistência dos valores numéricos reportados nos resultados perante os demais trabalhos (STERNE; HARBORD, 2004), assim como ferramentas para avaliar a qualidade e credibilidade do conteúdo textual (HOOIJMANS et al., 2014), incentivando uma melhora na qualidade de publicação, que, se tratando de ensaios pré-clínicos, frequentemente pecam em aspectos básicos como relato transparente de variáveis metodológicas e de resultados (HOLMAN et al., 2016; KOREVAAR; HOOFT; RIET, 2011).

2.4. Justificativa

Tendo em vista as incertezas referentes aos efeitos da interação entre MSCs e melanomas e a grande importância do preenchimento dessa lacuna no conhecimento atual, o trabalho proposto consistiu em uma criteriosa varredura de todos os artigos originais desenvolvidos nesse sentido e na compilação e comparação estatística dos resultados obtidos, configurando uma revisão sistemática seguida de meta-análise. A pesquisa incluiu trabalhos conduzidos em modelos *in vivo* para melanoma tratados com qualquer tipo de célula-tronco ou estromal mesenquimal multipotente. Os achados foram analisados em vistas às metodologias adotadas, sendo aplicada uma série de processos estatísticos com objetivo de combinar os resultados dos vários estudos independentes, visando-se uma síntese reproduzível e quantificável acerca da magnitude dos efeitos combinados e das possíveis raízes para a heterogeneidade dos achados.

3. Objetivo

Objetivo geral: Revisar sistematicamente e quantitativamente artigos originais que avaliem efeitos da administração de células-tronco em modelos animais para melanoma.

Objetivo específico 1: Estimar o risco de enviesamento da bibliografia disponível segundo a lista de critérios do *Systematic Review Centre for Laboratory Animal Experimentation* (SYRCLE), bem como o risco de enviesamento nos resultados publicados por *funnel plot*.

Objetivo específico 2: Avaliar, a partir do efeito combinado, se o tratamento com células estromais mesenquimais influencia no crescimento de tumores e em sua incidência.

Objetivo específico 3: Analisar estatisticamente as variáveis metodológicas que possivelmente expliquem a heterogeneidade dos desfechos, se presentes.

4. Metodologia

4.1. Revisão sistemática

Estratégia de busca

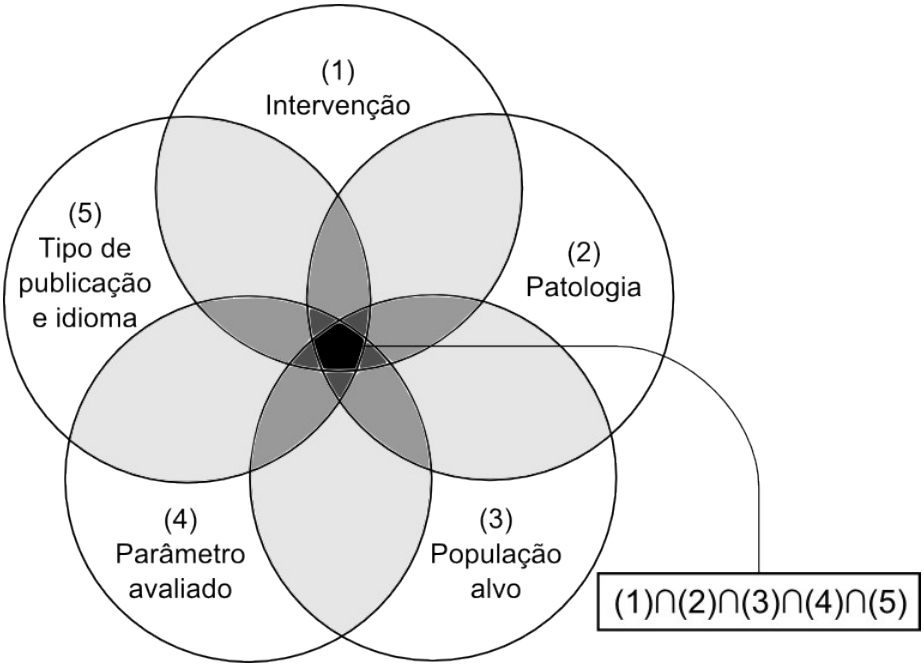


Figura 3. Diagrama da estratégia de busca. Onde cada item encontra-se descrito no quadro 1.

O processo de busca e leitura de referências bibliográficas foi realizado através da combinação dos achados nas bases de dados *PubMed*, *Scopus* e *Web of Science*, com a última atualização da pesquisa realizada no dia 12 de dezembro de 2015. As estratégias de busca foram desenvolvidas com base no proposto por Leenaars *et al*. (2012). Foram empregados termos livres e, na base PubMed, os descritores MeSH (*Medical Subject Headings*), empregados pela Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos (NLM, *National Library of Medicine*) como ferramenta de indexação por assunto. Respeitando a sintaxe de cada base, foram elaboradas estratégias de pesquisa para (1) a intervenção, (2) a patologia de interesse, (3) a população estudada, (4) os parâmetros avaliados e (5) os tipos de publicação e os idiomas a serem incluídos. A busca final se deu pela intersecção dos cinco componentes de pesquisa,

conforme esquematizado na Figura 3. Como exemplo, a estratégia de busca utilizada para a base PubMed e os resultados obtidos a partir dessa busca encontram-se no quadro 1. As três bibliotecas resultantes foram salvas e importadas no gerenciador de referências JabRef 2.10, onde houve exclusão de ocorrências duplicatas ou triplicadas.

Quadro 1. Detalhamento da estratégia de busca e número de ocorrências na base PubMed.

#	Elemento de pesquisa	Elemento de pesquisa para esta investigação	Estratégia de busca	Número de ocorrências (12/12/2015)
1	Intervenção	Células estromais mesenquimais	("adult stem cells"[MeSH Terms] OR "multipotent stem cells"[MeSH Terms] OR "mesenchymal stromal cells"[MeSH Terms] OR "adult stem cell*"[tiab] OR "multipotent stem cell*"[tiab] OR "adult stem cell*"[tiab] OR "somatic stem cell*"[tiab] OR "mesenchymal stem cell*"[tiab] OR "mesenchymal stromal cell*"[tiab] OR "adipose derived stem"[tiab] OR "adipose derived stromal cell*"[tiab] OR "adipose tissue derived stem"[tiab] OR "adipose tissue derived stromal cell*"[tiab] OR "marrow derived stem"[tiab] OR "marrow derived stromal cell*"[tiab] OR "umbilical cord * derived stem"[tiab] OR "multipotent stromal cell*"[tiab] OR "pluripotent stem cells"[MeSH Terms] OR "pluripotent stem cell*"[tiab] OR "neural stem cell*"[tiab] "embryonic stem cell*"[tiab]) NOT (scaffold*[tiab] OR biomaterial*[tiab] OR construct[tiab])	32.450
2	Patologia	Melanoma	(melanoma*[tiab]) NOT ("cysts"[MeSH Terms] OR "hamartoma"[MeSH Terms] OR "neoplastic syndromes, hereditary"[MeSH Terms] OR "pregnancy complications, neoplastic"[MeSH Terms] OR "tumor virus infections"[MeSH Terms] OR teratoma[tiab] OR fibrosis[tiab] OR fibroma[tiab])	88.146
3	População	Qualquer modelo animal	“Filtro animal” (HOOIJMANS et al., 2010)	5.919.835
4	Parâmetros avaliados	Mortalidade, incidência e dinâmica do tamanho e peso do tumor.	(grow*[tiab] OR expansion[tiab] OR expand*[tiab] OR size[tiab] OR area[tiab] OR volume[tiab] OR multipl*[tiab] OR magnif*[tiab] OR promot*[tiab] OR enhanc*[tiab] OR benefi*[tiab] OR malef*[tiab] OR reduction[tiab] OR reduce*[tiab] OR inhibit*[tiab] OR	8.518.786

			`minimize*[tiab] OR protect*[tiab] OR shrink*[tiab] OR incidence[tiab])`	
5	Tipo de publicação	Artigos originais publicados ou *in press*	`(English[lang] OR Portuguese[lang] OR Spanish[lang] OR French[lang] OR German[lang] OR Italian[lang]) NOT (review[ti] OR Review[ptyp] OR Letter[ptyp] OR Editorial[ptyp] OR reviewed[tiab] OR review[tiab])`	19.434.757
Total da intersecção dos elementos de pesquisa			`(#1 AND #2 AND #3 AND #4 AND #5)`	61

Seleção de trabalhos

Foram incluídos artigos originais, sem limite de data de publicação, redigidos em inglês, português, espanhol, francês, alemão ou italiano. Foram considerados os ensaios *in vivo* em animais não-humanos submetidos à injeção subcutânea ou intramuscular de qualquer tipo de MSC concomitante com células de melanoma. Foram desconsideradas investigações com células não-mesenquimais, transgênicas ou aplicadas em conjunção com outras substâncias quaisquer, assim como trabalhos que adotaram protocolos de múltiplas injeções.

A primeira fase da seleção foi realizada pela leitura de títulos por apenas um investigador (M F Cordeiro). A segunda fase compreendeu leitura dos resumos restantes por dois investigadores independentes (M F Cordeiro e L P Marmitt), com base nos critérios de inclusão e exclusão estipulados. As bibliotecas resultantes das duas varreduras foram combinadas e casos de discordância foram discutidos entre os dois. Tanto a seleção por títulos quanto a seleção por resumos foi realizada no *software* livre JabRef 2.10.

Na terceira e última etapa de seleção, os artigos de interesse foram conduzidos para leitura na íntegra, ainda por pares. Após leitura detalhada dos artigos, foram excluídos aqueles que não se enquadraram no escopo do trabalho. Artigos com acesso não garantido pela CAPES foram solicitados por e-mail ou através da rede Research Gate (http://www.researchgate.net). Estes dois meios de contato

também foram utilizados em casos de trabalhos que necessitaram de esclarecimentos (metodologia sem clareza ou incompleta). Se passados 30 dias sem retorno por parte dos autores, os trabalhos foram excluídos. Foram ainda eliminados trabalhos com resultados não-quantificáveis (qualitativos) ou obtidos através de métodos não-comparáveis.

4.2. Meta-análise

Extração dos dados

O conteúdo selecionado dos trabalhos foi tabelado em planilhas digitais do *software* LibreOffice Calc 5.0. Primeiramente, foram designadas colunas para a identificação dos trabalhos (autor e ano) e para as principais variáveis metodológicas (espécie, linhagem, sexo, idade e peso dos animais, origem, tipo e quantidade de células cancerosas e tronco, via e distância temporal das administrações, etc.). Com estas informações tabeladas, teve início a extração dos dados referentes aos resultados obtidos. Quando apresentados em tabelas ou numericamente ao longo do texto, os valores foram copiados diretamente para as planilhas. Quando expressos exclusivamente em gráficos, os autores foram contatados por e-mail ou pela rede Research Gate (www.researchgate.net) para que os dados fossem disponibilizados (dados brutos ou média±desvio padrão). Não havendo retorno por parte dos autores, os dados foram extraídos a partir dos gráficos fazendo uso do *software* FIJI (SCHINDELIN et al., 2012). Isto foi somente aplicável em gráficos com presença de barras de erro e sem sobreposição das mesmas. O método adotado seguiu o mesmo princípio daquele empregado por *softwares* especializados como UnGraph, Data Thief e GraphClick, todos tidos como confiáveis (FLOWER; MCKENNA; UPRETI, 2015; SHADISH et al., 2009). Este simples método tem como base a calibragem da escala do programa a partir da escala do eixo das ordenadas. Com esta calibragem, os valores de média podem ser extraídos a partir da extensão de retas que ligam as representações de média ao eixo das abscissas em um ângulo

reto. Similarmente, os valores de desvio ou erro padrão são obtidos a partir do comprimento de retas traçadas entre o ponto de representação da média e a extremidade da barra de erro (novamente, em um ângulo de 90º).

Os dados extraídos dados referentes ao comportamento de alteração de tamanho do tumor (em área, volume e peso) e de incidência ao longo do tempo. Os valores fichados foram os de tamanho da amostra (*n*), média e desvio padrão (SD, *standard deviation*), que quando necessário, foi adquirida a partir do erro padrão da média (SEM, *standard error of the mean*) pelo uso da Equação 1.

$$SD = SEM \times \sqrt{n} \tag{1}$$

Os animais tidos como controle foram aqueles submetidos à injeção de células tumorais, enquanto aqueles submetidos também à injeção de MSCs foram enquadrados como pertencentes ao grupo tratamento. Foram desconsiderados grupos envolvendo qualquer tipo de cotratamento. Os resultados obtidos a partir de cada grupo intervenção foi sempre tabelado ao lado do resultado obtido por seu respectivo grupo controle. Por essa razão, quando trabalhos trouxeram resultados para mais de um grupo intervenção para um mesmo controle, os mesmos dados desse grupo controle foram empregados para cada intervenção, sendo cada observação *a priori* tratada com um trabalho independente.

Cálculos

Para que uma meta-análise possa ser executada, é necessária a obtenção do tamanho do efeito combinado (Es_i) e do seu desvio padrão (SD_i). O método mais direto para adquirir esses dados é através da fórmula da diferença absoluta das médias. Este método fornece a diferença entre as medidas encontradas entre o grupo controle e o grupo tratamento nas unidades originais. Trata-se de uma abordagem adequada para diversos tipos de dados, como, por exemplo, para o número de

administrações por hora (DU SERT; CHAPMAN, 2013). Entretanto, esta é uma abordagem sensível a pequenas variações nos protocolos adotados, como método de medição de uma estrutura, tempo de coleta desse valor, etc.

Diferentes grupos adotam diferentes protocolos para a obtenção de seus dados, mesmo que estes sejam textualmente explicados de forma similar e que sejam expressos nas mesmas unidades. Meta-análises são bastante sensíveis às variações de grandeza decorrentes dessas diferenças. Por exemplo, apesar da medida superficial do melanoma por paquímetro ter sido o método utilizado por todos os trabalhos fichados, diferentes fórmulas foram relatadas para estimativa da área ou do volume. Assim sendo, as observações de área e de peso foram transformadas pela diferença padronizada das médias pelo G de Hedges (Equações 5 e 6) (HEDGES; OLKIN, 1985; VESTERINEN et al., 2014). Para a obtenção das variáveis necessárias, outros cálculos precisaram antecedê-los (Equações 2 – 4).

$$n'_c = \frac{n_c}{\textit{Número de grupos intervenção para o mesmo controle}} \tag{2}$$

Onde n'_c refere-se ao n ajustado do controle e n_c é o n real do grupo controle.

$$N = n_{in} + n'_c \tag{3}$$

Onde N representa o n total ajustado n_{in} é o n do grupo intervenção.

$$S_p = \sqrt{\frac{(n'_c - 1)SD_c^2 + (n_{in} - 1)SD_{in}^2}{N-2}} \tag{4}$$

Onde S_p é a variância combinada e SD_c e SD_{in} se referem ao desvio padrão do grupo controle e do grupo intervenção, respectivamente.

$$ES_i = \frac{\bar{x}_c - \bar{x}_{in}}{S_p} \times \left(1 - \frac{3}{4N-9}\right) \tag{5}$$

Onde ES_i é o tamanho do efeito combinado e relativizado e $\bar{x}_c$ e $\bar{x}_{in}$ se referem à média do efeito para o grupo controle e tratamento, respectivamente.

$$SE_i = \sqrt{\frac{N}{n_{in} \times n'_c} + \frac{ES_i^2}{2(N-3.94)}} \quad (6)$$

Onde SE_i é o erro padrão do efeito combinado.

O G de Hedges consiste de uma adaptação do D de Cohen para amostras reduzidas, sendo, portanto, pertinente para aplicação em estudos com animais. Depois de observar a homogeneidade entre os diferentes tempos para obtenção das medidas e entre os resultados de tamanho e peso, esses dados foram combinados pelo uso das Equações 7 a 9.

$$W_i = \frac{1}{SE_i^2} \quad (7)$$

Onde W_i é o peso do resultado e *SEi* foi obtido pela Equação 6.

$$ES_{\theta i} = \frac{\sum_{i=1}^{k} W_i \times ES_i}{\sum_{i=1}^{k} W_i} \quad (8)$$

Onde $ES_{\theta i}$ é o efeito combinado entre os resultados e *k* corresponde ao número de estudos incluídos na meta-análise. O valor para *ESi* foi calculado utilizando a Equação 5.

$$SE_{\theta i} = \sqrt{\frac{N_{comparações}}{\sum_{i=1}^{k} W_i}} \quad (9)$$

Onde $SE_{\theta i}$ é o erro padrão do efeito combinado e $N_{comparações}$ é o número de observações da mesma coorte de animais incluído na mesma combinação.

As informações referentes à incidência do melanoma em animais tratados e não tratados com MSCs foram calculadas através da razão de possibilidades (Equações 10 e 11) (CORNFIELD, 1951). Para tanto, os dados foram organizados em uma tabela 2 x 2 conforme demonstrado na Tabela 3 (EDWARDS, 1963). Os resultados obtidos pela Equação 10 foram convertidos para os seus logaritmos naturais. Todos os cálculos supracitados foram realizados em planilha do LibreOffice Calc.

$$OR_i = \frac{a_i \times d_i}{b_i \times c_i} \tag{10}$$

Onde OR_i é a razão de possibilidades e os valores de a_i, b_i, c_i e d_i se dão conforme detalhado na Tabela 3.

$$SE(\ln(OR_i)) = \sqrt{\frac{1}{a_i} + \frac{1}{b_i} + \frac{1}{c_i} + \frac{1}{d_i}} \tag{11}$$

Onde *SE* é o erro padrão e *ln* é o logaritmo natural.

Tabela 3 – Variáveis para o cálculo da razão de possibilidades.

Estudo$_i$	Presença de evento	Ausência de evento	Tamanho do grupo
Grupo intervenção	a_i	b_i	n_{in}
Grupo controle	c_i	d_i	n_c

As fontes de heterogeneidade analisadas foram (1) o tipo de modelo (xenotransplante ou transplante singênico), (2) o perfil imunológico dos animais, (3) a linhagem de células tumorais, (4) o tipo de MSCs, (5) a proporção de células tumorais para MSCs e (6) o tempo da análise. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados no *software* STATA 13.1 (STATACORP, 2013) (licenciado, número de série 301306269348). Neste programa, além da aplicação dos comandos metan e metareg para a performance dos cálculos de efeito **(HARBORD; HIGGINS, 2008)**, também foi utilizado o comando metafunnel para análise visual da consistência da distribuição dos dados combinados (STERNE et al., 2011; STERNE; HARBORD, 2004).

Os artigos foram classificados segundo o escore *Systematic Review Centre for Laboratory Animal Experimentation* (SYRCLE) (HOOIJMANS et al., 2014). Esta ferramenta consiste em uma lista de dez perguntas dicotômicas para estimativa do risco de viés (Tabela 4), com o número de respostas positivas correspondendo a um índice de confiabilidade do trabalho.

Tabela 4 – Lista de dez itens SYRCLE para riscos de viés.

Item	Tipo de viés	Domínio	Questão para julgamento do revisor
1	Viés de seleção	Geração de sequência	A sequência de alocação da amostra foi gerada e aplicada de modo adequado? Os animais foram distribuídos apropriadamente entre os grupos experimentais?
2	Viés de seleção	Características base	Os animais eram similares no princípio (gênero, idade, peso) ou, se não, foram ajustados como fatores de confusão na análise?
3	Viés de seleção	Sigilo de alocação	Foram relatados cuidados para que a distribuição dos animais nos grupos experimentais fosse adequadamente ocultada, evitando pistas que facilitem a dedução?
4	Viés de performance	Alojamento aleatório	Os animais foram alojados aleatoriamente ou em condições padrão (temperatura, umidade, ciclo claro/escuro, alimento) durante o experimento?
5	Viés de performance	Cegamento	Os cuidadores e/ou investigadores desconheciam as intervenções aplicadas em cada animal?
6	Viés de detecção	Avaliação aleatória dos resultados	Os resultados foram coletados de modo aleatório ou padrão?
7	Viés de detecção	Cegamento	O investigador que coletou os resultados era um observador cego?
8	Viés de atrito	Resultados com dados incompletos	Dados de resultados incompletos foram adequadamente justificados ao longo do texto?
9	Viés de relato	Conclusões seletivas	As conclusões do estudo foram livres de seletividade de resultados?
10	Outros	Outras fontes de viés	O estudo foi aparentemente livre de outros problemas que podem resultar em riscos de viés (conflitos de interesse, análises inapropriadas, etc.)?

5. Manuscrito

A ser submetido para a revista Melanoma Research

(Fator de impacto: 2.282)

Title page

Title: Subcutaneous injection of multipotent mesenchymal stromal cells and melanoma cells admixture in mice favors tumor incidence and growth: A systematic review and meta-analysis.

Running head: Mesenchymal stromal cells favor melanoma burden in mice: a systematic review and meta-analysis.

Authors: Marcos F Cordeiro[1]; Luana P Marmitt[2]; Ana P Horn[1,3].

Author affiliations: [1] Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 96210-900, Brazil. [2] Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 96210-900, Brazil. [3] Laboratório de Histologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 96210-900, Brazil.

Contact information: Corresponding author: Marcos F Cordeiro. Address: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – Av Itália, Km 8 - Rio Grande, RS, 96210-900, Brazil. Phone number: +55 53 3293 6987. Fax number: +55 53 3293-6848. Email: mfcordeiro@furg.br.

Conflicts of interest: none declared

Source of funding: none declared

Abstract

Objectives: To perform a systematic review followed by meta-analysis to evaluate wether stem cells from different sources affect experimentally induced melanoma in incidence and growth.

Methods: Systematic search was carried out in three databases (PubMed, Scopus, and Web of Science) to include all studies where stem cells were used as intervention for animal models for melanoma. Selected articles were classified according to SYRCLE's risk of bias tool for animals studies. Data from tumor incidence and growth were extracted from the eligible articles and standardized using Hedge's G for random effects meta-analysis and meta-regression. Experimental variables from adopted protocols were also extracted, as immunological profile of the animals and amount and line of cancerous and stem cells.

Results: From 494 entries, 11 articles were eligible for meta-analysis. All studies tested the effects of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs), using a single injection of adipose-derived stromal cells or bone marrow-derived stromal cells admixed with B16 mouse melanoma cells (B16-F0 or B16-F10) or with human melanoma cells (A375 or M_4Beu) in mice. Mean SYRCLE score was 3.09 out of 10. Results from random effects meta-analysis indicate that MSCs favored both tumor incidence and tumor growth ($p = 0.001$).

Conclusions: Our results show that MSCs are pro-carcinogenic in co-injection mice models for melanoma, increasing both tumor incidence and growth. However, the eligible studies adopted similar protocols, making it impossible to analyze the effects in different animals, or from different progenitor cell lines or injection times.

Keywords: animal model, cell therapy, pre-clinical trial, skin cancer

Introduction

Melanoma is the most aggressive type of skin cancer. It is a malignant neoplasm originated from the uncontrolled proliferation of melanocytes. In approximately 90% of the cases, the etiology for the mutations which lead to the pathological proliferation is the intense exposition to ultraviolet radiation [1]. Western incidence for melanoma is estimated to be around 15-20 per 100,000 person-years, leading to death in approximately 20% of the cases [2]. Melanomas identified in early stages can often be successfully treated by surgical excision, with 10 years survival rates near 100% [3]. However, as other kinds of cancer, melanoma does not have a definitive treatment once it has metastasized (stage III and IV melanoma). In these cases, all treatment options are aggressive and only partially effective systemic interventions [4]. Even when treated, advanced stage melanoma patients have an expected 10 year survival of 63% and 50%, for stage III and IV melanoma, respectively [5]. In fact, life expectancy for stage IV melanoma is estimated to be around 6-12 months [2].

New alternatives for the treatment of melanoma are constantly under research. In 1999, it was observed that multipotent mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) have strong tropism towards cancerous cells [6], which was subsequently confirmed in different kinds of stem cells and types of tumor [7]. For this reason, many studies were conducted in order to test stem cells a vehicle to selectively deliver molecules like anti-tumoral drugs, cytokines, and RNAs [8,9]. The main advantage of this approach is the avoidance of the hazardous disabling systemic effects of the currently available therapies.

Most preclinical studies for melanoma treatments are conducted with mice, as it is

the most well-established model [10]. Melanoma is usually modeled by subcutaneous injection of malignant melanoma cells (MMCs). These cells can be derived from animals of different species, mostly from mice or humans. The B16 MMC line is derived from a spontaneous melanoma in mice of the C57BL/6 line, and comprises MMCs of different metastatic potentials [11]. They are usually delivered to C57BL/6 mice (syngeneic transplantation), but can also be injected in mice with other genetic backgrounds, like BALB/C and C3H/He (allogeneic transplantation) [12,13]. There are many MMC lines from animals other than mice, including a wide variety derived from human melanomas [14] as well as canine [15], equine [16,17], and suine [18]. Cross-species transplantations are termed as xenogeneic, and this model requires immunocompromised receipients for successful tumor development [10]. Both models have advantages and disadvantages to be considered depending on the objectives of the investigation. Allogeneic or syngeneic transplantation models are obviously preferred for immunoresponse evaluation, while xenogeneic transplantation, due to the possibility of human genetic background, is indicated for gene therapy assays [10,19].

Even though there are many studies focusing on targeted substance delivery by stem cells, the effect of unmodified stem cells on different kinds of tumors, including melanomas, is not well known [20,21]. It is important not only from a clinical point of view, once the stem cell migratory behavior to cancerous cells also implies in fundamental physiological considerations as MSCs are distributed through all body tissues [22,23].

The objective of the present study was to perform a systematic review followed by a

meta-analysis on the effects of the administration of unmodified stromal/stem cells in animal models for melanoma, concerning changes in incidence rates and tumor growth.

Methods

Search strategy

The systematic search was performed in PubMed, Scopus, and Web of Science in december 12th, 2015. Search approach was conducted as proposed by Leenaars *et al*. [24], with some modifications. Free terms were included in all searches, as well as MeSH terms in PubMed. According to the syntax of each database, we performed searches including the (1) intervention, (2) disease of interest, (3) studied population, (4) outcomes, and (5) types of publication and languages (supplementary material 1). The final library from each database was achieved through the intersection of the five search results (1∩2∩3∩4∩5). The three libraries, from PubMed, Scopus, and Web of Science, were loaded in JabRef 2.10 and combined for the exclusion of duplicated or triplicated entries.

Inclusion and exclusion criteria

We included *in vivo* studies in any non-human animal subjected to the injection of any MMC concomitant or followed by the injection of any type of stem or multipotent stromal cell. Studies including any type of co-treatment or engineered cell lines were also excluded, unless they contained an experimental group that met the stipulated criteria. We also excluded studies with transgenic animals.

Screening

Study selection was performed in three stages. The first stage consisted in the title screening by only one investigator. In the second stage, the abstracts were read by two independent investigators (MFC and LPM), and disagreements were discussed between the

two. Finally, the third stage comprised the reading of the full texts, still by pairs. Authors were contacted if the full texts were not accessible or if there were doubts concerning the content of the article. If no answer was received in 30 days, the articles were excluded.

Data extraction

Methodological features and results of each study were extracted to a digital spreadsheet (LibreOffice Calc). Whenever data was unavailable in a numerical form, we contacted the authors asking for the mean±standard deviation per group or the raw values. If we received no answer within 30 days, data was extracted from the graphs using the software FIJI (ImageJ 1.50e) [25]. This approach was only possible in graphs with visible error bars and without overlapping. We used the same principle of softwares like UnGraph, Data Thief, and GraphClick, all of them already tested for accuracy [26,27]. Animals were considered as “control” when subjected only to the injection of MMCs, and as “intervention” when also treated with stem cells. Studies with more than one relevant intervention group for the same control were considered as different studies.

Risk of bias

All selected articles were evaluated according to the *Systematic Review Centre for Laboratory Animal Experimentation* (SYRCLE) 10 item checklist for risk of bias [28], and all data was subjected to visual funnel plot analysis using the command metafunnel [29] of the software STATA 13.1 [30].

Calculations

Incidence ratios over time were calculated using odds ratio [31]. Morphological data, from

area, volume, and weight, were combined using Hedge's G standardized effect [32]. Data from different assessment times were tested for heterogeneity and, as they were homogeneous and not correlated to the effect size, they were combined in a single value per study. Early observations (< 7 d) were not considered, as in most cases tumor was absent or not measurable in this time period (mean = 0). Random effects meta-regression and random effects meta-analysis were performed in the software STATA 13.1 with the commands metan and metareg, respectively [33]. Differences between groups were considered significant if $p < 0.05$.

Results

Systematic search

A total of 494 unique entries were achieved through systematic search in PubMed, Scopus, and Web of Science. After selection by title, abstract, and full text, 11 articles were considered eligible for meta-analysis. Exclusion numbers and reasons are diagrammed in figure 1, whilst study design for each included entry is summarized in table 1.

Study quality and risk of bias

Study quality assessment was performed using the SYRCLE ten-item checklist. The average score was of 3.09 out of 10, which indicates poor quality of the reports (table 2). We also evaluated the collected data distribution consistency by funnel plot. The resulting scatter plots, from tumor incidence and from tumor growth, suggested consistent and unbiased data from the results (figure 2a and 2b, respectively).

Tumor incidence

Odds ratio results were gathered from four reports. Three tested BMSCs in syngeneic melanoma models [34–36], whilst one tested ASCs in melanoma xenograft models [37]. Random effects meta-analysis showed that MSC treatment significantly increased tumor incidence in both models ($p = 0.001$), with no significant differences between them (figure 3a). When stratified by MMC type, only B16-F10 pooled odds ratio incidence was not significant favoring control ($p = 0.392$; figure 3b). Meta regression analysis evinced no correlation between tumor incidence and MMC:MSC ratio ($p > 0.05$; data not shown).

Tumor growth

Tumor growth outcomes were extracted from ten studies [35–44]. Reports with more than one treatment for the same control were fractionated per intervention protocol, resulting in 13 independent observations. Pooled effect size from area, volume, and weight showed low heterogeneity (I^2 = 3.0 %), and MSCs, when co-injected with MMCs, induced tumor growth ($p = 0.001$) (figure 4).

Pro-carcinogenic effect was observed in mice transplanted with both syngeneic and xenogeneic MMCs ($p = 0.023$). Only B16-F0 MMCs showed significant growth when co-injected with MSCs ($p = 0.008$), even though pooled effects from B16-F10, M4Beu, and A375 pointed to the same direction, favoring control ($p = 0.713$, $p = 0.167$, and $p = 0.052$, respectively). BMSCs were pro-carcinogenic ($p = 0.022$), while ASCs showed neighboring p-value to the same direction ($p = 0.052$). When comparing animal immunological profile, the effect was only significant in nude mice ($p = 0.012$). Pooled effect size from immunocompetent and NOD/SCID mice ($p = 0.149$ and $p = 0.064$, respectively) was not significant. Graphs for these analysis are available in supplementary material 2.

Meta regression did not evince correlation between MMC:MSC proportion and effect size ($p = 0.672$). No correlation was found even when isolated by the immunological profile of the animals and by the origin and type of MMCs and MSCs ($p > 0.05$) (data not shown).

Discussion

In this study, we performed a systematic review of all preclinical trials which included the effects of unmodified stem cells in animals models for melanoma, in order to perform a meta-analysis of the results reported.

Low scores were obtained by the use of SYRCLE's risk of bias tool for animal studies, with a mean score of 3.09 out of 10. Almost half of the criteria (4 out of 10) were satisfied by none of the selected studies, including highly recommended practices like blind assessment of the results. Other important procedure is the random allocation of animals into treatment groups, which was reported in only one of the 11 articles included in the meta-analysis. Just by reading the texts, it is not possible to acknowledge if some procedures were performed or not. Thus, it is important to report whenever these recommended research practices are made, once they have a direct impact on how reliable a study is in its findings.

Incomplete information concerning sample size was a frequent problem. In some works, the number of animals for each observation was not informed or reported in unclear terms, which made those articles ineligible for meta-analysis. In other reports, sample size was inconsistent throughout methods and results sections. In those cases, we extracted the data using the lowest *n*. These inadequacies are not rare in pre-clinical trials for lethal diseases. In a systematic review, Holman *et al*. [45] found that around 72.9% of pre-clinical trials for cancer did not clearly report sample size, while 6.8% did not explain discrepancy in the informed values.

The adopted protocols from all studies eligible for meta-analysis were considerably similar. Even though our search included all animal models by using the Hooijmans' animal filter [46], all eligible studies used mouse models. In fact, all 31 articles that underwent full-text examination used mice as well. It was already expected that at least the majority would use this model, considering that mice are known to be the most used animals to model melanoma [10]. However, it is an important limitation, once it is known that melanoma preclinical trials using mice have a very poor translational success, estimated to be around 5% [47]. This result shows an urge for melanoma preclinical trials using different animal models, in order to provide more reliable results for humans.

Our search included all types of stem cells, and yet all eligible studies used MSCs, and only two of its lineages, namely, ASCs and BMSCs. For this reason, it was not possible to perform comparisons among cells from other sources or with different potency profiles. Coincidentally, all eligible studies that evaluated incidence ratios with one type of MSC also adopted the same type of melanoma model (BMSCs + syngeneic MMSCs *versus* ASCs + xenogeneic MMSCs). For this reason, it is not possible to conclude if differences were due to MSC type, mice immonological profile, or MMC origin.

Pooled odds ratio from the interaction of BMSCs with B16-F0 MMCs was not significant. This result was probably due to the aggressiveness of the B16-F10 lineage [11], making tumor incidence in control animals similar to the one observed in intervention group.

In our meta-analysis, all eligible studies used co-injection models, where MMCs

and MSCs are admixed and injected simultaneously. Even though some studies using pre-established melanoma models reached to the full-text screening phase of our systematic search, unfortunately they did not meet all eligibility criteria. This is an important limitation, once the scenario provided by the co-injection model has its own particularities, including the interaction between MMCs and MSCs prior injection [48]. In fact, the effects of MSCs on cancer may change drastically depending on the administration protocol. In a recent study on the effects of MSCs on breast cancer, it was reported that MSCs are only pro-carcinogenic when co-injected with the tumoral cells, exerting anti-carcinogenic effects when delivered to tumor-bearing mice [49].

MSCs are known to exert pro-proliferative, pro-angiogenic, anti apoptotic, and immunossupressive actions [50], which potentially favor tumor development. In fact, some molecules from the MSC secretome were already identified as pro-carcinogenic, like galectin-1 [36], a pro-proliferative molecule, the vascular endothelial growth factor (VEGF) [13], and interleukin-2 (IL-2) [41], a key cytokine in the immunological modulation. The role of other molecules on cancer is controversial. Tumor necrosis alpha (TNF-α) was already identified as pro-tumoral [42], anti-tumoral [38], an effect reported to depend on the combination with interferon gamma (IFN-γ) [34]. Other molecules, however, were associated with anti-carcinogenic effects, like interferon alpha (IFN-α) [40], interferon beta (IFN-β) [51], and interleukin 12 (IL-12) [52–54]. For this reason, the use of MSCs with engineered secretome is becoming a widely studied approach. Our analysis included only results from unmodified MSCs, and the combined effect was pro-carcinogenic, which

implies in caution when using these cells as therapeutic carriers, as they are not inert. Moreover, it is possible that endogenous MSCs may be involved in tumor growth.

Taken together, our results showed that both unmodified ASCs and unmodified BMSCs are pro-carcinogenic when co-injected with melanoma cells of any lineage in mice
5 with any immunological profile. By using the meta-analytic technique, the results were compared based on its weight (sample and error size). As pro-carcinogenic effects were extracted from more consistent and more numerous reports, the combined effect kept this direction. Studies using different models for melanoma must be performed and compared for stronger evidence.

Acknowledgements

Marcos F Cordeiro would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Luana P Marmitt would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), for financial support. The authors would like to thank Dr. Fernando Cesar Wehrmeister for statistical support.

7. References

1. Gallagher RP, Lee TK, Bajdik CD, Borugian M. Ultraviolet radiation. Chronic Dis. Can. 2010;29 Suppl 1:51–68.

2. Schadendorf D, Hauschild A. Melanoma in 2013: Melanoma--the run of success continues. Nat. Rev. Clin. Oncol. 2014;11:75–6.

3. Linares MA, Zakaria A, Nizran P. Skin cancer. Prim. Care Clin. Off. Pract. 2015;42:645–59.

4. Atkinson V. Medical management of malignant melanoma. Aust. Prescr. 2015;38:74–8.

5. Edge SB, American Joint Committee on Cancer, organizadores. AJCC cancer staging manual. 7th ed. New York: Springer; 2010.

6. Maestroni GJ, Hertens E, Galli P. Factor(s) from nonmacrophage bone marrow stromal cells inhibit Lewis lung carcinoma and B16 melanoma growth in mice. Cell. Mol. Life Sci. CMLS. 1999;55:663–7.

7. Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. Gene Ther. 2008;15:730–8.

8. Pendleton C, Li Q, Chesler DA, Yuan K, Guerrero-Cazares H, Quinones-Hinojosa A. Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue vs bone marrow: in vitro comparison of their tropism towards gliomas. PloS One. 2013;8:e58198.

9. Wang J. b c, Ma D. d, Li Y. b c, Yang Y. b c, Hu X. b c, Zhang W. b c, et al. Targeted delivery of CYP2E1 recombinant adenovirus to malignant melanoma by bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles. Anticancer. Drugs. 2014;25:303–14.

10. Kuzu OF, Nguyen FD, Noory MA, Sharma A. Current state of animal (mouse) modeling in melanoma research. Cancer Growth Metastasis. 2015;8:81–94.

11. Fidler IJ. Selection of successive tumour lines for metastasis. Nature. New Biol. 1973;242:148–9.

12. Akay I, Oxmann D, Helfenstein A, Mentlein R, Schünke M, Hassenpflug J, et al. Tumor risk by tissue engineering: cartilaginous differentiation of mesenchymal stem cells reduces tumor growth. Osteoarthritis Cartilage. 2010;18:389–96.

13. Suzuki K, Sun R, Origuchi M, Kanehira M, Takahata T, Itoh J, et al. Mesenchymal stromal cells promote tumor growth through the enhancement of neovascularization.

Mol. Med. 2011;17:579–87.

14. Su DM, Zhang Q, Wang X, He P, Zhu YJ, Zhao J, et al. Two types of human malignant melanoma cell lines revealed by expression patterns of mitochondrial and survival-apoptosis genes: implications for malignant melanoma therapy. Mol. Cancer Ther. 2009;8:1292–304.

15. Inoue K, Ohashi E, Kadosawa T, Hong S-H, Matsunaga S, Mochizuki M, et al. Establishment and characterization of four canine melanoma cell lines. J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci. 2004;66:1437–40.

16. Chapman SWK, Metzger N, Grest P, Feige K, von Rechenberg B, Auer JA, et al. Isolation, establishment, and characterization of ex vivo equine melanoma cell cultures. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 2009;45:152–62.

17. Seltenhammer MH, Sundström E, Meisslitzer-Ruppitsch C, Cejka P, Kosiuk J, Neumüller J, et al. Establishment and characterization of a primary and a metastatic melanoma cell line from Grey horses. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 2014;50:56–65.

18. Green A, Shilkaitis A, Bratescu L, Amoss MS, Beattie CW. Establishment and characterization of four Sinclair swine cutaneous malignant melanoma cell lines. Cancer Genet. Cytogenet. 1992;61:77–92.

19. van der Weyden L, Patton EE, Wood GA, Foote AK, Brenn T, Arends MJ, et al. Cross-species models of human melanoma. J. Pathol. 2015;n/a – n/a.

20. Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F. Concise review: dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? STEM CELLS. 2011;29:11–9.

21. Kidd S, Spaeth E, Klopp A, Andreeff M, Hall B, Marini F. The (in) auspicious role of mesenchymal stromal cells in cancer: be it friend or foe. Cytotherapy. 2008;10:657–67.

22. Li L, Tian H, Yue W, Zhu F, Li S, Li W. Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth in vitro and in vivo. J. Cell. Physiol. 2011;226:1860–7.

23. Meirelles L da S, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. J. Cell Sci. 2006;119:2204–13.

24. Leenaars M, Hooijmans CR, van Veggel N, ter Riet G, Leeflang M, Hooft L, et al. A step-by-step guide to systematically identify all relevant animal studies. Lab. Anim. 2012;46:24–31.

25. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji:

an open-source platform for biological-image analysis. Nat. Methods. 2012;9:676–82.

26. Flower A, McKenna JW, Upreti G. Validity and reliability of GraphClick and DataThief III for data extraction. Behav. Modif. 2015;

27. Shadish WR, Brasil ICC, Illingworth DA, White KD, Galindo R, Nagler ED, et al. Using UnGraph to extract data from image files: verification of reliability and validity. Behav. Res. Methods. 2009;41:177–83.

28. Hooijmans CR, Rovers MM, de Vries RB, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. BMC Med. Res. Methodol. 2014;14:43.

29. Sterne J, Harbord R. Funnel plots in meta-analysis. Stata J. 2004;4:127–41.

30. StataCorp. Stata Statistical Software: Release 13. College Station, TX: StataCorp LP; 2013.

31. Cornfield J. A method of estimating comparative rates from clinical data; applications to cancer of the lung, breast, and cervix. J. Natl. Cancer Inst. 1951;11:1269–75.

32. Hedges LV, Olkin I. Statistical methods for meta-analysis. Orlando: Academic Press; 1985.

33. Harbord RM, Higgins JPT. Meta-regression in Stata. Stata J. 2008;8:493–519.

34. Han Z, Tian Z, Lv G, Zhang L, Jiang G, Sun K, et al. Immunosuppressive effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in inflammatory microenvironment favours the growth of B16 melanoma cells. J. Cell. Mol. Med. 2011;15:2343–52.

35. Pessina A, Bonomi A, Coccè V, Invernici G, Navone S, Cavicchini L, et al. Mesenchymal stromal cells primed with paclitaxel provide a new approach for cancer therapy. PLoS One. 2011;6:e28321.

36. Szebeni GJ, Kriston-Pál É, Blazsó P, Katona RL, Novák J, Szabó E, et al. Identification of galectin-1 as a critical factor in function of mouse mesenchymal stromal cell-mediated tumor promotion. Kalinichenko VV, organizador. PLoS ONE. 2012;7:e41372.

37. Kucerova L, Matuskova M, Hlubinova K, Altanerova V, Altaner C. Tumor cell behaviour modulation by mesenchymal stromal cells. Mol Cancer. 2010;9:129.

38. Tyciakova S, Matuskova M, Bohovic R, Polakova K, Toro L, Skolekova S, et al. Genetically engineered mesenchymal stromal cells producing TNFα have tumour suppressing effect on human melanoma xenograft: AT-MSC/hTNFα in treatment of

A375 xenografts. J. Gene Med. 2015;17:54–67.

39. Stagg J., Lejeune L., Paquin A., Galipeau J. b c. Marrow stromal cells for interleukin-2 delivery in cancer immunotherapy. Hum. Gene Ther. 2004;15:597–608.

40. Xu C, Lin L, Cao G, Chen Q, Shou P, Huang Y, et al. Interferon-α-secreting mesenchymal stem cells exert potent antitumor effect in vivo. Oncogene. 2014;33:5047–52.

41. Bahrambeigi V. b, Ahmadi N., Salehi R., Javanmard SH. c. Genetically modified murine adipose-derived mesenchymal stem cells producing interleukin-2 favor B16F10 melanoma cell proliferation. Immunol. Invest. 2015;44:216–36.

42. Ren G, Zhao X, Wang Y, Zhang X, Chen X, Xu C, et al. CCR2-dependent recruitment of macrophages by tumor-educated mesenchymal stromal cells promotes tumor development and is mimicked by TNFα. Cell Stem Cell. 2012;11:812–24.

43. Huang Y, Yu P, Li W, Ren G, Roberts AI, Cao W, et al. p53 regulates mesenchymal stem cell-mediated tumor suppression in a tumor microenvironment through immune modulation. Oncogene. 2014;33:3830–8.

44. Kucerova L, Zmajkovic J, Toro L, Skolekova S, Demkova L, Matuskova M. Tumor-driven molecular changes in human mesenchymal stromal cells. Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc. 2015;8:1–14.

45. Holman C, Piper SK, Grittner U, Diamantaras AA, Kimmelman J, Siegerink B, et al. Where have all the rodents gone? The effects of attrition in experimental research on cancer and stroke. PLoS Biol. 2016;14:e1002331.

46. Hooijmans CR, Tillema A, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M. Enhancing search efficiency by means of a search filter for finding all studies on animal experimentation in PubMed. Lab. Anim. 2010;44:170–5.

47. Hutchinson L, Kirk R. High drug attrition rates--where are we going wrong? Nat. Rev. Clin. Oncol. 2011;8:189–90.

48. Hong I-S, Lee H-Y, Kang K-S. Mesenchymal stem cells and cancer: friends or enemies? Mutat. Res. 2014;768:98–106.

49. Jazedje T, Ribeiro AL, Pellati M, de Siqueira Bueno HM, Nagata G, Trierveiler M, et al. Human mesenchymal stromal cells transplantation may enhance or inhibit 4T1 murine breast adenocarcinoma through different approaches. Stem Cells Int. 2015;2015:796215.

50. Das M, Sundell IB, Koka PS. Adult mesenchymal stem cells and their potency in the cell-based therapy. J. Stem Cells. 2013;8:1–16.

51. Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-β delivery into tumors. Cancer Res. 2002;62:3603–8.

52. Chen X, Lin X, Zhao J, Shi W, Zhang H, Wang Y, et al. A tumor-selective biotherapy with prolonged impact on established metastases based on cytokine gene-engineered MSCs. Mol Ther. 2008;16:749–56.

53. Eliopoulos N, Francois M, Boivin M-N, Martineau D, Galipeau J. Neo-organoid of marrow mesenchymal stromal cells secreting interleukin-12 for breast cancer therapy. Cancer Res. 2008;68:4810–8.

54. Seo SH, Kim KS, Park SH, Suh YS, Kim SJ, Jeun S-S, et al. The effects of mesenchymal stem cells injected via different routes on modified IL-12-mediated antitumor activity. Gene Ther. 2011;18:488–95.

Tables

Table 1. Summary of the experimental variables and outcomes.

Author (year)	Mouse model	MMC (n)	MSC (n)	MMC : MSC	Outcome	Effect
Bahrambeigi et al. (2015) [40]	wt	B16-F10 ($1x10^6$)	mASC ($1x10^6$)	1 : 1	Size	-
Han & Tian et al. (2011) [33]	wt	B16 ($5x10^6$)	mBMSC ($1x10^6$)	1 : 0.2	Incidence	+
Huang et al. (2014) [42]	wt	B16-F0 ($4x10^5$)	mBMSC ($2x10^5$)	1 : 0.5	Size	+
	NOD/ SCID	B16-F0 ($4x10^5$)	mBMSC ($2x10^5$)	1 : 0.5	Size	+
Kucerova et al. (2010) [36]	nude	M_4Beu ($1x10^6$)	hASC ($2x10^5$)	1 : 0.2	Size	+
					Incidence	?
		A375 ($1x10^5$)	hASC ($1x10^4$)	1 : 0.1	Size	+
					Incidence	?
			hASC ($1x10^5$)	1 : 1	Size	+
					Incidence	+
			hASC ($1x10^6$)	1 : 10	Size	+
					Incidence	+
Kucerova et al. (2015) [43]	nude	A375 ($5x10^5$)	hASC ($1x10^5$)	1 : 0.2	Size	+
Pessina et al. (2011) [34]	nude	B16 ($2x10^6$)	hBMSC ($4x10^5$)	1 : 0.2	Incidence	+
					Size	+
Ren et al. (2012) [41]	wt	B16-F0 ($2.5x10^5$)	mBMSC ($1x10^5$)	1 : 0.4	Size	+
Stagg et al. (2004) [38]	wt	B16 ($1x10^5$)	mBMSC ($1x10^6$)	1 : 10	Size	-
Szebeni & Kriston-Pál et al. (2012) [35]	wt	B16-F10 (500)	mBMSC ($1x10^5$)	1 : 200	Size	+
					Incidence	?
Tyciakova et al. (2015) [37]	nude	A375 ($5x10^5$)	hASC ($5x10^4$)	1 : 0.25	Size	?
			hASC ($12.5x10^4$)	1 : 0.01	Size	-
Xu et al. (2014) [39]	wt	B16 ($1x10^6$)	NA ($1x10^6$)	1 : 1	Size	+

MMC = Malignant Melanoma Cells; MSC = Mesenchymal Stem Cells; wt = Wild Type; NOD/SCID = Non-Obese Diabetic / Severely Immunodeficient; ASC = Adipose-tissue derived Stem Cell; BMSC = Bone-Marrow derived Stem Cell; m = mice; h = human; + = Increases tumor burden; - = Decreases tumor burden; ? = Not significant difference.

Table 2. SYRCLE' risk of bias tool for animal studies scores.

SYRCLE score criteria	Study id											Qualified studies (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Random allocation sequence	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.1
Similar animals	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	63.6
Allocation algorithm concealment	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
Random housing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
Blinded investigators and caretakers	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
Random result selection	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	18.2
Blinded result collection	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
Incomplete data justification	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	63.6
Unbiased conclusions	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	90.9
Other	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	63.6

Figure captions

Figure 1. Summary of the screening results.

Figure 2. Funnel plot analysis from melanoma incidence odds ratio (a) and tumor growth (b), both with consistent distribution. Dashed lines represent 95% confidence interval.

Figure 3. Melanoma incidence odds ratio random effects meta-analysis. Effect size was significant favoring control (a) ($p = 0.001$). When stratified by MMC type (b), all subtypes showed significant effects favoring control ($p < 0.05$), except by B16-F10 ($p = 0.392$).

Figure 4. Meta-analysis from tumor growth data. Heterogeneity was very low when all studies were considered together ($I^2 = 3.0$ %), and MSC and MMC co-injection favored tumor growth ($p = 0.001$).

Figure 1.

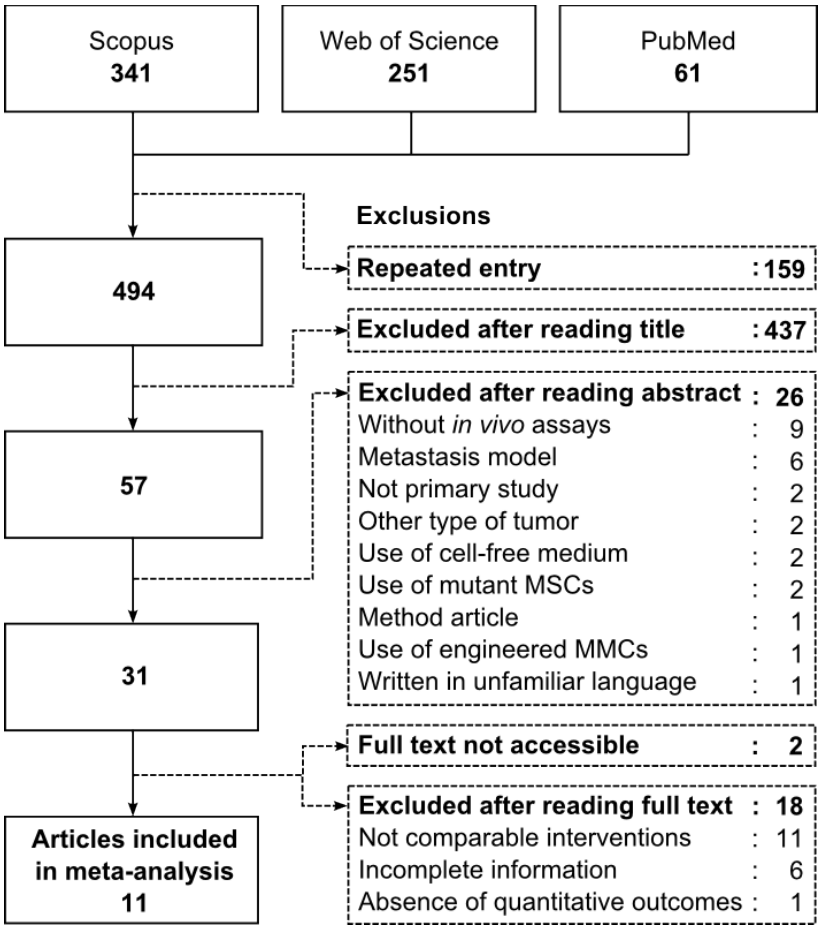

Scopus
341
Web of Science
251
PubMed
61
494
57
31
Articles included in meta-analysis
11
Exclusions
Repeated entry : 159
Excluded after reading title : 437
Excluded after reading abstract : 26
Without in vivo assays : 9
Metastasis model : 6
Not primary study : 2
Other type of tumor : 2
Use of cell-free medium : 2
Use of mutant MSCs : 2
Method article : 1
Use of engineered MMCs : 1
Written in unfamiliar language : 1
Full text not accessible : 2
Excluded after reading full text : 18
Not comparable interventions : 11
Incomplete information : 6
Absence of quantitative outcomes : 1

Figure 2.

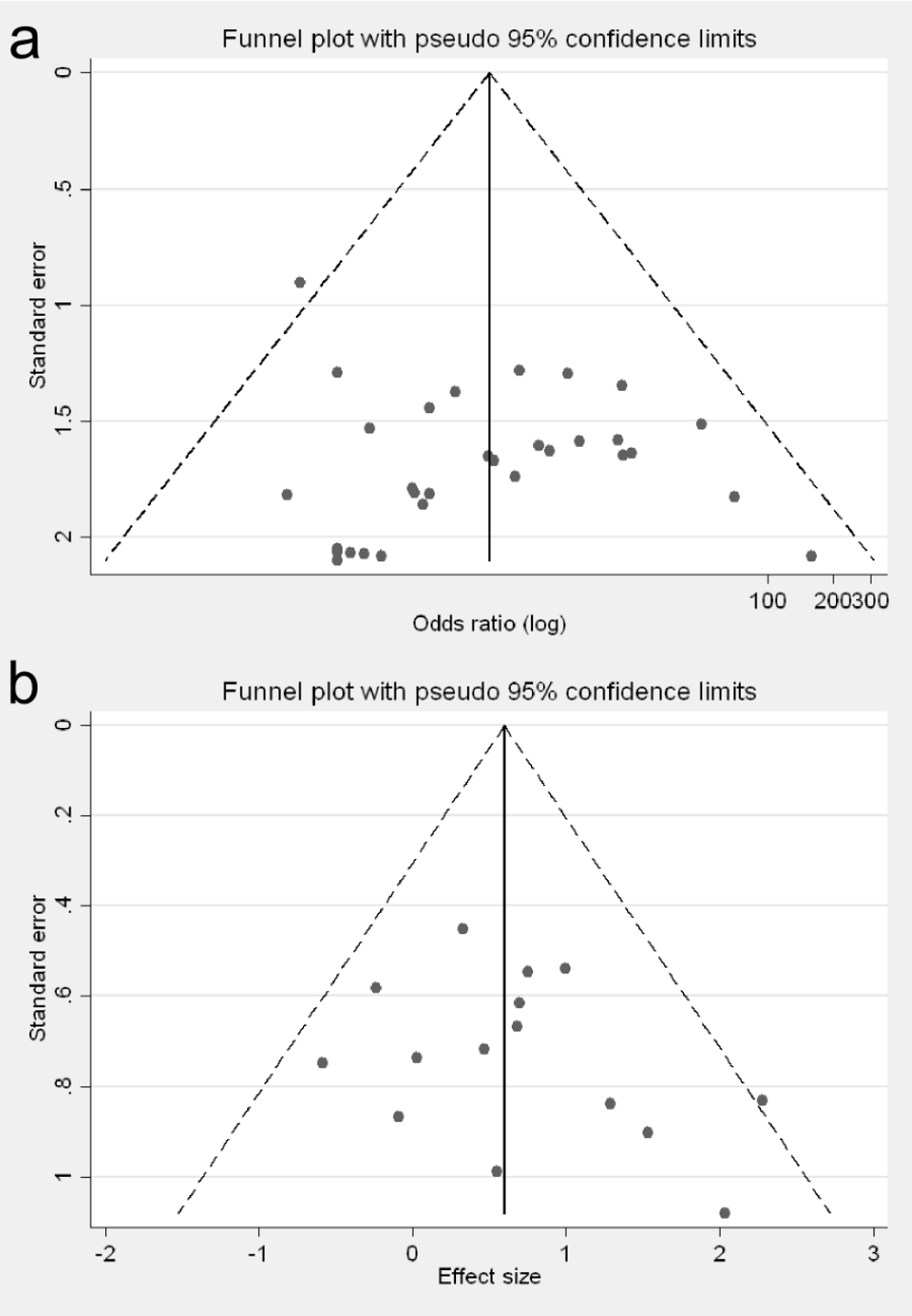

a
Funnel plot with pseudo 95% confidence limits
Standard error
0
.5
1
1.5
2
100
200300
Odds ratio (log)
b
Funnel plot with pseudo 95% confidence limits
Standard error
0
.2
.4
.6
.8
1
-2
-1
0
1
2
3
Effect size

Figure 3.

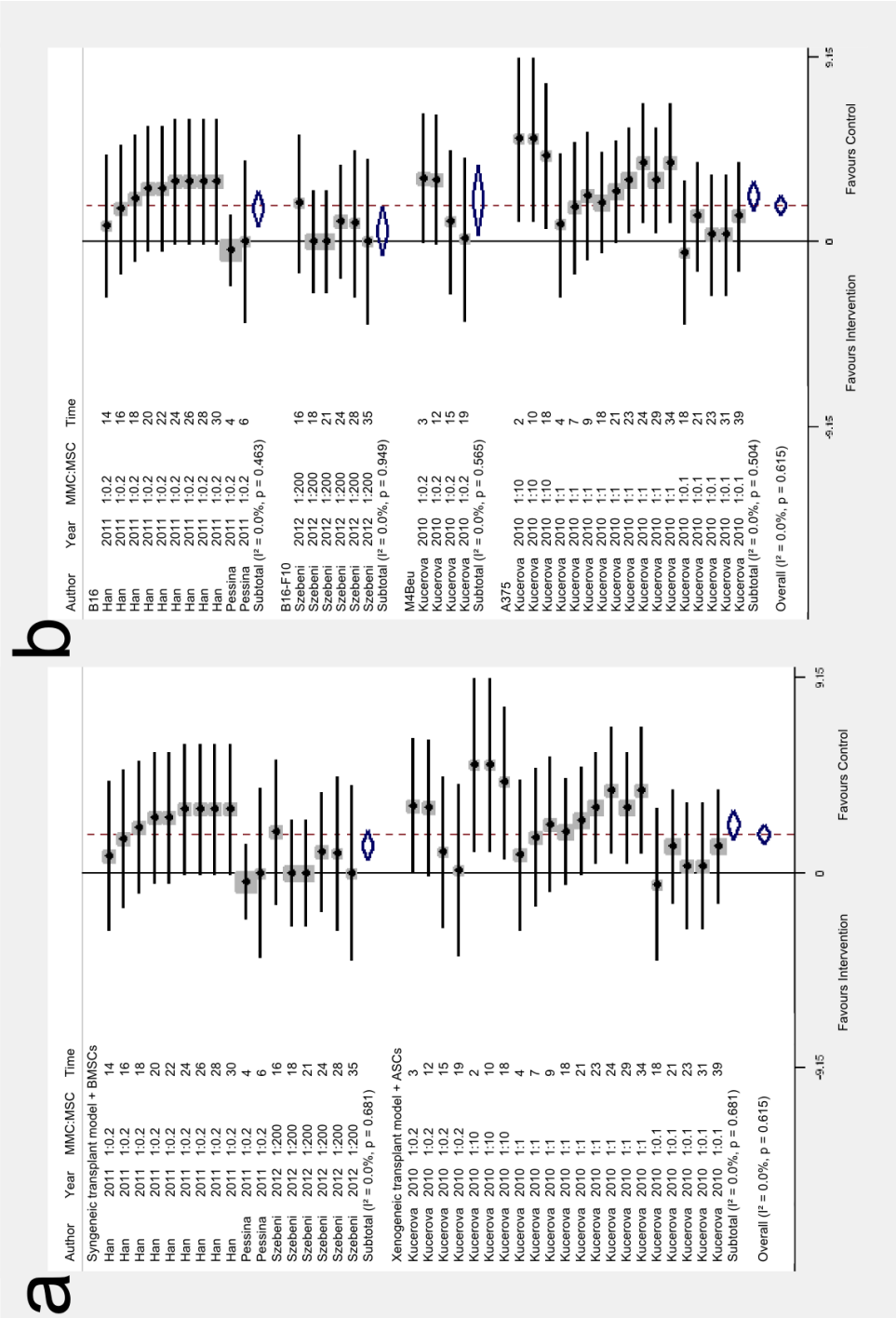
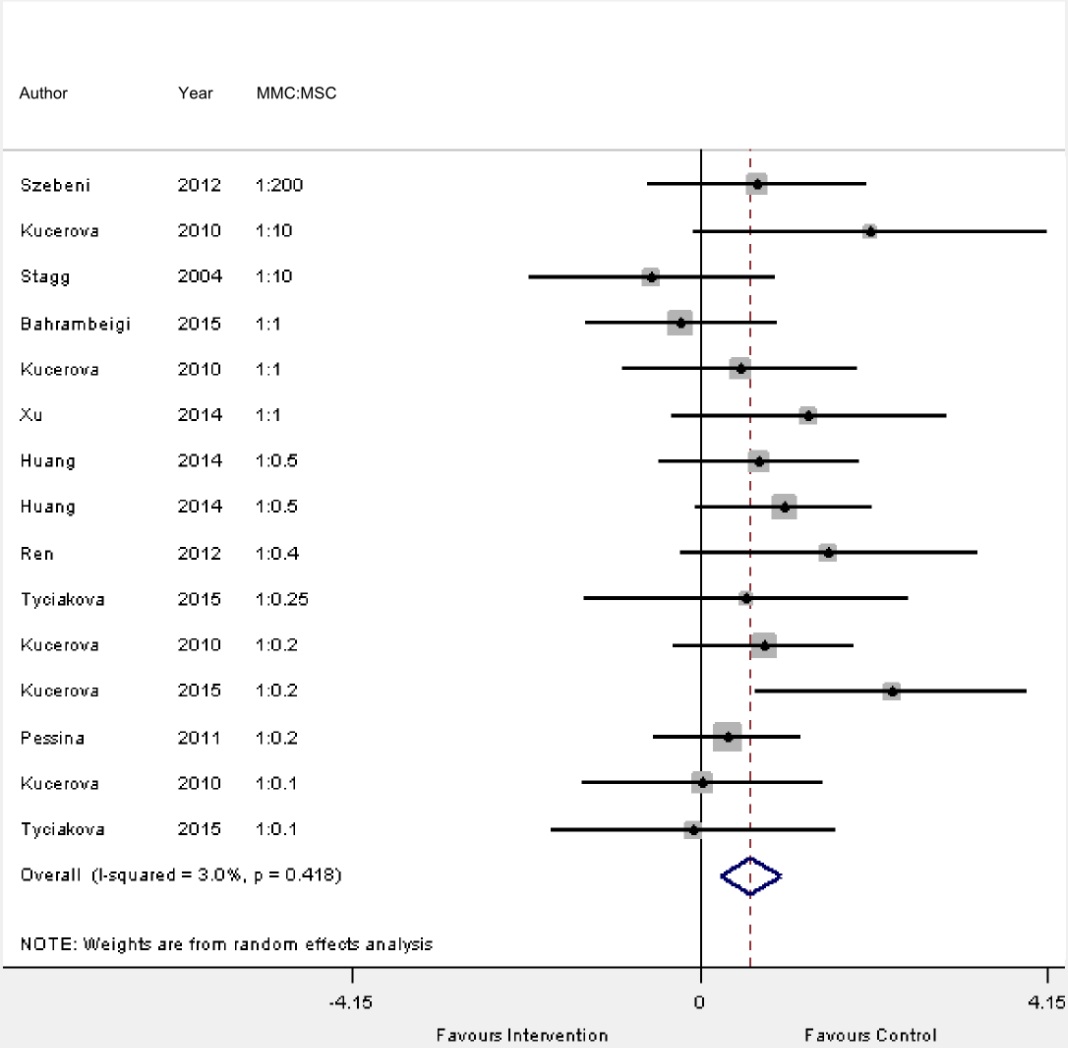

a
Author Year MMC:MSC Time
Syngeneic transplant model + BMSCs
Han 2011 1:0.2 14
Han 2011 1:0.2 16
Han 2011 1:0.2 18
Han 2011 1:0.2 20
Han 2011 1:0.2 22
Han 2011 1:0.2 24
Han 2011 1:0.2 26
Han 2011 1:0.2 28
Han 2011 1:0.2 30
Pessina 2011 1:0.2 4
Pessina 2011 1:0.2 6
Szebeni 2012 1:200 16
Szebeni 2012 1:200 18
Szebeni 2012 1:200 21
Szebeni 2012 1:200 24
Szebeni 2012 1:200 28
Szebeni 2012 1:200 35
Subtotal (I² = 0.0%, p = 0.681)
Xenogeneic transplant model + ASCs
Kucerova 2010 1:0.2 3
Kucerova 2010 1:0.2 12
Kucerova 2010 1:0.2 15
Kucerova 2010 1:0.2 19
Kucerova 2010 1:10 2
Kucerova 2010 1:10 10
Kucerova 2010 1:10 18
Kucerova 2010 1:1 4
Kucerova 2010 1:1 7
Kucerova 2010 1:1 9
Kucerova 2010 1:1 18
Kucerova 2010 1:1 21
Kucerova 2010 1:1 23
Kucerova 2010 1:1 24
Kucerova 2010 1:1 29
Kucerova 2010 1:1 34
Kucerova 2010 1:0.1 18
Kucerova 2010 1:0.1 21
Kucerova 2010 1:0.1 23
Kucerova 2010 1:0.1 31
Kucerova 2010 1:0.1 39
Subtotal (I² = 0.0%, p = 0.681)
Overall (I² = 0.0%, p = 0.615)
-9.15
0
9.15
Favours Intervention
Favours Control
b
Author Year MMC:MSC Time
B16
Han 2011 1:0.2 14
Han 2011 1:0.2 16
Han 2011 1:0.2 18
Han 2011 1:0.2 20
Han 2011 1:0.2 22
Han 2011 1:0.2 24
Han 2011 1:0.2 26
Han 2011 1:0.2 28
Han 2011 1:0.2 30
Pessina 2011 1:0.2 4
Pessina 2011 1:0.2 6
Subtotal (I² = 0.0%, p = 0.463)
B16-F10
Szebeni 2012 1:200 16
Szebeni 2012 1:200 18
Szebeni 2012 1:200 21
Szebeni 2012 1:200 24
Szebeni 2012 1:200 28
Szebeni 2012 1:200 35
Subtotal (I² = 0.0%, p = 0.949)
M4Beu
Kucerova 2010 1:0.2 3
Kucerova 2010 1:0.2 12
Kucerova 2010 1:0.2 15
Kucerova 2010 1:0.2 19
Subtotal (I² = 0.0%, p = 0.565)
A375
Kucerova 2010 1:10 2
Kucerova 2010 1:10 10
Kucerova 2010 1:10 18
Kucerova 2010 1:1 4
Kucerova 2010 1:1 7
Kucerova 2010 1:1 9
Kucerova 2010 1:1 18
Kucerova 2010 1:1 21
Kucerova 2010 1:1 23
Kucerova 2010 1:1 24
Kucerova 2010 1:1 29
Kucerova 2010 1:1 34
Kucerova 2010 1:0.1 18
Kucerova 2010 1:0.1 21
Kucerova 2010 1:0.1 23
Kucerova 2010 1:0.1 31
Kucerova 2010 1:0.1 39
Subtotal (I² = 0.0%, p = 0.504)
Overall (I² = 0.0%, p = 0.615)
-9.15
0
9.15
Favours Intervention
Favours Control

Figure 4.


Author
Year
MMC:MSC
Szebeni 2012 1:200
Kucerova 2010 1:10
Stagg 2004 1:10
Bahrambeigi 2015 1:1
Kucerova 2010 1:1
Xu 2014 1:1
Huang 2014 1:0.5
Huang 2014 1:0.5
Ren 2012 1:0.4
Tyciakova 2015 1:0.25
Kucerova 2010 1:0.2
Kucerova 2015 1:0.2
Pessina 2011 1:0.2
Kucerova 2010 1:0.1
Tyciakova 2015 1:0.1
Overall (I-squared = 3.0%, p = 0.418)
NOTE: Weights are from random effects analysis
-4.15
0
4.15
Favours Intervention
Favours Control

Supplementary materials

Supplementary material 1

#1 : INTERVENTION : Stem cells
#2 : PATHOLOGY : Melanoma
#3 : POPULATION : Animals
#4 : OUTCOME : Tumor incidence and growth
#5 : PUBLICATION TYPE : In vivo pre-clinical assays written in English, Portuguese, Spanish, French, German, or Italian.

PUBMED

#1
("adult stem cells"[MeSH Terms] OR "multipotent stem cells"[MeSH Terms] OR "mesenchymal stromal cells"[MeSH Terms] OR "adult stem cell*"[tiab] OR "multipotent stem cell*"[tiab] OR "adult stem cell*"[tiab] OR "somatic stem cell*"[tiab] OR "mesenchymal stem cell*"[tiab] OR "mesenchymal stromal cell*"[tiab] OR "adipose derived stem"[tiab] OR "adipose derived stromal cell*"[tiab] OR "adipose tissue derived stem"[tiab] OR "adipose tissue derived stromal cell*"[tiab] OR "marrow derived stem"[tiab] OR "marrow derived stromal cell*"[tiab] OR "umbilical cord * derived stem"[tiab] OR "multipotent stromal cell*"[tiab] OR "pluripotent stem cells"[MeSH Terms] OR "pluripotent stem cell*"[tiab] OR "neural stem cell*"[tiab] "embryonic stem cell*"[tiab]) NOT (scaffold*[tiab] OR biomaterial*[tiab] OR construct[tiab])

#2
(melanoma*[tiab]) NOT ("cysts"[MeSH Terms] OR "hamartoma"[MeSH Terms] OR "neoplastic syndromes, hereditary"[MeSH Terms] OR "pregnancy complications, neoplastic"[MeSH Terms] OR "tumor virus infections"[MeSH Terms] OR teratoma[tiab] OR fibrosis[tiab] OR fibroma[tiab])

#3
*

#4
(grow*[tiab] OR expansion[tiab] OR expand*[tiab] OR size[tiab] OR area[tiab] OR volume[tiab] OR multipl*[tiab] OR magnif*[tiab] OR promot*[tiab] OR enhanc*[tiab] OR benefi*[tiab] OR malef*[tiab] OR reduction[tiab] OR reduce*[tiab] OR inhibit*[tiab] OR minimize*[tiab] OR protect*[tiab] OR shrink*[tiab] OR incidence[tiab])

#5
(English[lang] OR Portuguese[lang] OR Spanish[lang] OR French[lang] OR German[lang] OR Italian[lang]) NOT (review[ti] OR Review[ptyp] OR Letter[ptyp] OR Editorial[ptyp] OR reviewed[tiab] OR review[tiab])

SCOPUS

#1
(TITLE-ABS-KEY("adult stem cell*" OR "multipotent stem cell*" OR "mesenchymal stromal cell*" OR "somatic stem cell*" OR "mesenchymal stem cell*" OR "adipose derived stem" OR "adipose derived stromal cell*" OR "adipose tissue derived stem" OR "adipose tissue derived stromal cell*" OR "marrow derived stem" OR "marrow derived stromal cell*" OR "umbilical cord * stem" OR "multipotent stromal cell*" OR "neural stem cell*" OR "pluripotent stem cell*" OR "embryonic stem cell*" OR "totipotent stem cell*" OR "induced pluripotent") AND NOT TITLE(scaffold* OR biomaterial* OR construct*))

#2
(TITLE-ABS-KEY((melanoma*) AND NOT (hamartoma* OR teratoma* OR fibrosis OR fibroma*)))

#3
*

#4
(TITLE-ABS(grow* OR expansion OR expand* OR size OR area OR volume OR multipl* OR magnif* OR promot* OR enhanc* OR benefi* OR malef* OR reduction OR reduce* OR inhibit* OR minimize* OR protect* OR shrink* OR incidence))

#5
(DOCTYPE(ar) OR DOCTYPE(ip)) AND (LIMIT-TO(LANGUAGE, "English") OR LIMIT-TO(LANGUAGE, "French") OR LIMIT-TO(LANGUAGE, "German") OR LIMIT-TO(LANGUAGE, "Spanish") OR LIMIT-TO(LANGUAGE, "Italian") OR LIMIT-TO(LANGUAGE, "Portuguese")) AND NOT TITLE-ABS(review OR reviewed)

<u>WEB OF SCIENCE</u>

#1
TS=("adult stem cell*" OR "multipotent stem cell*" OR "mesenchymal stromal cell*" OR "somatic stem cell*" OR "mesenchymal stem cell*" OR "adipose derived stem" OR "adipose derived stromal cell*" OR "adipose tissue derived stem" OR "adipose tissue derived stromal cell*" OR "marrow derived stem" OR "marrow derived stromal cell*" OR "umbilical cord * stem" OR "multipotent stromal cell*" OR "neural stem cell*" OR "pluripotent stem cell*" OR "induced pluripotent" OR "embryonic stem cell*" OR "totipotent stem cell*" OR "induced pluripotent") NOT TI=(scaffold* OR biomaterial* OR construct*)

#2
TS=((melanoma*) NOT (hamartoma OR teratoma OR fibrosis OR fibroma*))

#3
*

#4

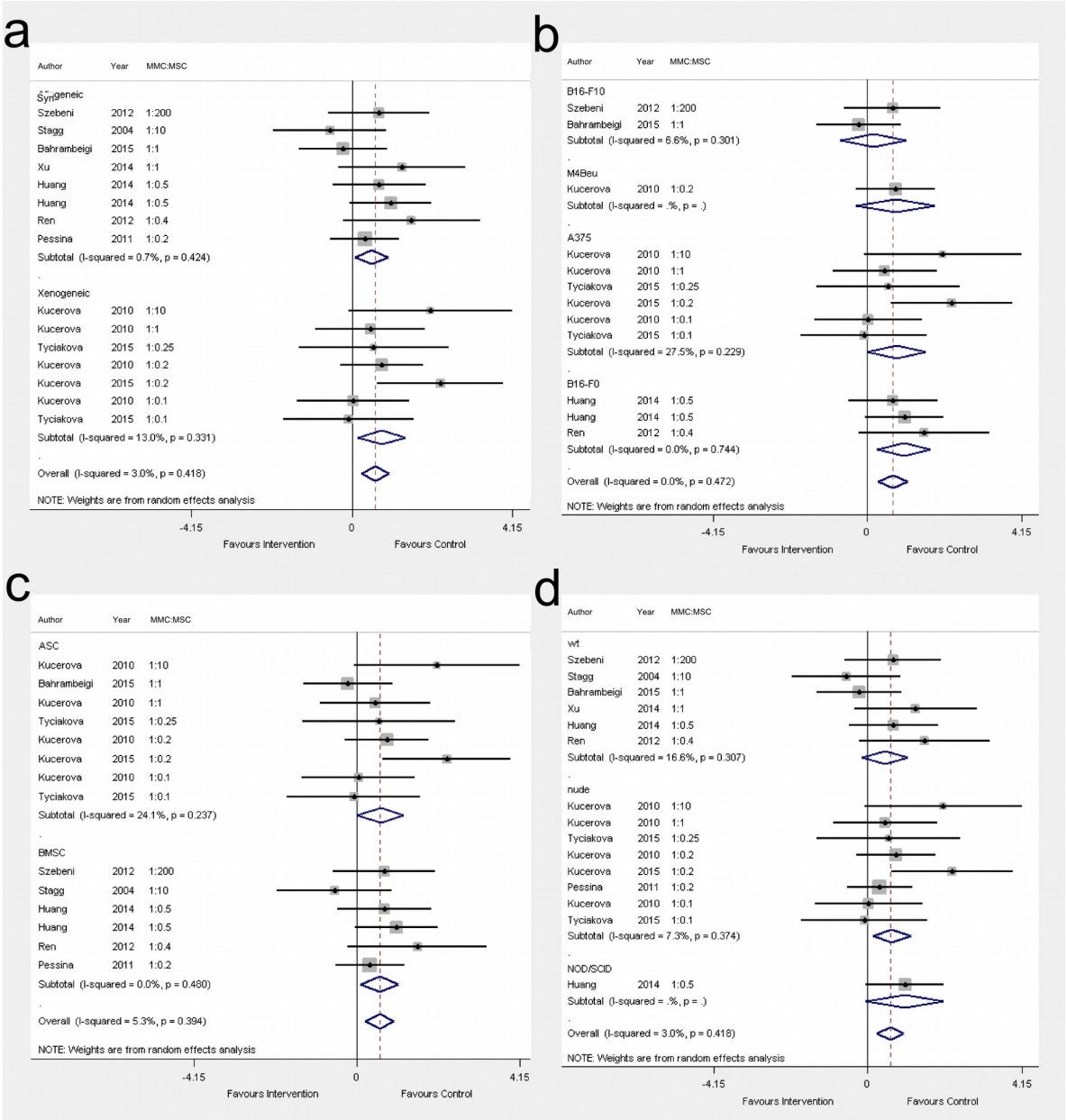
TS=(grow* OR expansion OR expand* OR size OR area OR volume OR multipl* OR magnif* OR promot* OR enhanc* OR benefi* OR malef* OR reduction OR reduce* OR inhibit* OR minimize* OR protect* OR shrink* OR incidence)

#5
**

---

* = Hooijiman's animal filter (Hooijmans CR, Tillema A, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M. Enhancing search efficiency by means of a search filter for finding all studies on animal experimentation in PubMed. Lab. Anim. 2010;44:170–5). The filter syntax was adapted accordingly to each search database.
** = Applied using website search filters.

Supplementary Material 2



6. Discussão geral

Neste trabalho, realizamos uma revisão sistemática compreendendo todos os ensaios que avaliaram os efeitos de células-tronco em modelos *in vivo* para melanoma. A seguir, após a seleção dos trabalhos elegíveis, realizamos uma meta-análise. Todos trabalhos elegíveis testaram os efeitos de MSCs originárias de medula óssea ou tecido adiposo em modelos de coinjeção com células de melanoma em camundongos.

Os resultados obtidos a partir dos 13 artigos elegíveis demonstraram que MSCs testadas nas referidas condições favorecem tanto a incidência quanto o crescimento do tumor em camundongos. As razões para esse efeito ainda não são consensuais, mas a neovascularização promovida por MSCs é uma forte candidata (SUZUKI et al., 2011). Infelizmente, alterações na densidade de vasos não é um parâmetro comumente avaliado em ensaios *in vivo* para melanoma. Outro estudo identificou a galectina-1 como elemento-chave para os efeitos pró-tumorais de MSCs, dado que esta proteína está diretamente envolvida com a regulação da proliferação celular (SZEBENI et al., 2012). Outra molécula secretada por MSCs identificada como pró-tumoral é a IL-2, reguladora da resposta imunológica (BAHRAMBEIGI et al., 2015). O papel de outras moléculas ainda é controverso, como do TNF-α, já tido como pró-carcinogênico (REN et al., 2012) e anti-carcinogênico (TYCIAKOVA et al., 2015). Em outro estudo, foi observado que o efeito pró-tumoral só é observado em TNF-α quando em combinação com IFN-γ (HAN et al., 2011). Efeitos anti-tumorais já foram associados com o papel exercido por IFN-α (XU et al., 2014), IFN-β (STUDENY et al., 2002) e IL-12 (CHEN et al., 2008; ELIOPOULOS et al., 2008; SEO et al., 2011). Por esta razão, MSCs geneticamente modificadas para superexpressão de fatores anti-tumorais e não secreção de fatores pró-tumorais tem se tornado uma abordagem amplamente estudada, apesar de muito ainda precisar ser definido quanto ao papel das diferentes moléculas do secretoma de MSCs em tumores. Como nossa análise compreendeu somente análises com

MSCs não-modificadas, nossos resultados demonstraram que, quando injetadas concomitantemente com células cancerosas, possuem efeito pró-carcinogênico. Isto implica, em primeiro lugar, em cautela para o uso de MSCs selvagens como simples carreadoras de outras moléculas, dado que não se tratam de veículos inertes, e, em segundo lugar, que MSCs endógenas podem estar envolvidas no crescimento de tumores no organismo, dado que MSCs possuem comportamento migratório em direção a tumores.

Um dos motivos mais comuns para a exclusão de artigos foi a de informações incompletas. Para a meta-análise, as informações básicas a serem extraídas dos resultados são o *n*, a média e o desvio padrão (ou erro padrão). Alguns artigos selecionados para leitura completa não trouxeram a informação do tamanho da amostra ou a relataram sem clareza, precisando ser excluídos. Infelizmente, este é um problema comum em trabalhos com modelos para doenças letais, incluindo câncer (HOLMAN et al., 2016). A média e o desvio padrão também não puderam ser obtidos em alguns casos. Se os gráficos estão plotados de modo adequado, estas informações podem ser extraídas com bastante confiabilidade. Infelizmente, este não foi o caso para um grande número de trabalhos, com gráficos sem resolução satisfatória, ausência de escala ou sobreposição nas representações de valores. Estes problemas acabaram sendo definitivos para a não inclusão de todos os trabalhos para modelos de tumor preestabelecido.

O modelo de coinjeção, no qual as células cancerígenas e as células utilizadas como intervenção são misturadas e injetadas simultaneamente, foi comum a todos os trabalhos elegíveis para a meta-análise. Este modelo é mais prático, e talvez por isso mais amplamente utilizado. Este modelo, porém, é criticado por representar um cenário menos realista (HONG; LEE; KANG, 2014). Inclusive foi observado recentemente que, por este modelo, MSCs são mais pró-carcinogênicas em comparação com o modelo de tumor preestabelecido (JAZEDJE et al., 2015).

Apesar de a pesquisa sistemática ter sido realizada a fim de englobar todos os tipos de células

indiferenciadas candidatas à terapia celular, os trabalhos elegíveis invariavelmente utilizaram MSCs. Já era esperado que ao menos a maior parte dos trabalhos utilizasse células multipotentes originárias de tecido adiposo ou medula óssea. Afinal, sua obtenção livre de controvérsias e de procedimento relativamente simples tornam as expectativas para uso clínico mais realistas (DAS; SUNDELL; KOKA, 2013). Entretanto, efeitos de diferentes magnitudes poderiam ter sido esperados para células de diferentes características, e isto não pôde ser comparado.

O “filtro animal” (HOOIJMANS et al., 2010) foi empregado como termo de pesquisa a fim de englobar todos os modelos animais para melanoma. Contudo, todos os trabalhos elegíveis utilizaram camundongos. Isto também não foi surpresa, dado que camundongos são, com uma larga margem, os modelos animais mais utilizados para melanoma experimentalmente induzido (KUZU et al., 2015). Apesar disso, comparações com outros modelos seriam importantes para avaliação da consistência interespecífica dos achados.

Mesmo com essas limitações, a meta-análise se demonstrou pertinente para a interpretação dos dados disponíveis na bibliografia científica. Apenas pela análise textual, a controvérsia a respeito do efeito de MSCs em modelos para melanoma se mostra inconclusiva, com alguns relatos de MSCs não-modificadas exercendo efeito antitumoral (AHN et al., 2013; STAGG et al., 2004) em contraste com outros relatando o efeito oposto (HAN et al., 2011; KUCEROVA et al., 2010). Através da meta-análise, esses resultados puderam ser comparados sob a luz de seu peso (tamanho da amostra e do erro). Como os resultados mais numerosos e consistentes se originaram de trabalhos nos quais o efeito foi pró-carcinogênico, o efeito combinado manteve esta direção. Assim, temos um exemplo pelo qual meta-análises se mostram abordagens relevantes na resolução de controvérsias em achados científicos.

7. Bibliografia geral

ABBASI, N. R. et al. Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. **JAMA**, v. 292, n. 22, p. 2771, 8 dez. 2004.

AHN, J. OK et al. Anti-tumor effect of adipose tissue derived-mesenchymal stem cells expressing interferon-β and treatment with cisplatin in a xenograft mouse model for canine melanoma. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 9 set. 2013.

AKAY, I. et al. Tumor risk by tissue engineering: cartilaginous differentiation of mesenchymal stem cells reduces tumor growth. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, n. 3, p. 389–396, 1 mar. 2010.

ALDRIDGE, R. B. et al. Novice identification of melanoma: not quite as straightforward as the ABCDs. **Acta dermato-venereologica**, v. 91, n. 2, p. 125–130, mar. 2011.

AL-NBAHEEN, M. et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. **Stem Cell Reviews**, v. 9, n. 1, p. 32–43, fev. 2013.

ATKINSON, V. Medical management of malignant melanoma. **Australian Prescriber**, v. 38, n. 3, p. 74–78, jun. 2015.

AUGELLO, A.; DE BARI, C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. **Human Gene Therapy**, v. 21, n. 10, p. 1226–1238, out. 2010.

BAHRAMBEIGI, V. . B et al. Genetically modified murine adipose-derived mesenchymal stem cells producing interleukin-2 favor B16F10 melanoma cell proliferation. **Immunological Investigations**, v. 44, n. 3, p. 216–236, 2015.

BALCH, C. M. et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 36, p. 6199–6206, 20 dez. 2009.

BATAILLE, V. et al. Solar keratoses: a risk factor for melanoma but negative association with melanocytic naevi. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 78, n. 1, p. 8–12, 25 set. 1998.

BERWICK, M. et al. Melanoma epidemiology and prevention. **Cancer Treatment and Research**, v. 167, p. 17–49, 2016.

BISHOP, J. A. N. The genetics of susceptibility to cutaneous melanoma. **Drugs of Today**, v. 41, n. 3, p. 193, 2005.

BOUKERCHE, H. et al. mda-9/Syntenin promotes metastasis in human melanoma cells by activating c-Src. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 41, p. 15914–15919, 14 out. 2008.

BRÄNSTRÖM, R. et al. Laypersons' perceptual discrimination of pigmented skin lesions. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 46, n. 5, p. 667–673, maio 2002.

CAINI, S. et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma according to anatomical site and clinico-pathological variant. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 45, n. 17, p. 3054–3063, nov. 2009.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 9, n. 5, p. 641–650, set. 1991.

CHAPMAN, P. B. et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2507–2516, 30 jun. 2011.

CHAPMAN, S. W. K. et al. Isolation, establishment, and characterization of ex vivo equine melanoma cell cultures. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal**, v. 45, n. 3-4, p. 152–162, abr. 2009.

CHEN, Q. et al. Antitumor activity of placenta-derived mesenchymal stem cells producing pigment epithelium-derived factor in a mouse melanoma model. **Oncology Letters**, v. 4, n. 3, p. 413–418, 2012.

CHEN, X. et al. Prophylaxis against carcinogenesis in three kinds of unestablished tumor models via IL12-gene-engineered MSCs. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 12, p. 2434–2441, 12 jan. 2006.

CHEN, X. et al. A tumor-selective biotherapy with prolonged impact on established metastases based on cytokine gene-engineered MSCs. **Mol Ther**, v. 16, n. 4, p. 749–756, abr. 2008.

CLARK, E. A. et al. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. **Nature**, v. 406, n. 6795, p. 532–535, 3 ago. 2000.

COHNHEIM, J. Über Entzündung und Eiterung. **Pathologische Anatomie**, Virchows Archiv A: Pathology. v. 40, p. 1–79, 1867.

CORNFIELD, J. A method of estimating comparative rates from clinical data; applications to cancer of the lung, breast, and cervix. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 11, n. 6, p. 1269–1275, jun. 1951.

COUSIN, B. et al. Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both in vitro and in vivo. **PloS One**, v. 4, n. 7, p. e6278, 2009.

DANIEL JENSEN, J.; ELEWSKI, B. E. The ABCDEF Rule: Combining the “ABCDE Rule” and the “Ugly Duckling Sign” in an Effort to Improve Patient Self-Screening Examinations. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 8, n. 2, p. 15, fev. 2015.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells (Dayton, Ohio)**, v. 26, n. 9, p. 2287–2299, set. 2008.

DAS, M.; SUNDELL, I. B.; KOKA, P. S. Adult mesenchymal stem cells and their potency in the cell-based therapy. **Journal of Stem Cells**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2013.

DE ANGELIS, R. et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EUROCARE--5-a population-based study. **The Lancet. Oncology**, v. 15, n. 1, p. 23–34, jan. 2014.

DENNIS, L. K. et al. Sunburns and risk of cutaneous melanoma: does age matter? A comprehensive meta-analysis. **Annals of Epidemiology**, v. 18, n. 8, p. 614–627, ago. 2008.

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

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

DOMINICI, M. et al. Heterogeneity of multipotent mesenchymal stromal cells: from stromal cells to stem cells and vice versa. **Transplantation**, v. 87, n. 9 Suppl, p. S36–42, 15 maio 2009.

DU SERT, N. P.; CHAPMAN, K. Systematic review and meta-analysis of the self-administration of opioids in rats and nonhuman primates to provide evidence for the choice of species in models of abuse potential. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 68, n. 1, p. e8–e9, jul. 2013.

EBELL, M. Clinical diagnosis of melanoma. **American Family Physician**, v. 78, n. 10, p. 1205, 1208, 15 nov. 2008.

EDGE, S. B.; AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER (EDS.). **AJCC cancer staging manual**. 7th ed ed. New York: Springer, 2010.

EDWARDS, A. W. F. The Measure of Association in a 2 × 2 Table. **Journal of the Royal Statistical Society. Series A (General)**, v. 126, n. 1, p. 109–114, 1963.

ELAHI, K. C. et al. Human mesenchymal stromal cells from different sources diverge in their expression of cell surface proteins and display distinct differentiation patterns. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 5646384, 2016.

ELIOPOULOS, N. et al. Neo-organoid of marrow mesenchymal stromal cells secreting interleukin-12 for breast cancer therapy. **Cancer Research**, v. 68, n. 12, p. 4810–4818, jun. 2008.

ELZAOUK, L.; MOELLING, K.; PAVLOVIC, J. Anti-tumor activity of mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse melanoma model. **Experimental Dermatology**, v. 15, n. 11, p. 865–874, nov. 2006.

FARINI, A. et al. Clinical applications of mesenchymal stem cells in chronic diseases. **Stem Cells International**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

FENG, Z.; ZHANG, Z.; WU, X.-C. Lifetime risks of cutaneous melanoma by histological subtype and race/ethnicity in the United States. **The Journal of the Louisiana State Medical Society: Official Organ of the Louisiana State Medical Society**, v. 165, n. 4, p. 201–208, ago. 2013.

FERLAY, J. et al. **Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>. Acesso em: 28 jan. 2016.

FIDLER, I. J. Selection of successive tumour lines for metastasis. **Nature: New Biology**, v. 242, n. 118, p. 148–149, 4 abr. 1973.

FIEBIG, H. H. et al. Comparison of tumor response in nude mice and in the patients. **Behring Institute Mitteilungen**, n. 74, p. 343–352, maio 1984.

FLAHERTY, K. T. et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 9, p. 809–819, 26 ago. 2010.

FLAHERTY, K. T. et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 2, p. 107–114, 12 jul. 2012.

FLANAGAN, S. P. “Nude”, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. **Genetical Research**, v. 8, n. 3, p. 295–309, dez. 1966.

FLOWER, A.; MCKENNA, J. W.; UPRETI, G. Validity and reliability of GraphClick and DataThief III for data extraction. **Behavior Modification**, 26 nov. 2015.

FRIEDENSTEIN, A. J. et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v. 6, n. 2, p. 230–247, mar. 1968.

FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I. I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 16, n. 3, p. 381–390, dez. 1966.

FRIEDMAN, R. J.; RIGEL, D. S.; KOPF, A. W. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 35, n. 3, p. 130–151, jun. 1985.

GACHON, J. et al. First prospective study of the recognition process of melanoma in dermatological practice. **Archives of Dermatology**, v. 141, n. 4, p. 434–438, abr. 2005.

GALLAGHER, R. P. et al. Ultraviolet radiation. **Chronic Diseases in Canada**, v. 29 Suppl 1, p. 51–68, 2010.

GANDINI, S. et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 41, n. 1, p. 45–60, jan. 2005a.

GANDINI, S. et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 41, n. 1, p. 28–44, jan. 2005b.

GARBE, C.; LEITER, U. Melanoma epidemiology and trends. **Clinics in Dermatology**, v. 27, n. 1, p. 3–9, fev. 2009.

GEHLSEN, K. R.; HENDRIX, M. J. In vitro assay demonstrates similar invasion profiles for B16F1 and B16F10 murine melanoma cells. **Cancer Letters**, v. 30, n. 2, p. 207–212, fev. 1986.

GIARD, D. J. et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, n. 5, p. 1417–1423, nov. 1973.

GLASS, G. V. Primary, secondary, and meta-analysis of research. **Educational Researcher**, v. 5, n. 10, p. 3–8, 1 nov. 1976.

GOYDOS, J. S.; SHOEN, S. L. Acral lentiginous melanoma. **Cancer Treatment and Research**, v. 167, p. 321–329, 2016.

GREEN, A. et al. Establishment and characterization of four Sinclair swine cutaneous malignant melanoma cell lines. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 61, n. 1, p. 77–92, 1 jul. 1992.

GROB, J. J.; BONERANDI, J. J. The “ugly duckling” sign: identification of the common characteristics of nevi in an individual as a basis for melanoma screening. **Archives of Dermatology**, v. 134, n. 1, p. 103–104, jan. 1998.

HAN, Z. et al. Immunosuppressive effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in inflammatory microenvironment favours the growth of B16 melanoma cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 11, p. 2343–2352, nov. 2011.

HARBORD, R. M.; HIGGINS, J. P. T. Meta-regression in Stata. **The Stata Journal**, v. 8, n. 4, p. 493–519, 2008.

HARRINGTON, M. Marsupials that model melanoma. **Lab Animal**, v. 44, n. 2, p. 53, fev. 2015.

HAUSCHILD, A. et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. **Lancet (London, England)**, v. 380, n. 9839, p. 358–365, 28 jul. 2012.

HEDGES, L. V.; OLKIN, I. **Statistical methods for meta-analysis**. Orlando: Academic Press, 1985.

HEINZERLING, L. M. et al. Tumor regression induced by intratumoral injection of DNA coding for human interleukin 12 into melanoma metastases in gray horses. **Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)**, v. 78, n. 12, p. 692–702, 2001.

HERLYN, M.; FUKUNAGA-KALABIS, M. What is a good model for melanoma? **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 4, p. 911–912, abr. 2010.

HESTON, W. E.; PARKS, W. P. Mammary tumor virus and host genome in the transmission and causation of mammary tumors in mice. **Canadian Journal of Genetics and Cytology. Journal Canadien De Génétique Et De Cytologie**, v. 17, n. 4, p. 493–502, dez. 1975.

HODI, F. S. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 8, p. 711–723, 19 ago. 2010.

HOLMAN, C. et al. Where have all the rodents gone? The effects of attrition in experimental research on cancer and stroke. **PLoS Biol**, v. 14, n. 1, p. e1002331, 4 jan. 2016.

HONG, I.-S.; LEE, H.-Y.; KANG, K.-S. Mesenchymal stem cells and cancer: friends or enemies? **Mutation Research**, v. 768, p. 98–106, out. 2014.

HOOIJMANS, C. R. et al. Enhancing search efficiency by means of a search filter for finding all

studies on animal experimentation in PubMed. **Laboratory Animals**, v. 44, n. 3, p. 170–175, 7 jan. 2010.

HOOIJMANS, C. R. et al. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. **BMC Medical Research Methodology**, v. 14, p. 43, 26 mar. 2014.

HORWITZ, E. M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393–395, 2005.

HUH, S. J. et al. Macrophage inhibitory cytokine-1 regulates melanoma vascular development. **The American Journal of Pathology**, v. 176, n. 6, p. 2948–2957, jun. 2010a.

HUH, S. J. et al. Transiently entrapped circulating tumor cells interact with neutrophils to facilitate lung metastasis development. **Cancer Research**, v. 70, n. 14, p. 6071–6082, 15 jul. 2010b.

HUTCHINSON, L.; KIRK, R. High drug attrition rates--where are we going wrong? **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 8, n. 4, p. 189–190, abr. 2011.

IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. Radiation. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer**, v. 100, n. Pt D, p. 7–303, 2012.

INOUE, K. et al. Establishment and characterization of four canine melanoma cell lines. **The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 66, n. 11, p. 1437–1440, nov. 2004.

ISHII, T.; ETO, K. Fetal stem cell transplantation: Past, present, and future. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 4, p. 404–420, 26 set. 2014.

JAZEDJE, T. et al. Human mesenchymal stromal cells transplantation may enhance or inhibit 4T1 murine breast adenocarcinoma through different approaches. **Stem Cells International**, v. 2015, p. 796215, 2015.

KERBEL, R. S. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. **Cancer Biology & Therapy**, v. 2, n. 4 Suppl 1, p. S134–139, ago. 2003.

KHAKOO, A. Y. et al. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 5, p. 1235–1247, 15 maio 2006.

KHALED, W. T.; LIU, P. Cancer mouse models: past, present and future. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 27, p. 54–60, mar. 2014.

KITTLER, H. et al. Identification of clinically featureless incipient melanoma using sequential dermoscopy imaging. **Archives of Dermatology**, v. 142, n. 9, p. 1113–1119, set. 2006.

KLOPP, A. H. et al. Concise review: dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem

cells support or suppress tumor growth? **STEM CELLS**, v. 29, n. 1, p. 11–19, 1 jan. 2011.

KOREVAAR, D. A.; HOOFT, L.; RIET, G. TER. Systematic reviews and meta-analyses of preclinical studies: publication bias in laboratory animal experiments. **Laboratory Animals**, v. 45, n. 4, p. 225–230, 10 jan. 2011.

KUCEROVA, L. et al. Tumor cell behaviour modulation by mesenchymal stromal cells. **Mol Cancer**, v. 9, p. 129, 2010.

KUZU, O. F. et al. Current state of animal (mouse) modeling in melanoma research. **Cancer Growth and Metastasis**, v. 8, n. Suppl 1, p. 81–94, 6 out. 2015.

LARKIN, J. et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 20, p. 1867–1876, 13 nov. 2014.

LEE, J.-H. et al. Effect of adipose-derived stem cell-conditioned medium on the proliferation and migration of B16 melanoma cells. **Oncol Lett**, v. 10, n. 2, p. 730–736, ago. 2015.

LEENAARS, M. et al. A step-by-step guide to systematically identify all relevant animal studies. **Laboratory Animals**, v. 46, n. 1, p. 24–31, jan. 2012.

LINARES, M. A.; ZAKARIA, A.; NIZRAN, P. Skin cancer. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 42, n. 4, p. 645–659, dez. 2015.

LIN, G. et al. Effects of transplantation of adipose tissue-derived stem cells on prostate tumor. **The Prostate**, v. 70, n. 10, p. 1066–1073, 1 jul. 2010.

LIU, T. M. et al. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. **STEM CELLS**, v. 25, n. 3, p. 750–760, 9 nov. 2006.

LOEBINGER, M. R. et al. Magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells homing to pulmonary metastases using biocompatible magnetic nanoparticles. **Cancer Research**, v. 69, n. 23, p. 8862–8867, 12 jan. 2009.

LONG, G. V. et al. Dabrafenib in patients with Val600Glu or Val600Lys BRAF-mutant melanoma metastatic to the brain (BREAK-MB): a multicentre, open-label, phase 2 trial. **The Lancet. Oncology**, v. 13, n. 11, p. 1087–1095, nov. 2012.

MAESTRONI, G. J.; HERTENS, E.; GALLI, P. Factor(s) from nonmacrophage bone marrow stromal cells inhibit Lewis lung carcinoma and B16 melanoma growth in mice. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 55, n. 4, p. 663–667, abr. 1999.

MALVEHY, J. et al. Nodular Melanoma. In: HOFMANN-WELLENHOF, R. et al. (Eds.). . **Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases**. Berlin; New York. Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 197–212.

MCKENNA, J. K. et al. Lentigo maligna/lentigo maligna melanoma: current state of diagnosis and

treatment. **Dermatologic Surgery: Official Publication for American Society for Dermatologic Surgery**, v. 32, n. 4, p. 493–504, abr. 2006.

MCPHERSON, M. et al. Presentation and detection of invasive melanoma in a high-risk population. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, n. 5, p. 783–792, maio 2006.

MEIRELLES, L. DA S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. Pt 11, p. 2204–2213, 1 jun. 2006.

MEREDITH, P.; RIESZ, J. Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 79, n. 2, p. 211–216, fev. 2004.

MERLINO, G. et al. Meeting report: The future of preclinical mouse models in melanoma treatment is now. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 26, n. 4, p. E8–E14, jul. 2013.

MILLIKAN, L. E. et al. Melanoma in Sinclair swine: a new animal model. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 62, n. 1, p. 20–30, jan. 1974.

MISFELDT, M. L.; GRIMM, D. R. Sinclair miniature swine: an animal model of human melanoma. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 43, n. 1-3, p. 167–175, out. 1994.

MOLONEY, F. J. et al. Detection of primary melanoma in individuals at extreme high risk: a prospective 5-year follow-up study. **JAMA dermatology**, v. 150, n. 8, p. 819–827, ago. 2014.

MONTI, M. et al. Stem cells: sources and therapies. **Biological Research**, v. 45, n. 3, p. 207–214, 2012.

MORSE, M. A. Technology evaluation: ipilimumab, Medarex/Bristol-Myers Squibb. **Current Opinion in Molecular Therapeutics**, v. 7, n. 6, p. 588–597, dez. 2005.

NAKAMURA, K. et al. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. **Life Sciences**, v. 70, n. 7, p. 791–798, 4 jan. 2002.

O'ROURKE, K. An historical perspective on meta-analysis: dealing quantitatively with varying study results. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 100, n. 12, p. 579–582, dez. 2007.

PARDOLL, D. Does the immune system see tumors as foreign or self? **Annual Review of Immunology**, v. 21, n. 1, p. 807–839, 2003.

PATEL, S. A. et al. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory t cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-β. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 10, p. 5885–5894, 15 maio 2010.

PATTON, E. E.; MITCHELL, D. L.; NAIRN, R. S. Genetic and environmental melanoma models in fish. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 23, n. 3, p. 314–337, jun. 2010.

PEARSON, K. Report on Certain Enteric Fever Inoculation Statistics. **British Medical Journal**, v. 2, n. 2288, p. 1243–1246, 5 nov. 1904.

PESSINA, A. et al. Mesenchymal stromal cells primed with paclitaxel provide a new approach for cancer therapy. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28321, 2011.

PHAN, A. et al. Acral lentiginous melanoma: a clinicoprognostic study of 126 cases. **The British Journal of Dermatology**, v. 155, n. 3, p. 561–569, set. 2006.

POSTE, G. et al. In vitro selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue-invasive properties. **Cancer Research**, v. 40, n. 5, p. 1636–1644, 5 jan. 1980.

POTRONY, M. et al. Update in genetic susceptibility in melanoma. **Annals of Translational Medicine**, v. 3, n. 15, p. 210, set. 2015.

REN, G. et al. CCR2-dependent recruitment of macrophages by tumor-educated mesenchymal stromal cells promotes tumor development and is mimicked by TNFα. **Cell Stem Cell**, v. 11, n. 6, p. 812–824, dez. 2012.

RIGEL, D. S.; RUSSAK, J.; FRIEDMAN, R. The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 60, n. 5, p. 301–316, 1 set. 2010.

RIVAS, M. et al. Ultraviolet light exposure, skin cancer risk and vitamin D production. **Oncology Letters**, v. 10, n. 4, p. 2259–2264, out. 2015.

ROBERT, C. et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2517–2526, 30 jun. 2011.

ROBERT, C. et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. **Lancet (London, England)**, v. 384, n. 9948, p. 1109–1117, 20 set. 2014.

ROBERT, C. et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. **The New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 4, p. 320–330, 22 jan. 2015.

RUDDON, R. W. **Cancer Biology**. Oxford; New York Oxford University Press, USA, 2007.

SALERNI, G. et al. Benefits of total body photography and digital dermatoscopy (“two-step method of digital follow-up”) in the early diagnosis of melanoma in patients at high risk for melanoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 67, n. 1, p. e17–27, jul. 2012.

SAMANIEGO, E.; REDONDO, P. Lentigo maligna. **Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)**, v. 104, n. 9, p. 757–775, nov. 2013.

SASPORTAS, L. S. et al. Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 12, p. 4822–4827, 24 mar. 2009.

SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **Nature Reviews Disease Primers**, p. 15003, 23 abr. 2015.

SCHADENDORF, D.; HAUSCHILD, A. Melanoma in 2013: Melanoma--the run of success continues. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 11, n. 2, p. 75–76, fev. 2014.

SCHINDELIN, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676–682, jul. 2012.

SCHLOTTMANN, F. et al. Melanoma behavior according to age. **Medicina**, v. 75, n. 6, p. 387–390, 2015.

SCOPE, A. et al. The “ugly duckling” sign: agreement between observers. **Archives of Dermatology**, v. 144, n. 1, 1 jan. 2008.

SELTENHAMMER, M. H. et al. Establishment and characterization of a primary and a metastatic melanoma cell line from Grey horses. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal**, v. 50, n. 1, p. 56–65, jan. 2014.

SEO, K.-W. et al. Anti-tumor effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stromal cell-based interferon-β gene therapy and cisplatin in a mouse melanoma model. **Cytotherapy**, v. 13, n. 8, p. 944–955, set. 2011.

SHADISH, W. R. et al. Using UnGraph to extract data from image files: verification of reliability and validity. **Behavior Research Methods**, v. 41, n. 1, p. 177–183, fev. 2009.

SHARMA, R. R. et al. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. **Transfusion**, v. 54, n. 5, p. 1418–1437, maio 2014.

SIMPSON, R. M. et al. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 27, n. 1, p. 37–47, jan. 2014.

SIOLAS, D.; HANNON, G. J. Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models. **Cancer Research**, v. 73, n. 17, p. 5315–5319, 1 set. 2013.

SOSMAN, J. A. et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 8, p. 707–714, 23 fev. 2012.

SPAETH, E. et al. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. **Gene Therapy**, v. 15, n. 10, p. 730–738, maio 2008.

STAGG, J. . et al. Marrow stromal cells for interleukin-2 delivery in cancer immunotherapy. **Human Gene Therapy**, v. 15, n. 6, p. 597–608, 2004.

STATACORP. **Stata Statistical Software: Release 13**. College Station, TX: StataCorp LP, 2013.

STERNE, J. A. C. et al. Recommendations for examining and interpreting funnel plot asymmetry in meta-analyses of randomised controlled trials. **BMJ**, v. 343, p. d4002, 22 jul. 2011.

STERNE, J.; HARBORD, R. Funnel plots in meta-analysis. **The Stata Journal**, v. 4, n. 2, p. 127–141, 2004.

STOLTZ, J.-F. et al. Stem cells and regenerative medicine: myth or reality of the 21th century. **Stem Cells International**, v. 2015, p. 734731, 2015.

STUDENY, M. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-β delivery into tumors. **Cancer Research**, v. 62, n. 13, p. 3603–3608, 2002.

SU, D. M. et al. Two types of human malignant melanoma cell lines revealed by expression patterns of mitochondrial and survival-apoptosis genes: implications for malignant melanoma therapy. **Molecular cancer therapeutics**, v. 8, n. 5, p. 1292–1304, maio 2009.

SUTTON, M. T.; BONFIELD, T. L. Stem cells: innovations in clinical applications. **Stem Cells International**, v. 2014, 2014.

SUZUKI, K. et al. Mesenchymal stromal cells promote tumor growth through the enhancement of neovascularization. **Molecular Medicine**, v. 17, n. 7-8, p. 579–587, jul. 2011.

SZEBENI, G. J. et al. Identification of galectin-1 as a critical factor in function of mouse mesenchymal stromal cell-mediated tumor promotion. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 23 jul. 2012.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–676, 25 ago. 2006.

THOMASSET, N.; QUASH, G.; DORÉ, J. F. Diamine oxidase activity in human melanoma cell lines with different tumorigenicity in nude mice. **British Journal of Cancer**, v. 46, n. 1, p. 58–66, jul. 1982.

TIODOROVIC-ZIVKOVIC, D. et al. Age, gender, and topography influence the clinical and dermoscopic appearance of lentigo maligna. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 72, n. 5, p. 801–808, maio 2015.

TORSVIK, A.; BJERKVIG, R. Mesenchymal stem cell signaling in cancer progression. **Cancer Treatment Reviews**, v. 39, n. 2, p. 180–188, abr. 2013.

TROMME, I. et al. Availability of digital dermoscopy in daily practice dramatically reduces the number of excised melanocytic lesions: results from an observational study. **The British Journal of Dermatology**, v. 167, n. 4, p. 778–786, out. 2012.

TYCIAKOVA, S. et al. Genetically engineered mesenchymal stromal cells producing TNFα have tumour suppressing effect on human melanoma xenograft: AT-MSC/hTNFα in treatment of A375 xenografts. **The Journal of Gene Medicine**, v. 17, n. 1-2, p. 54–67, jan. 2015.

USHER-SMITH, J. A. et al. Risk prediction models for melanoma: a systematic review. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 23, n. 8, p. 1450–1463, ago. 2014.

VESTERGAARD, M. E. et al. Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: a meta-analysis of studies performed in a clinical setting. **The British Journal of Dermatology**, v. 159, n. 3, p. 669–676, set. 2008.

VESTERINEN, H. M. et al. Meta-analysis of data from animal studies: A practical guide. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 221, p. 92–102, jan. 2014.

VINCENT-NAULLEAU, S. et al. Clinical and histopathological characterization of cutaneous melanomas in the melanoblastoma-bearing Libechov minipig model. **Pigment Cell Research / Sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society**, v. 17, n. 1, p. 24–35, fev. 2004.

VISHNUBALAJI, R. et al. Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow- and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis. **Cell and Tissue Research**, v. 347, n. 2, p. 419–427, fev. 2012.

WEBER, J. S. et al. Lba3_pra phase 3 randomized, open-label study of nivolumab (anti-PD-1; Bms-936558; Ono-4538) versus investigator's choice chemotherapy (ICC) in patients with advanced melanoma after prior anti-ctla-4 therapy. **Annals of Oncology**, v. 25, n. suppl 4, p. mdu438.34, 9 jan. 2014.

XU, C. et al. Interferon-α-secreting mesenchymal stem cells exert potent antitumor effect in vivo. **Oncogene**, v. 33, n. 42, p. 5047–5052, 16 out. 2014.

ZHANG, T.-Y. et al. Synergistic effects of co-administration of suicide gene expressing mesenchymal stem cells and prodrug-encapsulated liposome on aggressive lung melanoma metastases in mice. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 209, p. 260–271, 10 jul. 2015.

ZISCHEK, C. et al. Targeting tumor stroma using engineered mesenchymal stem cells reduces the growth of pancreatic carcinoma. **Annals of Surgery**, v. 250, n. 5, p. 747–753, nov. 2009.

ZOU, Z. et al. More insight into mesenchymal stem cells and their effects inside the body. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 10, n. 2, p. 215–230, fev. 2010.