

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES  
MODULADOS POR TNF E MELFALANO EM  
CULTURAS MISTAS DE CÉLULAS ENDOTELIAIS,  
CÉLULAS DE MELANOMA E MACRÓFAGOS**

**CARLOS FREDERICO LOPES BENEVIDES**

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente  
para obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientador: Dr. Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima**

**São Paulo**

**2012**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Benevides, Carlos Frederico Lopes

**Avaliação do perfil de expressão de genes modulados por tnf e melfalano em culturas mistas de células endoteliais, células de melanoma e macrófagos /**  
Carlos Frederico Lopes Benevides – São Paulo, 2012.

159p.

Tese (Doutorado) - Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima

Descritores: 1. MELANOMA. 2. EXPRESSÃO GÊNICA. 3. CITOTOXICIDADE. 4. TNF. 5. MELFALANO.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a minha mãe Socorro, meus irmãos Thaís e Edvan Jr e meu pai Edvan pelo carinho do convívio familiar e a minha esposa Ana Carolina pelo carinho e compreensão incondicionais, apesar de tantos momentos de ausência ao longo desses quatro anos e por ter me proporcionado o momento mais importante da minha vida, o nascimento da minha filhinha Luísa, uma linda que tem preenchido minha vida com uma alegria que não havia ousado conhecer.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço

À Fundação Antônio Prudente, instituição onde me tornei oncologista e que me ofereceu a oportunidade de realizar este trabalho.

Ao meu orientador Dr. Vladimir que confiou e acreditou em mim para realização deste projeto, pela transmissão de conhecimento ímpar e pela grande amizade.

À banca de qualificação representada pelas Dras. Ana Paula Lepique, Silvy Stuchi Maria-Engler e Miriam Galvonas Jasiulionis pela criteriosa avaliação do projeto e sugestões enriquecedoras.

À pós-graduação representada pela Sras. Ana Kuninari, Luciana Pitombeira e Vanusa Rodrigues pelas orientações do programa *Stricto Sensu*, colaboração e compreensão.

Aos amigos de residência da oncologia clínica, Tadeu, Antonio Alencar, Thiago e Lázaro, pelo agradável convívio e pelo apoio nos dias em que estava mais atarefado.

Aos titulares e residentes do departamento de oncologia clínica, os que já deixaram o departamento e os atuais, pela convivência amistosa e pela paciência e compreensão das dificuldades que surgiram durante a realização deste projeto.

À Graziela, Rogério, Anderson e Felipe pela amizade e por manterem a homeostase do aparato laboratorial.

Ao Carlinhos, Severino e Sueli da Patologia, pela colaboração no preparo dos blocos e lâminas para análise histológica.

Aos Drs. Nair Muto, Tatiana Ricca e Tiago Goss pela paciência em ensinar as técnicas de cultivo celular, expressão gênica e protéica.

Aos amigos do CIPE, todos sem restrição, por me mostrar que o método científico não é carrasco de poucos, e sim de todos.

Aos seguranças e equipe de limpeza do CIPE pela amistosa convivência e simpatia em prestar tão importantes serviços.

A todos que colaboraram com este trabalho direta ou indiretamente, cujos nomes minha memória tenha faltado por puro capricho, mas não por menor relevância.

Ao silêncio que foi grande companheiro nas longas noites e madrugadas de laboratório.

## RESUMO

Benevides CFL. **Avaliação do perfil de expressão de genes modulados por TNF e melfalano em culturas mistas de células endoteliais, células de melanoma e macrófagos.** São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

**Introdução:** Dois a 10% dos melanomas de extremidades se manifestam como recorrência loco-regional, onde a amputação pode ser necessária. Uma alternativa à amputação é a perfusão isolada de membro, sendo o melfalano (MEL) e o fator de necrose tumoral (TNF) são as drogas mais empregadas, com respostas objetivas entre 48 a 95%. LIMA (2007) buscou alvos moleculares da ação do MEL e do TNF no melanoma, identificando um conjunto de genes cuja expressão foi modulada, num modelo tumoral *in vivo* murino. Dentre os genes estão *Arhgef6*, *Pard3*, *Fabp4*, *Flt1*, *Ifi202b* e *Igf2bp3*. **Metodologia:** Avaliamos, pela técnica de *real time* - PCR, a modificação do perfil de expressão dos genes referidos após tratamento com MEL e TNF, assim como a citotoxicidade dessas drogas, utilizando modelo de cultivos celulares em monocamada e tridimensionais (esferóides), com células de melanoma B16F10, macrófago murino e células endoteliais derivadas de camundongos C57BL/6. **Resultados:** os tratamentos contendo melfalano promoveram a diminuição da expressão de *Pard3*, tanto no cultivo em monocamada de melanoma e de células endoteliais, quanto nos esferóides. A expressão de *Fabp4* foi modulada positivamente pelos tratamentos com TNF em cultivos contendo células de melanoma e endotélio, mas negativamente nos cultivos contendo macrófagos. O meio condicionado por células neoplásicas, endoteliais e macrófagos, assim como o cultivo tridimensional também modificou o perfil de expressão gênica. MEL e TNF apresentam atividade citotóxica nas linhagens avaliadas, mas nos esferóides a atividade dessas drogas foi menor ou inexistente. Houve correlação entre o perfil de expressão gênica e a expressão proteica de *PAR3* e *FABP4* nas células melanoma. **Conclusão:** *Pard3* e *Fabp4* são modulados por TNF e melfalano em células de melanoma, endotélio e macrófagos e a interação entre essas células modifica o padrão de expressão desses genes. A partir desses resultados, as vias relacionadas a *FABP4* e *PAR3* são potenciais alvos terapêuticos para o tratamento do melanoma. Fomentado por: CAPES e FAPESP.

## SUMMARY

Benevides CFL. [Evaluation of the expression profile of genes modulated by TNF and melphalan in mixed cultures of endothelial cells, melanoma cells and macrophages] São Paulo; 2012. [Tese de doutorado-Fundação Antônio Prudente]

**Background:** Two to 10% of melanomas of the limbs manifest as locoregional recurrence, remaining confined to the limb, and amputation may be necessary. Isolated limb perfusion is an alternative that offers antineoplastic agents in high doses. Melphalan (MEL) and tumor necrosis factor (TNF) are the most used drugs, with objective responses among 48% to 95%. Intended to identify the molecular targets of TNF and MEL, was isolated, a set of genes whose expression was modulated in melanoma after treatment with MEL, MEL + TNF and TNF, in a *in vivo* tumor model. Arhgef6, Pard3, Fabp4, Flt1, Ifi202b and Igf2bp3 were among the genes whose expression was modulated by TNF and MEL. **Methodology:** The expression profile of the aforementioned genes was assessed, by the technique of real time - PCR, after treatment with TNF and MEL, as well as the cytotoxicity of these drugs, using a model of monolayer and three dimensional (spheroids) culture cells with B16F10 melanoma cells, murine macrophages and endothelial cells derived from C57BL/6 mice. **Results:** melphalan decreased the expression of Pard3 in monolayer cultures of both melanoma and endothelial cells, as well as in the spheroids. Fabp4 expression varied according to the cell type tested, with positive modulation by treatments with TNF in cultures containing endothelial and melanoma cells, but negative modulation in cultures containing macrophages. We also observed that MEL and TNF showed cytotoxic activity on the cell lines tested, and that the activity of these drugs was lower or absent in spheroids. There was a correlation between gene expression profile and protein expression of PAR3 and FABP4 in melanoma cells. **Conclusion:** Pard3 and FABP4 are modulated by TNF and melphalan in melanoma cells, endothelium and macrophages and interaction between these cells modifies the expression profile of these genes. These results support FABP4 and PAR3 pathways as potential therapeutic targets for melanoma treatment. Supported by: CAPES e FAPESP.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Evidenciam-se as bandas representativas de cada amostra conforme o tamanho predito para a reação de PCR convencional para o gene Gapdh (447bp).....	31
<b>Figura 2</b>	Imagem demonstrando a tampa de uma placa 96 poços preparada com as células B16F10, MDMEC e IC-21 em cocultivo e distribuídas em 20µL de meio DMEM para cada um dos aros da tampa.....	44
<b>Figura 3</b>	Representação gráfica do processo de obtenção dos esferoides utilizando a metodologia da gota invertida, com o preparo das amostras na superfície dos aros da tampa de uma placa de 96 poços, sendo colocadas em suspensão na forma de gotas.....	46
<b>Figura 4</b>	Cinética de incorporação do BrdU no ensaio de proliferação.....	54
<b>Figura 5</b>	Observa-se atividade citotóxica importante e significativa com as doses de melfalano = 36,9nM, TNF-alpha = 100ng/mL e a combinação de ambas.....	56
<b>Figura 6</b>	Ensaio de citotoxicidade em células B16F10 com os meios condicionados por células MDMEC e IC-21.....	58
<b>Figura 7</b>	Ensaio de citotoxicidade com MTT em células IC-21 em meio DMEM+SBF10%, DMEM condicionado por B16F10 e por MDMEC	60
<b>Figura 8</b>	Após avaliação em 48 horas.....	61
<b>Figura 9</b>	Citotoxicidade em esferóides B16F10. Os tratamentos foram comparados com o grupo controle.....	64

<b>Figura 10</b>	Citotoxicidade em esferóides mistos com duas linhagens B16F10/MDMEC e com três linhagens B16F10/MDMEC/IC-21.....	66
<b>Figura 11</b>	Ensaio de proliferação com células B16F10, MDMEC e IC-21.....	68
<b>Figura 12</b>	Ensaio de proliferação com esferóides de células B16F10, MDMEC e IC-21.....	71
<b>Figura 13</b>	Diagrama dos ensaios de cinética de expressão.....	72
<b>Figura 14</b>	O gráfico representa os valores de expressão relativa do gene Imp3...	73
<b>Figura 15</b>	O gráfico representa o perfil de expressão relativa de 02 experimentos de cinética de expressão para o gene Pard3 após 3 horas e após 6 horas de tratamento.....	74
<b>Figura 16</b>	O gráfico representa o perfil de expressão relativa de 02 experimentos de cinética de expressão para o gene Fabp4.....	75
<b>Figura 17</b>	O gráfico representa o perfil de expressão relativa de 02 experimentos de cinética de expressão para o gene Fabp4.....	76
<b>Figura 18</b>	O gráfico representa o perfil de expressão relativa de 02 experimentos de cinética de expressão para o gene Flt1.....	77
<b>Figura 19</b>	O gráfico representa o perfil de expressão relativa de 02 experimentos de cinética de expressão para o gene Pard3.....	78
<b>Figura 20</b>	O gráfico representa o perfil de expressão relativa de 02 experimentos de cinética de expressão para o gene Imp3.....	79
<b>Figura 21</b>	O gráfico representa o perfil de expressão relativa de 02 experimentos de cinética de expressão para o gene Fabp4.....	80

<b>Figura 22</b>	Graficos dos resultados de expressão dos genes selecionados para a 3ª replicata.....	81
<b>Figura 23</b>	O gráfico representa o perfil de expressão relativa do gene Pard3 em células B16F10 cultivadas em monocamada, utilizando-se meios condicionados.....	83
<b>Figura 24</b>	O gráfico representa o perfil de expressão relativa da cinética de expressão para o gene Fabp4.....	84
<b>Figura 25</b>	O gráfico representa o perfil de expressão relativa do gene Pard3 em células MDMEC cultivadas em monocamada, utilizando-se os meios condicionados.....	86
<b>Figura 26</b>	O gráfico representa o perfil de expressão relativa do gene Fabp4 em células MDMEC cultivadas em monocamada, utilizando-se os meios condicionados.....	87
<b>Figura 27</b>	O gráfico representa o perfil de expressão relativa do gene Fabp4 em células IC-21 cultivadas em monocamada, utilizando-se os meios condicionados.....	88
<b>Figura 28</b>	Expressão do gene Pard3 após 6 horas de tratamento.....	91
<b>Figura 29</b>	Expressão do gene Pard3 com o melfalano após 6 horas de tratamento nos ensaios de cinética de expressão.....	92
<b>Figura 30</b>	Expressão do gene Fabp4 no decorrer do tempo nos ensaios com esferóides B16F10.....	93
<b>Figura 31</b>	Expressão do gene Pard3 em esferóides de células B16F10 e MDMEC.....	95

<b>Figura 32</b>	Cinética de expressão do gene Pard3 em esferóides de células B16F10 e MDMEC.....	96
<b>Figura 33</b>	Cinética de expressão do gene Fabp4 em esferóides de células B16F10 e MDMEC.....	97
<b>Figura 34</b>	Expressão do gene Pard3 em esferóides de células B16F10, MDMEC e IC-21.....	99
<b>Figura 35</b>	Cinética de expressão do gene Pard3 em esferóides de células B16F10, MDMEC e IC-21.....	100
<b>Figura 36</b>	Cinética de expressão do gene Fabp4 em esferóides de células B16F10, MDMEC e IC-21.....	101
<b>Figura 37</b>	Imunofluorescência com anticorpo anti-PARD3 em células B16F10...	104
<b>Figura 38</b>	Imunofluorescência com anticorpo anti-PARD3 em células endoteliais.....	105
<b>Figura 39</b>	Imunofluorescência com anticorpo anti-FABP4 em células B16F10....	106
<b>Figura 40</b>	Imunofluorescência com anticorpo anti-FABP4 em células endoteliais.....	107
<b>Figura 41</b>	Imunofluorescência com anticorpo anti-FABP4 em células IC-21.....	108
<b>Figura 42</b>	Histoquímica (HE) de esferóides de células B16F10 e MDMEC.....	110
<b>Figura 43</b>	Ensaio de citotoxicidade em células B16F10 com doses escalonadas de inibidor de FABP4, evidenciando-se efeito citotóxico não significativo na dose 2000nM e efeito proliferativo na dose 2nM significativo.....	112

**Figura 44** Ensaio de citotoxicidade em células B16F10 com doses escalonadas de inibidor de FABP4, evidenciando-se efeito citotóxico não significativo do inibidor em todas as doses testadas..... 113

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Resultados de expressão gênica por oligonucleotide microarray oriundos do trabalho de LIMA (2007).....	9
<b>Quadro 2</b>	Lista dos anticorpos utilizados para caracterização.....	32
<b>Quadro 3</b>	Genes e primers selecionados para as reações de real-time PCR.....	38
<b>Quadro 4</b>	Representação dos valores dos limiares de ciclo de amplificação (CT) ideais para cada gene testado.....	40
<b>Quadro 5</b>	Eficiência dos primers.....	40
<b>Quadro 6</b>	Padrões de citotoxicidade observados nos cultivos em monocamada com meio DMEM+SBF10% e meio condicionado.....	62

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ANOVA</b>	Analysis of variance
<b>aPKC</b>	Atypical protein kinase
<b>Arhgef6</b>	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor 6
<b>CD31</b>	Cluster of differentiation 31
<b>CD105</b>	Cluster of differentiation 105
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>DEPC</b>	Dietileno-pirocarbonato
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified Eagle medium
<b>DMSO</b>	Dimetil-sulfóxido
<b>DNA-PK</b>	Proteína-quinase DNA-dependente
<b>dNTP</b>	Desoxi-ribonucleotídeos
<b>Fabp4</b>	Fatty acid binding-protein 4
<b>Flt1</b>	FMS-like tyrosine kinase 1
<b>FvW</b>	Fator de von Willebrand
<b>GDP</b>	Guanina-desoxi-ribonucleotídeo-difosfato
<b>GEF</b>	Guanine exchange factor
<b>GTP</b>	Guanina-desoxi-ribonucleotídeo-trifosfato
<b>HUVEC</b>	Human umbilical cord vein endothelial cell
<b>Ifi202b</b>	Interferon activated gene 202B
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>Igf2bp3</b>	Insulin growth factor 2 binding-protein 3
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>ILP</b>	Isolated Limb Perfusion
<b>MEL</b>	Melphalan
<b>MMP9</b>	Metaloproteinase 9
<b>MTT</b>	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

<b>NFκB</b>	Nuclear factor κB
<b>p38/MAPK</b>	Mitogen activated protein kinase
<b>PAK</b>	p21-activated kinase
<b>Pard3</b>	Partitioning defective 3 homolog
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered saline
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol-3 kinase
<b>PPARγ</b>	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensageiro
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute medium
<b>RT – PCR</b>	Reverse transcription - polymerase chain reaction
<b>Real-time PCR</b>	real-time polymerase chain reaction
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate
<b>SEER</b>	Surveillance Epidemiology and End Results
<b>FGF-β</b>	Fibroblast growth factor β
<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>TNF-alpha</b>	Tumor Necrosis Factor alpha
<b>TNFR</b>	TNF receptor
<b>TRADD</b>	TNF-associated DD protein
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>VEGFR</b>	Vascular endothelial growth factor receptor

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1	Melanoma cutâneo .....	1
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS DO PLANO INICIAL .....</b>	<b>19</b>
3.1	Objetivo geral .....	19
3.2	Objetivos específico .....	19
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>21</b>
4.1	Padronização do cultivo das células de melanoma murino e de macrófagos.....	21
4.2	Isolamento e caracterização de células endoteliais de derme de camundongo.....	22
4.2.1	Isolamento e cultivo de células endoteliais de derme de camundongo .....	22
4.3	Imunofluorescência dos cultivos celulares .....	33
4.4	Padronização dos primers dos genes FABP4, IFI202B, FLT1, ARHGEF6 IGF2BP3 E PARD3 para real-time PCR.....	36
4.5	Padronização da cultura tridimensional com células B16F10, células endoteliais e macrófagos .....	41
4.5.1	Estabelecimento de esferóides de células B16F10 em gel de agarose .....	41
4.5.2	Estabelecimento de esferóides pelo método gota invertida .....	42
4.6	Estabelecimento de esferóides mistos de células B16F10, MDMEC e IC-21 pelo método gota invertida adaptado para placa de 96 poços com gel de agarose LMP 1%.....	42
4.7	Caracterização histoquímica dos esferóides de melanoma B16F10 e esferóides mistos com as linhagens de melanoma B16F10, células endoteliais (MDMEC) e macrófagos IC-21 .....	46

4.8	Padronização de dose de doxorrubicina, para controle dos ensaios de citotoxicidade com melfalano e TNFA pelo MTT .....	48
4.9	Ensaio de citotoxicidade e padronização de dose de melfalano e TNFA..	50
4.10	Avaliação de proliferação após tratamento com MEL e TNFA .....	52
4.11	Meio condicionado pelas linhagens B16F10, MDMEC e IC-21 .....	54
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
5.1	Ensaio de citotoxicidade e padronização de dose de melfalano e TNF-alpha.....	56
5.2	Ensaio de citotoxicidade com melfalano e TNF-alpha utilizando-se meio DMEM condicionado .....	57
5.3	Citotoxicidade com melfalano e TNF-alpha em esferoides .....	62
5.4	Avaliação de proliferação após os tratamentos com melfalano e TNF-alpha.....	66
5.5	Cinética de expressão gênica em resposta aos tratamentos com melfalano e TNF-alpha .....	71
5.6	Cinética de expressão gênica em células B16F10, MDMEC e IC-21 cultivadas em monocamada, utilizando-se meio condicionado.....	82
5.7	Cinética de expressão gênica em culturas tridimensionais (esferóides)....	89
5.8	Expressão por imunofluorescência das proteínas Pard3 e Fabp4.....	103
5.9	Expressão proteica por imunofluorescência dos genes Pard3 e Fabp4 em esferóides de células B16F10 e esferóides mistos.....	109
5.10	Ensaio de citotoxicidade em células B16F10, utilizando-se um inibidor de FABP4 .....	111
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>114</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>147</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>148</b>

## **ANEXOS**

- Anexo 1** Isolamento de células endoteliais derivadas de derme de camundongos C57BL/6
- Anexo 2** Avaliação da expressão do gene Nos3 por *real-time PCR*
- Anexo 3** Avaliação da expressão imunohistoquímica de CD105 e fator de Von Willebrand em células endoteliais
- Anexo 4** Ensaio de tubulogênese
- Anexo 5** Imunofluorescência de células endoteliais com anticorpo anti-CD31
- Anexo 6** Esferoides de células B16F10
- Anexo 7** Esferoides de células endoteliais
- Anexo 8** Esferoides mistos de células B16F10, MDMEC e IC-21
- Anexo 9** Avaliação morfo-histológica dos esferoides
- Anexo 10** Padronização da dose de doxorubicina para os ensaios de citotoxicidade
- Anexo 11** Padronização das doses de melfalano e TNF-alpha

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MELANOMA CUTÂNEO

O melanoma é a neoplasia que se origina dos melanócitos (células produtoras do pigmento melanina) e seus sítios primários incluem: pele, úvea, mucosas e leptomeninges, sendo a pele o sítio mais comum de acometimento (90%) (FECHER et al. 2007). A incidência de melanoma maligno cutâneo tem aumentado mais rapidamente que a de qualquer outro tipo de neoplasia, com um incremento na incidência de aproximadamente 4 a 7% ao ano por décadas (PECTASIDES et al. 2009).

Nos EUA, a *Surveillance, Epidemiology and end Results* (SEER) (2012) estima-se que 76.250 indivíduos (44250 homens e 32000 mulheres) serão diagnosticados com melanoma em 2012, apresentando uma taxa de mortalidade de 2,7 por 100.000 homens e mulheres por ano entre 2005 e 2009. No Brasil, a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) foi de 3.170 novos casos em homens e 3.060 novos casos em mulheres em 2012, sendo 2370 casos apenas no estado de São Paulo (Ministério da Saúde 2011). O menor número de casos registrados no Brasil, quando comparados aos registros norte americanos, pode se dever a maior prevalência de brancos caucasianos nos EUA, para os quais o risco de desenvolver melanoma é de 1 em 50 ao longo da vida, ao passo que nos hispânicos o risco é de 1 em 250. Todavia, consideram-se também problemas com o registro do

melanoma no Brasil, visto que não se trata de doença de notificação compulsória, havendo, portanto falhas no registro do diagnóstico dessa patologia.

O risco de morte por melanoma é maior para os pacientes com a doença detectada em fase tardia: a sobrevida em 5 anos para melanoma tratado em estágio inicial varia de 89 a 95%, mas cai para 5 a 10% para aqueles no estágio IV (doença metastática), sendo a sobrevida mediana de 6 a 9 meses; além disso, as opções de tratamento são limitadas neste estágio (WEBER 2008; CAMACHO et al. 2009; HERSEY et al. 2010; ZITO e KLUGER 2012).

Durante cerca de 30 anos, apesar das terapias desenvolvidas, a sobrevida dos pacientes não mudou (BEDIKIAN et al. 2006). Existe disponível um número de agentes quimioterápicos com atividade relatada no melanoma metastático, no que tange a taxa de resposta (redução tumoral) e sobrevida livre de progressão da doença, sendo os principais a dacarbazina (DTIC), nitrosuréias, análogos de platina, alcaloides da vinca e taxanos; mas, apesar dos vários estudos clínicos realizados, nenhum deles ofereceu ganho em sobrevida global aos pacientes tratados, quando comparados a melhores protocolos de cuidados clínicos paliativos. Até recentemente, o tratamento padrão, no cenário metastático, era quimioterapia com a droga dacarbazina. Essa droga é usualmente administrada por via endovenosa na dose de 250mg/m<sup>2</sup> por 5 dias, repetindo-se o esquema a cada 21 a 28 dias, e oferece taxas de resposta entre 5 a 20% e sobrevida livre de progressão de doença de 1,5 a 1,6 mês. Apesar dos resultados modestos, foi aprovada para tratamento de primeira linha do melanoma em 1976 pelo órgão americano *Food and Drug Administration* (FDA), principalmente pela escassez de drogas eficazes. Na indicação de tratamento, uma potencial limitação a DTIC é a necessidade de conversão hepática da droga ao

metabolito ativo MTIC (5-(3-metil-1-triazeno)-imidazol-4-carboxamida), impedindo sua aplicação em pacientes portadores de metástases que comprometam a função hepática. Outra restrição é que o DTIC não atravessa a barreira hemato-encefálica, sendo ineficaz no tratamento de lesões metastáticas cerebrais (MIDDLETON et al. 2000; BEDIKIAN et al. 2006; LORIGAN et al. 2008; TRINH 2008; SONDAK et al. 2011).

No decorrer das últimas três décadas, vários estudos tentaram comprovar a superioridade de diversos quimioterápicos ante DTIC, mas nenhuma das drogas citadas previamente mostrou-se superior. Outra estratégia foi avaliar combinações de drogas em busca de melhores resultados. Nesse cenário, as taxas de resposta iniciais foram encorajadoras em estudos uni-institucionais (40 a 50%), mas, quando avaliadas em estudos multicêntricos randomizados, essas respostas decaíram aos mesmos valores vistos com a dacarbazina isolada, ou foram até mesmo menores (NASHAN et al. 2007), permanecendo, assim, o DTIC como a opção padrão de quimioterapia no tratamento e na comparação de eficiência de novas drogas (NASHAN et al. 2007; SONDAK et al. 2011).

Apenas recentemente, duas drogas determinaram ganho de sobrevida no tratamento do melanoma metastático. Uma delas, o ipilimumabe, um anticorpo monoclonal anti-CTLA4 (*human cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*), atua por exarcebar a atividade anti-tumoral, via estimulação da resposta imune dependente de linfócitos T do indivíduo. Em estudo multicêntrico envolvendo pacientes que progrediram doença após primeira linha de quimioterapia baseada em DTIC, o ipilimumabe ofereceu ganho de sobrevida global mediano de 10,0 meses, comparado a 6,4 meses no grupo controle, todavia, não foram evidenciados casos de

cura da doença, havendo respostas completas (inexistência de doença residual mensurável em atividade) em apenas 3 pacientes num grupo de 306 pacientes tratados, sendo não significativas (HODI et al. 2010). O outro agente a oferecer ganho em sobrevida global foi uma molécula que atua como inibidor de BRAF, o vemurafenibe. Essa droga é caracterizada como um inibidor da atividade tirosina quinase de lesões tumorais de melanoma com mutação específica no códon V600E do BRAF, cuja prevalência varia entre 50% a 60% dos casos. Quando empregada na primeira linha de tratamento da doença metastática em comparação com DTIC houve ganho em sobrevida global mediana, com redução considerável do risco de morte de 63%. Porém, a resposta apresentada, embora importante, foi transitória e os pacientes apresentaram recaída da doença numa mediana de 5 a 6 meses, não oferecendo cura a esses indivíduos (CHAPMAN et al. 2011).

Num esforço para melhorar esses resultados, diversas estratégias continuam sendo estudadas e empregadas. A imunoterapia, que visa à eliminação do tumor a partir da estimulação da resposta imunológica do hospedeiro, comumente utiliza citocinas, como a interleucina-2 (IL2) e o interferon-alfa (INFA) como principais agentes. Até o presente, o tratamento com IL2 apresentou respostas objetivas em torno de 17%. Embora a taxa de resposta seja modesta e não superior à vista com DTIC, a IL2 foi aprovada pelo FDA para o tratamento de melanoma metastático, já que 60% dos pacientes que adquiriram resposta completa (cerca de 7% do total de tratados) mantiveram respostas duradouras por mais de 5 anos (TRINH 2008). Para o interferon-alfa, estudos fase I/II para doença metastática mostraram taxa de resposta em torno de 20% (KIRKWOOD et al. 2008; SCHWARTZENTRUBER et al. 2011; ZITO e KLUGER 2012).

Outra estratégia terapêutica combina quimioterapia convencional com imunoterapia (INFA e IL2), sendo chamada de bioquimioterapia, e apresenta resultados superiores à quimioterapia ou imunoterapia isoladas. Os resultados de uma meta-análise envolvendo 15 estudos fase II/III de bioquimioterapia mostraram que tal abordagem promove taxa de resposta global de 33% e sobrevida livre de progressão mediana de 2,5 meses. Outra meta-análise avaliou 18 estudos randomizados envolvendo bioquimioterapia, totalizando 2.621 pacientes, e identificou maior taxa de resposta parcial (odds ratio 0,66 –  $p=0,0001$ ) e completa (odds ratio 0,50 –  $p=0,0003$ ) em favor da bioquimioterapia (IVES et al. 2007). Todavia, até o momento, nenhum dos referidos tratamentos levou a ganho de sobrevida quando comparados com DTIC (MCDERMOTT et al. 2008).

Em uma apresentação clínica peculiar, 2 a 10% dos melanomas cutâneos oriundos de extremidades (não acrais) se manifestam, na doença avançada, como recorrência loco-regional, permanecendo confinada ao membro acometido. Esse padrão de recorrência é classificado como satelitose, quando as lesões se situam até 2,0 cm da lesão primária; ou de metástase em trânsito, quando as lesões distam mais de 2,0 cm da lesão primária, mas não atingindo o primeiro nível de drenagem linfática (CORNETT et al. 2006; ROSSI et al. 2008; DERROOSE et al. 2011). As opções de tratamento padrão para este tipo de recorrência incluem a excisão cirúrgica, se prontamente factível, ou até mesmo amputação do membro. Outras estratégias paliativas são a ablação por eletrodissecção, crioterapia ou com laser de CO<sub>2</sub> (KROON et al. 2009). Uma alternativa menos mórbida nestes casos é a perfusão isolada de membro (*isolated limb perfusion* - ILP). Essa estratégia poupa o membro da amputação ao oferecer agentes anti-neoplásicos em altas doses através da perfusão

do membro afetado, após canulação dos vasos que o irrigam, com instituição de circulação extracorpórea e oxigenação do sangue. Essa abordagem permite atingir concentrações locais das drogas 30 vezes maiores às vistas no tratamento sistêmico (LEJEUNE e RUEGG 2006), sendo o melfalano (MEL) e o fator de necrose tumoral (TNF) as drogas mais empregadas. A consequente preservação do membro é uma estratégia interessante, uma vez que a amputação não oferece nenhum benefício em sobrevida global e a terapia sistêmica, como já dito, tem resultados limitados (CORNETT et al. 2006; ROSSI et al. 2008; DERROOSE et al. 2011).

A utilização da ILP com MEL profilaticamente em melanomas de extremidade com alto risco de recorrência pós-ressecção cirúrgica não demonstrou qualquer efeito na prevenção do desenvolvimento de doença à distância ou em ganho de sobrevida global e mostrou apenas uma redução mínima nas taxas de desenvolvimento de metástase em trânsito. Em contraste, quando a ILP com MEL e TNF é utilizada de forma terapêutica para o melanoma avançado, as taxas de respostas globais atingem 48% a 95% (HAYES et al. 2007; DERROOSE et al. 2011).

O melfalano (MEL), um agente quimioterápico alquilante bifuncional, pertencente ao grupo das mostardas nitrogenadas, age basicamente formando ligações cruzadas com as bases nitrogenadas do DNA, interferindo nos processos de síntese e replicação (geralmente o MEL reage com a guanina na posição N7 e com a adenina na posição N3). É usado no tratamento de neoplasias hematológicas (mieloma múltiplo) e habitualmente o melanoma cutâneo é resistente à infusão sistêmica deste, estando a sua aplicabilidade restrita à ILP, onde está associada com taxas de resposta global em torno de 30% a 60% (CORNETT et al. 2006; LEJEUNE e RUEGG 2006; SANKI et al. 2007; ROSSI et al. 2008). A associação do MEL com o

TNF melhora os resultados, promovendo taxas de resposta completa de 70% a 80% e resposta global de 80% a 100% (LEJEUNE e RUEGG 2006; DERROOSE et al. 2011).

O TNF é uma citocina de ação pleiotrópica isolada pela primeira vez do soro de camundongos tratados com endotoxinas bacterianas. Em 1984, o gene do TNF foi identificado e clonado e foram realizados estudos visando sua utilização clínica. Existem dois receptores identificados (TNFR1 e TNFR2) e é sabido que o TNF é produzido preferencialmente por macrófagos ativados, células NK e linfócitos T (MOCELLIN et al. 2005; DERROOSE et al. 2011). O TNF possui ação anti-tumoral em algumas linhagens tumorais por efeito citotóxico direto. O desarranjo genômico próprio das células tumorais as torna sensíveis à morte celular iniciada pela ligação ao TNF e posterior ativação da cascata de apoptose caspase-dependente. Acredita-se também que o TNF exerça seu efeito por dano/alteração da vasculatura tumoral. Os vasos sanguíneos seriam os primeiros alvos dessa citocina e o maior efeito do TNF seria a ativação das células endoteliais com aumento de expressão de receptores de membrana (inclusive moléculas de adesão leucocitária) e perda da adesão intercelular endotelial. Tal processo favoreceria a migração leucocitária e a inflamação. O mecanismo preciso ainda não está claro, possivelmente havendo ativação de trombose vascular pela ligação de TNF ao PTF (fator tissular pró-coagulante), o que culminaria com necrose hemorrágica tumoral. Na ILP, os efeitos antitumorais observados com TNF podem ser diretos e indiretos e esse efeito seria mediado pela ação destrutiva específica contra a vasculatura tumoral, havendo sinergismo com os efeitos citotóxicos diretos do MEL (MOCELLIN et al. 2005; MENON et al. 2006; DERROOSE et al. 2011).

O grande aumento da taxa de resposta observada no ILP com melfalano e TNF com até 100% de resposta completa, ou seja, ausência de lesões mensuráveis em atividade após o tratamento chama a atenção dos profissionais envolvidos no tratamento e estudo dessa doença. Buscando a identificação dos alvos moleculares da ação do MEL e do TNF no melanoma, um estudo foi conduzido nesta instituição (LIMA 2007) no qual foi determinado o perfil de expressão gênica do melanoma cutâneo em resposta ao tratamento com as referidas drogas isoladamente ou em combinação. Foi identificado, empregando-se a técnica de *oligonucleotide microarray*, um conjunto de genes cuja expressão foi modulada no melanoma, após 3 horas de tratamento com MEL, TNF e MEL+TNF, num modelo tumoral *in vivo* murino. A administração de MEL promoveu uma menor velocidade de crescimento tumoral e isso não foi modificado pela coadministração de TNF. Entretanto, tumores tratados com TNF apenas ou em combinação com MEL apresentaram mais necrose e menos mitoses. Um número menor de mitoses também foi observado em resposta a MEL. O tratamento com MEL ou MEL+TNF esteve associado com aumento da sobrevida livre de progressão. Dentre os genes cuja expressão foi modulada pelos tratamentos estão *Arhgef6*, *Pard3*, *Fabp4*, *Flt1*, *Ifi202b* e *Igf2bp3*. A seguir, o Quadro descreve as modificações avaliadas para cada gene.

**Quadro 1** - Resultados de expressão gênica por oligonucleotídeo microarray oriundos do trabalho de LIMA (2007)

Gene	Efeito
<b>Arhgef6</b>	Regulação negativa pelo TNF-alpha e em combinação com melfalano
<b>Pard3</b>	Regulação negativa pelo melfalano
<b>Flt-1</b>	Regulação negativa pelo TNF-alpha
<b>Ifi202b</b>	Regulação positiva pela associação de TNF-alpha e melfalano
<b>Igf2bp3</b>	Regulação positiva pela associação de TNF-alpha e melfalano
<b>Fabp4</b>	Regulação negativa pelo TNF e pela associação com melfalano e regulação positiva pelo tratamento com melfalano.

Arhgef6 (*Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor 6*) foi negativamente regulado nos tumores provenientes do grupo de camundongos tratados com TNF (0,05mg/Kg), apresentando razão de expressão  $\geq 2,0$  e também em resposta ao tratamento combinado de TNF e MEL (12mg/Kg). Este gene codifica para um efetor ou regulador de GTPases da família Rho, a proteína alpha-PIX/Cool-2, e atua como um GEF (*guanine exchange factor*), acelerando a troca GDP  $\rightarrow$  GTP nas proteínas Rac1 e Cdc42 e mediando a ativação de PAK. A forma GDP-Rac e GDP-Cdc42 são inativas. Quando estão nas formas GTP-Rac e GTP-Cdc42 tornam-se ativas e atuam na regulação do esqueleto celular de actina, propagando a formação de lamelipódios, filopódios e ondulações na membrana celular, processos que estariam envolvidos no aumento da contratilidade celular, formação de complexos de adesão e motilidade celular (ROSENBERGER et al. 2005).

Quando na forma dimérica, alpha-Pix/Cool-2 atua especificamente como ativador de Rac. A partir da ligação de PAK através do domínio SH3, ocorre dissociação do dímero, que pode, então, atuar tanto em Rac, quanto em Cdc42. Além

disso, alpha-PIX ativa diretamente PAK, levando à adesão celular à fibronectina (ROSENBERGER et al. 2005; NODÉ-LANGLOIS et al. 2006).

Arhgef6 também está associado com a morfogênese de estruturas neuronais. O *knock-down* deste gene em ratos, usando siRNA, resultou em anormalidades morfológicas da medula espinhal, similares às reportadas com o *knock-down* de PAK. Tais alterações também poderiam estar relacionadas a algumas formas de retardo mental. No geral, essa proteína estaria ligada a diversos processos celulares e vias metabólicas, como remodelação do citoesqueleto de actina, polarização celular, transcrição de genes, progressão do ciclo celular e dinâmica de microtúbulos (NODÉ-LANGLOIS et al. 2006).

Pard3, nos tumores extraídos do grupo de animais tratados com MEL, sofreu regulação negativa com uma razão de expressão maior que 2,0. Pard3 codifica a proteína PAR3 (*partitioning defective-3 homolog*), expressa nas células epiteliais/endoteliais e que está envolvida com a regulação da polaridade celular (GÉRARD et al. 2007). Sabe-se que PAR3 forma complexos com PAR6 e aPKC, relacionando-se com a polarização celular e com a formação dos complexos juncionais (*adherens junctions and tight junctions*). Em células endoteliais, PAR3 é capaz de se ligar diretamente à VE-caderina e tardiamente recrutar PAR6 em áreas de contato célula-célula, o que permite que existam domínios de membrana onde estão misturadas proteínas associadas às *tight junctions* e *adherens junctions* (IDEN et al. 2006), contudo o mecanismo preciso pelo qual essas proteínas se localizam na região de contato intercelular permanece desconhecido.

Há evidência de que proteínas do complexo PAR6-PAR3-aPKC organizam a rede de microtúbulos celular e que essas moléculas também estariam implicadas no

posicionamento do centróssomo durante a polarização e divisão celular. Em embriões deficientes em *Pard3* a orientação do fuso mitótico mostrou-se defeituosa. Foi demonstrado que os microtúbulos atuando em conjunto com a proteína *PAR3* (HONG et al. 2010).

O tratamento com MEL+TNF modulou positivamente a expressão dos genes *Ifi202b* e *Igfbp3*.

*IFI202* ou *P202* (codificada pelo gene *Ifi202b*) é uma proteína induzida por exposição ao interferon e parte da família das *IFN-inducible-proteins* (*P202A*, *P202B*, *P203*, *P204* e *D3*). A expressão aumentada dessa proteína foi relacionada ao retardo da proliferação celular e inibição da ativação de *NFKB* e *AP-1*, fatores que participam da transcrição de vários genes celulares e virais, o que poderia contribuir para uma atividade antitumoral (MIN et al. 1996).

Num modelo de células L929 transfectadas com pcDNA para expressão de *P202* e tratadas com *IFNB*, observou-se que essa proteína inicialmente aparece no citoplasma, onde se acopla à componentes subcelulares de sedimentação rápida e então se acumula no núcleo (na metáfase, *P202* parece associar-se à cromatina nuclear). Algumas proteínas podem se ligar a *P202 in vitro* e *in vivo*, como *PRB* (*retinoblastoma susceptibility protein*) que tem papel central no controle do ciclo celular. Sabe-se que a expressão aumentada de *P202* em células transfectadas diminui a velocidade de proliferação, inibindo a expressão gênica através de sua atividade sobre os fatores de transcrição *NFKB*, *FOS* e *JUN*. Uma das atividades de *NFKB* seria o controle da expressão de genes da resposta inflamatória e imune (inclusive *IFN*).

XIN et al. (2006) demonstraram também a correlação entre a expressão de p202 em esplenócitos derivados de camundongos B6.Nba2 e a suscetibilidade ao desenvolvimento de lúpus, em parte por mecanismo de inibição de apoptose mediada por P53.

Também foi mostrado que a expressão de Ifi202b é induzida em linfócitos T sob estimulação de anticorpos anti-CD3 e anti CD-28 e em células esplênicas tratadas com o hormônio sexual feminino, estrogênio, através do receptor de estrógenos alfa (ER- $\alpha$ ). Como parte da família de proteínas P200, as proteínas AIM2 (*absent in melanoma*) e P202 atuam de maneira contrária entre si. Em macrófagos derivados da medula óssea, AIM2 promove a formação de “inflamassomos”, que ativam caspase-1 e aumentam a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Já P202 é incapaz de formar “inflamassomos”, sugerindo um papel inibitório a AIM2. Foi demonstrado que *knockdown* de P202 nos macrófagos da medula óssea aumentou a ativação de caspase-1 (PANCHANATHAN et al. 2011).

O gene *Igf2bp3* codifica a proteína IMP3 que se liga a região 5' não traduzida do mRNA de IGF2 (*Insulin-like growth factor 2*) e regula a expressão do referido gene (IGF2), este último é um dos principais ligantes do receptor de IGF1 e estimula sua fosforilação nos resíduos de tirosina, transduzindo sinais mitogênicos dentro da célula, que poderiam estar envolvidos com a tumorigênese (LI et al. 2008).

IMP3 faz parte de uma família que se caracteriza por apresentar 6 domínios de ligação ao RNA, sendo dois domínios de reconhecimento de motivos e quatro domínios de homologia à ribonucleoproteína heterogênea nuclear K. Células de leucemia K562 expressando RNA de interferência para *Igf2bp3* apresentaram menor secreção de IGF2 e marcada redução da proliferação.

IMP3 também é descrita como uma proteína oncofetal que se encontra expressa numa série de cânceres humanos. Sugere-se a partir de ensaios *in vitro* que IMP3 liga-se aos mRNAs de CD44 e IGF2 (*insulin-like growth factor 2*) aumentando a estabilidade e expressão desses mRNAs, todavia o papel dessas moléculas na progressão do câncer permanece incerto. SZARVAS et al. (2012) demonstraram que os níveis protéicos e de mRNA de IMP3 encontram-se significativamente elevados em amostras de câncer de bexiga invasivo e análises *in vitro* revelaram um efeito promotor de invasividade e proliferação dessa proteína, que aparentemente não depende do efeito regulatório dessa nos seus alvos CD44 e IGF2 (SZARVAS et al. 2012).

Flt-1 foi modulado negativamente nos tumores de animais tratados com TNF combinados ou não a MEL. Flt-1 codifica o receptor 1 para VEGF (VEGFR1). Duas isoformas desse receptor foram identificadas: a forma ligada a membrana (mFLT1), que demonstra uma fraca atividade de tirosina-quinase na transdução de sinal do VEGF, e a forma solúvel (sFLT1), que não possui nenhuma atividade de tirosina-quinase. Esses receptores são encontrados na superfície de células endoteliais, células-tronco hematopoiéticas, leucócitos e muitas células tumorais. A função precisa de FLT1 permanece incerta. O receptor 2 de VEGF (FLK1), de fato, é considerado o principal receptor no desenvolvimento de sinais angiogênicos, com importante papel na angiogênese normal e hematopoiese (TAKENAKA et al. 2007).

Foi proposto que FLT1 atuaria como um falso receptor, capaz de desviar a ligação de VEGF ao receptor 2 (FLK1), regulando negativamente a atividade de VEGF no endotélio vascular. Esta atividade de FLT1 na regulação negativa da função de VEGF é evidente nos camundongos com *knock-down* para Flt-1 que

morrem no 8º dia da fase embrionária. Embora as células endoteliais desses nocautes se formem normalmente, não ocorre desenvolvimento de vasos sanguíneos, aparentemente como consequência das células mesenquimais continuarem se diferenciando em hemangioblastos (precursores de células endoteliais e hematopoiéticas). Evidências indicam que FLT1 induz a metaloproteinase relacionada à matriz-9 (MMP9), envolvida no desenvolvimento de metástases pulmonares e também participa na angiogênese patológica em tumores (MENENDEZ et al. 2006; SINGH et al. 2006).

Fabp4 apresentou grande variação de expressão. Nos grupos tratados com TNF (TNF e TNF+MEL) foi regulado negativamente e, no grupo do MEL, positivamente, sendo que em todos os grupos foi observada uma razão de expressão  $\geq 2,0$ . Embora sem atingir significância estatística no *microarray*, os dados de qRT-PCR mostraram diferença de expressão estatisticamente significantes em relação ao controle.

Fabp4 codifica a proteína AP2 (FABP4), uma pequena molécula de 15 KDa que faz parte da família de LBPs (*lipid-binding proteins*), mais especificamente das FABPs (*fat acid binding proteins* - proteínas que se ligam a ácidos graxos de cadeia longa). Atualmente existem 9 FABPs identificadas em mamíferos, sendo expressas numa variedade de tecidos. Particularmente, FABP4 é expressa principalmente no tecido adiposo (BIRON-SHENTAL et al. 2007; LIU et al. 2008).

Fabp4 pode regular a expressão gênica ativando várias classes de receptores nucleares, sendo PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) o melhor caracterizado. PPARG está envolvido em processos como diferenciação adipocitária, modulação da sensibilidade à insulina e função de macrófagos. Também inibe a

proliferação celular, inclusive induzindo apoptose em algumas linhagens de carcinomas (AYERS et al. 2007). Dessa forma, a modulação da expressão de FABP4 teria um efeito direto sobre a atividade de PPARG, aumentando ou diminuindo a atividade do mesmo.

Por fim, existe evidência de que FABP4 atue na regulação da expressão de citocinas em timócitos. Em experimento utilizando timócitos com superexpressão de FABP4, houve elevação da expressão das citocinas IL-7 e IL-8, envolvidas diretamente na maturação de timócitos e regulação do microambiente tímico (ADACHI et al. 2012).

Os tumores sólidos, como o melanoma, são constituídos de uma soma variável de células neoplásicas e estromais (fibroblastos, endoteliais, células imunocompetentes, principalmente macrófagos e linfócitos). Os macrófagos são as células mais abundantes no microambiente tumoral, e apesar de estudos iniciais mostrarem atividade antitumoral desses, estudos mais recentes mostram que o mesmo tem várias atividades pró tumorais (produção de fatores de crescimento e de sobrevivência de células tumorais, produção de fatores angiogênicos, degradação da matriz celular, atividade de remodelamento tecidual e supressão da resposta imune adaptativa) (ALLAVENA e MANTOVANI 2012).

Devido a estas ações, hoje os macrófagos associados ao tumor são considerados os maestros da inflamação no microambiente tumoral. Na maioria dos estudos clínicos, os macrófagos foram associados à progressão tumoral (sobrevivência, proliferação e invasão). Portanto, os macrófagos associados ao tumor parecem ser candidatos atrativos para novas terapias (SICA et al. 2008).

Além disso, sabe-se também que a angiogênese é um evento crítico para a progressão tumoral e metástase. Recentemente surgiram muitas drogas antiangiogênicas, porém sua eficácia ainda está muito aquém do desejado. As células endoteliais associadas ao tumor podem hiperexpressar muitos genes, adquirir anormalidades citogenéticas e se tornarem resistentes a alguns quimioterápicos. O melhor entendimento destas anormalidades pode ser um grande passo para identificar novos alvos, assim como um mecanismo de sobrepujar a resistência adquirida por estas células (HIDA et al. 2008).

Os genes descritos anteriormente têm papel fundamental em várias etapas da tumorigênese (proliferação, adesão, migração, apoptose e angiogênese), mostrando a importância de estudos voltados para caracterização dos efeitos biológicos que a modulação da expressão dos mesmos tem sobre o comportamento do melanoma. A identificação de novas estratégias e alvos terapêuticos é de fundamental importância para racionalização e melhora do tratamento dos pacientes acometidos, tendo em vista a baixa eficácia das drogas hoje utilizadas. Esses genes foram escolhidos para posterior validação por terem apresentado as modificações da razão de expressão mais altas, com significância estatística na análise do *microarray* ou de qRT-PCR, e apresentarem funções capazes de explicar parte dos fenômenos normalmente descritos em modelos de ILP com MEL e TNF.

Até o presente, várias estratégias terapêuticas são aplicadas no combate ao câncer, algumas promovendo melhora na saúde dos pacientes acometidos, todavia, para o melanoma, pouco avanço tem sido obtido. A identificação de alvos moleculares para novas drogas e o papel de agentes antiangiogênicos tem sido tema de pesquisas recentes. Dessa maneira, acreditamos que a melhor compreensão dos

eventos celulares e moleculares subjacentes à ação das drogas citadas anteriormente pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas para o tratamento dessa neoplasia, que ainda apresentam resultados tão frustrantes.

## **2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA**

Até o momento não sabemos como a interação entre as células do melanoma, células endoteliais e macrófagos altera a expressão gênica frente ao tratamento com MEL e TNF. Com este trabalho, esperamos caracterizar o padrão de expressão de alguns alvos moleculares da ação do TNF e MEL no melanoma e fornecer subsídios para a determinação de marcadores capazes de predizer a resposta ao tratamento com essas drogas, conhecer melhor os mecanismos genéticos e patogênicos envolvidos no desenvolvimento desses tumores e identificar possíveis alvos para novos tratamentos.

### **3 OBJETIVOS DO PLANO INICIAL**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

- Avaliar *in vitro* como a interação entre as células endoteliais, macrófagos e células do melanoma modifica o perfil de expressão de genes modulados *in vivo* pelo tratamento com melfalano e TNF, bem como o padrão de resposta a estas drogas.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a atividade citotóxica do tratamento *in vitro* com melfalano, TNF ou a combinação de ambos em células endoteliais, macrófagos e células do melanoma cultivadas em monocamada isoladamente ou em cocultura, quando cocultivadas em modelos tridimensionais e quando cultivadas em meio condicionado por cada um dos tipos celulares acima mencionados;
- Avaliar a inibição da proliferação celular após o tratamento *in vitro* com melfalano, TNF ou a combinação de ambos em células endoteliais, macrófagos e células de melanoma cultivadas em monocamada isoladamente ou em cocultura, quando cocultivadas em modelos tridimensionais e quando cultivadas em meio condicionado por cada um dos tipos celulares acima mencionados;

- Observar o perfil e a cinética de expressão gênica de *Arhgef6*, *Pard3*, *Ifi202b*, *Fabp4*, *Igf2bp3* e *Flt1* em células endoteliais, macrófagos e células de melanoma cultivadas em monocamada isoladamente ou em cocultura, quando cocultivadas em modelos tridimensionais e quando cultivadas em meio condicionado por cada um dos tipos celulares acima mencionados e a modificação destes em resposta ao tratamento *in vitro* com melfalano, TNF ou a combinação destas drogas, através de qRT-PCR;
- Observar o perfil e a cinética de expressão das proteínas  $\alpha$ -PIX (ARHGEF6), PAR3, IFI202B, FABP4, IGF2BP3 (IMP3) e VEGFR1 (FLT1) em células endoteliais, macrófagos e células de melanoma cultivadas em monocamada isoladamente ou em cocultura, quando cocultivadas em modelos tridimensionais e quando cultivadas em meio condicionado por cada um dos tipos celulares acima mencionados e a modificação destes em resposta ao tratamento *in vitro* com melfalano, TNF ou a combinação destas drogas, através de imunofluorescência e *Western-blotting*.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO DAS CÉLULAS DE MELANOMA MURINO E DE MACRÓFAGOS

Utilizaram-se a linhagem de célula de melanoma B16F10 (ATCC #CRL6322), células de melanoma murino cutâneo metastático originalmente obtidas após 10 passagens em pulmão (Fidler I, 1973), e a linhagem de macrófagos murinos IC-21 (ATCC #TIB-186), derivada de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 imortalizados com vírus SV-40.

Todas as linhagens celulares foram cultivadas em RPMI (Invitrogen) (IC-21) ou DMEM *low-glucose* (Invitrogen) (B16F10), enriquecidos com soro bovino fetal (SBF) (Cultilab ou Invitrogen) a 10% e mantidas em estufa aquecida a 37°C, numa atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

Foram utilizadas, em todos os experimentos, células com aproximadamente o mesmo número de passagens (10 a 20). Para tanto, as células foram previamente expandidas e congeladas em meio (RPMI ou DMEM) acrescido de 20% de soro bovino fetal (SBF) e 10% DMSO (Sigma) na densidade de  $5,0 \times 10^5$  a  $1,0 \times 10^6$  células por criotubo, em N<sub>2</sub> líquido.

Para uso, todas as linhagens eram cultivadas até alcançarem 70% a 90% de confluência, quando então eram lavadas com PBS, tripsinizadas com tripsina 0,025%, durante 1 a 2 minutos, ressuspensas em meio adequado com SBF 10%, centrifugadas a 2000rpm por 4 minutos e novamente ressuspensas em meio

completo. A contagem do número de células e a avaliação de viabilidade foram feitas pelo método de exclusão do azul de Trypan. Só foram empregadas células com mais de 90% de viabilidade para a linhagem B16F10 e mais de 80% de viabilidade para linhagem IC-21.

## **4.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE DERME DE CAMUNDONGO**

Esta etapa foi realizada com a ajuda de dois alunos do programa de iniciação científica do CNPq (PIBIC/CNPq) (Lucas Alves de Freitas e Fernanda Antunes Oliveira). Além disso, contou-se com a colaboração científica da Dra. Ana Paula Lepique para isolamento e caracterização das células endoteliais, e do Dr. Enrique Boccardo e Dra. Laura Sichero para imortalização das linhagens primárias obtidas. Todos estes experimentos foram realizados no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (ILPC).

### **4.2.1 Isolamento e cultivo de células endoteliais de derme de camundongo**

- **Animais**

Foram empregados camundongos C57BL/6, SPF (*specific pathogen free*), de 03 dias de vida e de 06 semanas (machos), criados em ambiente com temperatura e luminosidade controladas, em microisoladores, alojados em estantes ventiladas e recebendo ração apropriada e água acidificada *ad libitum*, no biotério do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (ILPC). Todos os procedimentos experimentais

envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Antônio Prudente (CEUA/FAP), sob o número 031/09.

- **Isolamento e cultura primária de células endoteliais da derme**

Foram testados dois protocolos para o isolamento de células endoteliais.

**1º. Protocolo:**

As células endoteliais foram coletadas a partir de cerca 1,0g de pele total, utilizando soluções e materiais estéreis em capela de fluxo laminar. Utilizou-se 03 camundongos machos com 03 dias de vida. Realizou-se a eutanásia dos mesmos por aprofundamento de anestesia com halotano, seguida de decapitação. Removeu-se a cauda e os membros com ajuda de tesoura estéril e, depois, a pele com a ajuda de pinças estéreis. Os fragmentos de pele foram lavados 3 vezes, durante 5 minutos, em HBSS 1x (*Hank's balanced salt solution*) contendo penicilina G cristalina 100UI/ml + estreptomicina 100µg/mL (Invitrogen), gentamicina 10µg/ml (Schering-Plough) e anfotericina B 2,5µg/mL (Invitrogen). Passaram-se os fragmentos para um tubo Falcon de 50mL, contendo 10mL de dispase (Invitrogen) 0,05mg/ml em PBS 1x (*Phosphate buffered saline*). Colocou-se em banho-maria a 37°C, com agitação a cada 10min, durante 90min. Após esse processo, passaram-se os fragmentos para uma placa de Petri e, com auxílio de pinças esterilizadas, removeu-se mecanicamente a epiderme. Em outra placa de Petri, colocou-se 1,0mL de solução de colagenase 1A (Invitrogen) (colagenase 1A 0,4%, albumina 4%, HBSS 1x) e acrescentaram-se os fragmentos obtidos. Com a ajuda de 02 bisturis, cortou-se a derme em pedaços de aproximadamente 1,0mm<sup>2</sup>, dividindo o conteúdo obtido em 04 tubos eppendorf, completou-se com solução de colagenase 1A (Invitrogen), deixando-os em

Thermomixer a 37°C por 90 minutos sob agitação de 800rpm. Após esse tempo, passou-se o conteúdo dos 04 tubos eppendorf para um tubo Falcon de 50mL, realizou-se a coleta dos resíduos com *Mouse Tonic Hank's solution* (MTH) (HBSS 1x, HEPES 15mM, DNase I 0,5U/ml, SBF 5%). Acoplou-se um *cell strainer* de 70µm (BD Bioscience) num tubo Falcon de 50mL, mantido no gelo e o umidificando-se com MTH. Diluiu-se a suspensão celular em 10mL de MTH e passou-a pelo *cell strainer*. Lavou-se o *strainer* com mais 10mL de MTH. Centrifugou-se a suspensão durante 5min, a 400g e 4°C. Aspirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em mais 10mL de MTH, centrifugou-se a suspensão por 5 minutos, a 400g e 4°C, descartando-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o pellet com 1,0mL de MTH.

## **2º protocolo:**

Empregou-se uma modificação da estratégia descrita por (CARMELIET et al. 2001). 02 camundongos C57BL/6 machos com 6 semanas de vida, foram inoculados subcutaneamente, bilateralmente na região traseira, 500µl de Matrigel GFR (BD Bioscience), contendo heparina 130U/ml, bFGF 100 ng/ml e mVEGF 5,0 ng/mL, utilizando-se uma seringa de insulina de 1,0mL com agulha de 27G para aplicação do plugue de Matrigel. Após sete dias, os animais foram eutanasiados com halotano. Com o auxílio de tesoura e pinças estéreis retirou-se a pele dos camundongos a fim de expor o subcutâneo e realizar a coleta do plugue de Matrigel. Colocaram-se os plugues coletados em tubo Falcon de 50mL, contendo solução de HBSS 1x, contendo penicilina G cristalina 100UI/mL + estreptomicina 100µg/mL (Invitrogen), gentamicina 10µg/mL (Schering-Plough) e anfotericina B 2,5µg/mL (Invitrogen). Aspirou-se o sobrenadante e repetiu-se o processo mais 03 vezes, deixando-os em

cada lavagem durante 5min no gelo. Colocaram-se os plugues em 02 tubos eppendorf de 2,0mL contendo 2,0mL de solução de colagenase 1A (Invitrogen) a 0,4% + hialuronidase (Hyalozima, Apsen) 1000U/mL deixou-se no Thermomixer à 37°C por 60 minutos, sob agitação de 800rpm. Retiraram-se os plugues dos tubos eppendorf, passamos para uma placa de Petri e com a ajuda de 02 bisturis cortaram-nos em fragmentos menores. Colocou-se novamente no Thermomixer à 37°C por 30 minutos, sob agitação de 800rpm. Acoplou-se um *cell strainer* de 70µm em um tubo Falcon de 50mL, mantido no gelo, umidificandos-e com MTH. Diluiu-se a suspensão celular em 10mL de MTH e a passou-se pelo *cell strainer*, em seguida lavou-se o *strainer* com mais 10mL de MTH. Centrifugou-se a suspensão durante 5minutos a 400g e 4°C, e aspirou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o pellet em 10mL de MTH e centrifugou-se a suspensão por 5 minutos, a 400g e 4°C, descartando o sobrenadante em seguida. As células foram ressuspendidas em 100µL de MTH.

Após obtenção das células por qualquer um dos dois métodos, realizou-se a contagem das células em câmara de Neubauer, avaliando-se a viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de Trypan. O protocolo 1 mostrou-se de maior eficiência, sendo utilizado nos experimentos subsequentes.

Para isolamento das células endoteliais, as células foram marcadas com anticorpo PE-anti-CD31/PECAM-1 (Abcam) 1:25 em MTH e 1,0µL de *FcR block* a temperatura ambiente por 15min. Empregando-se o *EasySep PE Selection kit* (StemCell Technologies), seguindo as recomendações do fabricante, separou-se um grupo de células. Este é um kit para seleção positiva de células marcadas com anticorpo acoplado à ficoeritrina (PE), empregando nanopartículas imunomagnéticas.

As células obtidas foram plaqueadas em placas de Petri de 60mm cobertas com colágeno IV (BD Biosciences), com uma densidade de 7500 células/cm<sup>2</sup>, 3,0mL em meio para células endoteliais (DMEM low-glucose (Invitrogen), HEPES 10mM (Sigma), SBF20% (Cultilab ou Invitrogen), mVEGF 5,0ng/mL (Invitrogen), insulina 5,0µg/mL (Sigma), heparina 15U/mL, hidrocortisona 1,0µg/mL, penicilina G cristalina 100U/mL, estreptomomicina 100µg/mL, gentamicina 40µg/mL, anfotericina B 0,25µg/mL, *endothelial cell growth supplement* (ECGS, Invitrogen) 30µg/mL, β-mercaptoetanol 5,0µM), e colocadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C.

As imagens com os cultivos primários das células endoteliais encontra-se no tópico de anexos (Anexo 1).

- **Imortalização das células endoteliais**

O sobrenadante de células Bosc23 (fibroblasto ecotrópico de camundongo Bosc23 contendo vetores retrovirais do gene E7 de HPV16) foi utilizado para infectar células endoteliais de derme de camundongo mantidas em cultura em placas de Petri de 60mm com confluência de 20%. Para isso o meio das células Bosc23 foi aspirado com uma seringa de 5,0mL e, utilizando-se um filtro de 0,45µm, gotejado sobre as células endoteliais. Após 4–8 horas, foram adicionados 3,0ml de meio de células endoteliais com SBF 20% (MCE20) fresco às células endoteliais. No dia seguinte, o meio foi aspirado e substituído por 5,0mL de MCE20 fresco e mantidas nessas condições por mais 24 horas. Finalmente, o meio foi substituído por MCE20 com 800µg/mL Geneticina (G418, GibcoBRL). Após uma semana de seleção com G418, as células foram mantidas em MCE20 fresco até verificar-se a formação de colônias.

- **Extração de RNA e realização de Real-Time PCR quantitativo**

Para a extração do RNA, descreve-se o método utilizado para obtenção de RNA total de células endoteliais, mas esse foi utilizado também nas demais linhagens celulares.

Plaqueram-se as células endoteliais imortalizadas, no total de  $1,0 \times 10^6$  células em placas de 60mm, mantendo-as em cultura até atingirem 80% de confluência. A partir daí, aspirou-se o meio e lavaram-se as células com PBS 1x. Adicionou-se 350 $\mu$ L de tampão RLT contendo  $\beta$ -mercaptoetanol a 1%, pipetando. Homogeneizou-se o lisado passando-o por seringa com agulha de 20G por pelo menos 05 vezes. Coletou-se o extrato e realizou-se a purificação do RNA total seguindo as recomendações do fabricante para o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), que consiste em uma série de lavagens com os tampões RW1 e RPE (fornecidos pelo fabricante), diluindo-se o RNA obtido em H<sub>2</sub>O livre de RNases. As concentrações e integridade das amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop, ND-1000), sendo consideradas de boa qualidade quando a relação  $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$  e a relação  $A_{260}/A_{230} \geq 1,7$ . A qualidade do RNA foi avaliada também pelo Bioanalyzer, sendo consideradas amostras com boa qualidade aquelas com RIN (RNA integrity number)  $\geq 7,0$ .

Para avaliação da expressão gênica empregou-se a técnica de Real Time-PCR quantitativo (qRT-PCR), utilizando-se iniciadores específicos para o gene *Nos3* (*nitric oxide synthase 3*), visto que esse gene se encontra constitutivamente expresso em células endoteliais.

Os mRNA foram reversamente transcritos do RNA total oriundo da cultura de células endoteliais de camundongo utilizando-se iniciadores oligo-dT e o kit *Improm-II Reverse Transcriptase* (Promega), conforme instruções do fabricante.

No preparo das amostras, utilizamos 2,0µg RNA total, diluídos em 4µL de H<sub>2</sub>O, e 1,0µL oligo dT. Para o mix, utilizamos 6,1µL H<sub>2</sub>O DEPC, 4,0µL tampão da enzima transcriptase, 2,4 µL MgCl<sub>2</sub>, 1,0µL dNTP mix 10mM, 0,5µL RNase inibitor e 1,0µL de enzima transcriptase reversa Improm-II ® (Promega).

Um cDNA obtido de um *pool* de linhagens celulares isogênicas a B16F10 e amostras de pulmão total foi empregado para padronização dos primers Nos3 (Fw- 5'- AGA GCC TGC AAT TAC TAC CA-3'; Rv- 5'- GTG GAT TTG CTG CTC TGT AG- 3'). As reações foram acompanhadas, pela curva de incorporação de SYBR Green, com o 7500 Real Time PCR SYSTEM (Applied Biosystems).

A eficiência da PCR com o par de iniciadores foi avaliada pela construção de uma curva padrão para o gene investigado. Para isso, foram realizadas diluições seriadas a partir do cDNA *pool*, referido anteriormente, preparado de um *pool* de amostras de RNA total a partir de diferentes linhagens celulares isogênicas de camundongos C57BL/6 (células endoteliais, fibroblastos normais, melanoma B16F10 e pulmão total), provenientes de biopsias e de linhagens disponíveis em nosso laboratório, não submetidas a drogas, que corresponderiam aos mRNAs da expressão basal dos genes.

A curva-padrão proveniente das diluições seriadas de cDNA foi plotada num gráfico utilizando os valores dos CTs (*Cycle Threshold*) para cada diluição e respectivas concentrações (log<sub>10</sub> RNA). A partir da curva-padrão foi calculada a equação da reta, bem como o valor da inclinação da reta ou *slope*. O cálculo da

eficiência da amplificação foi realizado segundo a fórmula:  $E=10^{(-1/\text{slope})}$ . As reações de amplificação foram realizadas em placas de 96 poços, contendo duplicatas de cada amostra, além de um controle negativo (sem cDNA), num volume final de 20,0 $\mu$ L para cada reação/poço, sendo 10,0 $\mu$ L do reagente SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 5,0 $\mu$ L de um mix contendo os iniciadores *forward* e *reverse* na concentração final 100nM e 5,0 $\mu$ L de cDNA nas sucessivas concentrações.

No *real-time* PCR, a fluorescência é capturada e registrada a cada ciclo da PCR, sendo que a intensidade de fluorescência detectada é diretamente proporcional à quantidade de cDNA da amostra. Os dados gerados foram analisados por um *software* específico (7500 v2.0.5 - Applied Biosystems) e plotados em um gráfico que mostra a intensidade de fluorescência versus o número de ciclos. A análise de cada reação foi realizada determinando primeiramente o *baseline*, que consiste na quantidade de fluorescência lida durante os ciclos iniciais da PCR, onde ocorre pouca alteração de sinal. O software desconta os valores dessa fluorescência basal das medidas obtidas das amostras.

A partir da curva-padrão foi calculada a equação da reta, correlacionando as diversas quantidades de cDNA com os CT obtidos, bem como o valor da inclinação da reta ou *slope*, do gene Nos3. A partir desta equação encontrou-se uma eficiência da reação de amplificação do referido gene de 100% (2,004).

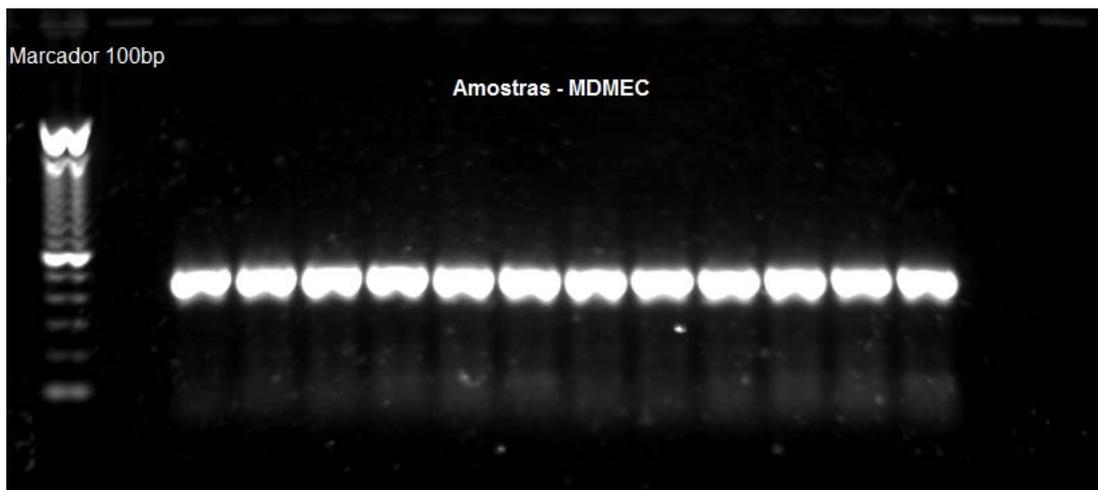
Procedeu-se a *real-time*-PCR para avaliação da expressão do gene Nos3, com o mix de *primers* (*Fw* e *Rv*) na concentração 100nM, 200nM e 400nM, tendo-se reações com duplicata das amostras do cDNA obtido de células endoteliais com 10ng por reação, utilizando-se mix de reagentes do kit SYBR Green® e o ABI 7500 Real time PCR (Applied Biosystems) para confirmação da expressão do referido gene. A

concentração de primers de 400nM foi selecionada, visto apresentar os menores CTs. A expressão do gene Nos3 foi confirmada nas células endoteliais após pRT-PCR com as amostras das células endoteliais. Os gráficos com resultado da expressão estão disponíveis no tópico de anexos (Anexo 2).

Para controle da qualidade da reação de transcrição reversa, padronizamos a execução de PCR (*polymerase chain reaction*) convencional, utilizando-se o gene constitutivo Gapdh como referência e um mix de *primers* já padronizados pelo nosso laboratório (*Fw* 5'-TTG TGG AAG GGC TCA TGA CCA-3' / *Rv* 5'-CGT ATT CAT TGT CAT ACC AGG-3') na concentração de 100nM. Para a PCR convencional utilizamos o kit *Tli DNA polymerase*® (Promega), seguindo as orientações do protocolo do fabricante, utilizando-se 20ng de cDNA por reação/amostra.

Ao final da PCR, preparamos um gel de agarose 1% em TBE 1x corado com reagente GelRed® (Phenix Research) e cada amostra obtida foi diluída em tampão 6x (10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% azul de bromofenol, 0,03% xileno cianol FF, Glicerol 60%, 60 mM EDTA) e aplicada no gel. Em cada gel preparado aplicamos 5µL de *100 bp DNA Ladder*® (Invitrogen). Corremos as amostras a 110V sob solução TBE 1x por aproximadamente 60 minutos.

Após a corrida, o gel obtido foi revelado no fotodocumentador ultravioleta. Apenas as amostras com bandas evidentes e preditas (aproximadamente 447bp) para o gene referência Gapdh foram utilizadas nas reações de real-time PCR, por serem tidas como de boa qualidade, como exemplificado por um dos experimentos realizados com células MDMEC cultivadas em monocamada na Figura seguinte.



**Legenda:** Amostras de cDNA foram obtidas por transcrição reversa a partir do RNA total extraído de células MDMEC cultivadas em monocamada e submetidas a reação de PCR convencional com iniciadores do gene Gapdh. Após reação de PCR as amostras foram diluídas em tampão 6x, submetidas à corrida em gel de agarose diluída em TBE a 1% e posteriormente reveladas sob luz ultravioleta.

**Figura 1** - Evidenciam-se as bandas representativas de cada amostra conforme o tamanho predito para a reação de PCR convencional para o gene Gapdh (447bp).

- **Imunoistoquímica para caracterização das células endoteliais com anticorpos anti-CD105 e anti-FvW**

Para caracterização imunoistoquímica das células endoteliais, empregaram-se os anticorpos anti-CD105 e anti-fator de von Willenbrand, visto que essas proteínas estão permanentemente expressas em células endoteliais.

Cultivaram-se as células endoteliais em lâminas LabTek® de 8 poços cobertas com gelatina porcina 0,1% (Sigma) em HCl 0,1N e fixaram-nas por 10 minutos com acetona gelada para o anticorpo anti-CD105 ou formalina tamponada com fosfato gelada para o anticorpo anti-fator de von Willenbrand. Em seguida, lavaram-se as lâminas com PBS gelado e deixou-nas à temperatura de 4°C até o início da reação de imunoistoquímica (IHQ). Procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6% (v/v) em metanol, com 03 trocas de 10 minutos cada. As lâminas foram lavadas em água corrente destilada e com solução salina (PBS) 10mM

pH=7,4 por 5 minutos. Incubaram-se as lâminas com os anticorpos primários diluídos conforme Quadro 1, em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) 0,1% (Merck), por 30 minutos a 37°C e por 18 horas a 4°C em câmara úmida, respectivamente.

**Quadro 2** - Lista dos anticorpos utilizados para caracterização

Anticorpos	Clones	Título	Fabricantes
<b>Fator de von Willenbrand</b>	Policlonal feito em coelho	1:1000	Abcam cat# ab6994, Cambridge, MA, EUA
<b>CD105</b>	MJ7-18 feito em rato	1:100	BioLegend cat# 120402, San Diego, CA, EUA

Após esta etapa, lavaram-se as lâminas em tampão PBS com 03 trocas de 03 minutos cada. Em seguida, incubou-nas, por 30 minutos, a 37°C com *Advance™ HRP Link* (Dako cod# K4068, Carpinteria, CA, EUA) e lavou-nas com tampão PBS com 03 trocas de 03 minutos cada. As lâminas foram, então, incubadas em solução substrato: 100mg de 3,3'-*diaminobenzidine-tetrahydrochloride* (DAB) (Sigma, D-5637, EUA), 1,0mL de dimetilsulfóxido (DMSO), 1,0mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  6% (água oxigenada 20 vol) e 100 mL de PBS por 5min a 37°C, ao abrigo da luz. Logo após, lavou-nas em água corrente e destilada por 03 minutos, contracorou-nas com Hematoxilina de Harris por 01 minuto, lavou-nas em água corrente e destilada. Posteriormente, as lâminas foram imersas 02 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), e novamente lavadas em água corrente e destilada. Procedeu-se à desidratação com etanol 80%, 30 segundos; etanol 95%, 30 segundos; etanol 100% 2 vezes, 30 segundos cada; xilol 4 vezes, 30 segundos cada e montadas

em Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha). As imagens da imunohistoquímica das células endoteliais encontram-se representadas no tópico de anexos (Anexo 3).

- **Ensaio de tubulogênese**

Para a realização deste ensaio, cobriram-se 12 poços de uma placa de 48 *poços* com 400µl de Matrigel e DMEM (1:1). Levou-se a placa para estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C por 30 minutos para polimerização do gel. As células endoteliais imortalizadas foram plaqueadas na densidade de 1,0x10<sup>5</sup> células/poço, 5,0x10<sup>4</sup> células/poço e 2,5x10<sup>4</sup> células/poço em meio de células endoteliais com SBF 10% e colocadas na estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 horas. Após esse período, retirou-se a placa da estufa e observa-se a formação de estruturas tubulares capilariformes (VENETSANAKOS et al. 2002; KOBAYASHI et al. 2004). Verificou-se a formação de túbulos nas concentrações testadas, estando as Figuras representadas no tópico de anexos (Anexo 4).

### 4.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA DOS CULTIVOS CELULARES

Para imunofluorescência, descreve-se o método realizado para caracterização das células endoteliais (MDMEC), embora esse método tenha sido empregado nos experimentos de imunofluorescência com as demais linhagens cultivadas em monocamada. Células endoteliais foram ressuspensas em 300µL de meio DMEM suplementado num total de 3x10<sup>3</sup> células por poço de uma placa de 04 poços (Nunc® - 20mm/poço) previamente preparada com a colocação de uma lamínula de 15mm na base de cada poço. Colocou-se a placa na incubadora CO<sub>2</sub> a 37°C. Após 03 dias,

as células aderiram à superfície das lamínulas presentes em cada poço e atingiram confluência de 80%. Nesse momento, aspirou-se o meio DMEM, lavando com PBS 1x por 2 vezes e fixaram-se os cultivos com paraformaldeído 4% por 20 minutos. Após fixação, lavaram-se novamente com PBS 1x e conservaram-se as células em solução com PBS 1x gelado sob temperatura de 4°C.

Para realização da imunofluorescência das células endoteliais fixadas, utilizou-se o anticorpo anti-CD31-PE (monoclonal feito em rato – PE (566/576) Abcam cat# ab46733, Cambridge, MA, EUA) com título 1:25 e para marcação nuclear utilizamos TO-PRO-3 (TO-PRO®-3 iodide (642/661) - 1 mM solution in DMSO – Invitrogen cat#T3605, Paisley, UK) com título 1:300.

Inicialmente, preparou-se uma câmara úmida revestindo a superfície externa de uma placa de acrílico para cultura de células com papel alumínio a fim de impedir a penetração de luz, o que poderia interferir com a fluorescência do anticorpo testado, e forrou-se a placa com papel filtro umedecido para evitar ressecamento das lâminas durante a marcação.

Retiraram-se as 04 lamínulas, com as células endoteliais aderidas, da placa, colocando-as sobre hastes na câmara úmida e distribuiu-se 100µL de solução Tris-glicina (glicina 0,1M, Tris 100mM pH7,4) na superfície de cada lamínula e deixando por 30min em temperatura ambiente. Após esse período, retirou-se o excesso da solução Tris-glicina e bloqueou-se por 01 hora com 100µL de solução de BSA (*bovine serum albumine*) 5% diluída em PBS 1x por lamínula. Em seguida, retirou-se o excesso de BSA 5% e aplicou-se o anticorpo anti-CD31 e o marcador nuclear TO-PRO-3 nas diluições referidas anteriormente numa solução de BSA 1% em PBS 1x e deixaram-se as lamínulas sob proteção na câmara úmida *overnight*. No dia seguinte,

lavaram-se as lamínulas com PBS 1x por 03 vezes, retirando-se o excesso e aplicou-se o reagente Floursave® (Merck, cat#345789, Darmstadt, Germany) sobre a superfície contendo as células, colocando-se as lamínulas para secagem sobre lâminas de microscopia durante 02 dias. Com as lamínulas aderidas à superfície da lâmina prosseguiu-se à avaliação da imunofluorescência, utilizando-se o aparelho de microscopia confocal da Leica Microsystems®, modelo TCS SP5II e software LAS AF, procedendo às calibrações dos lasers para cada comprimento de onda de absorbância e de emissão do anticorpo anti-CD31 (absorbância 566nm / emissão 576nm) e do TO-PRO-3 (absorbância 642nm / emissão 661nm). As Figuras com a visualização da fluorescência demonstrando a marcação de imunofluorescência nas células endoteliais encontram-se no tópico de anexos (Anexo 5).

Nos cultivos em monocamada das células B16F10 e MDMEC, para avaliação da proteína PARD3, utilizamos o anticorpo primário anti-PARD3 (*rabbit policlonal* #ab64840 – Abcam) na diluição 1:500, conforme orientação do fabricante. Para avaliação de FABP4, no melanoma, endotélio e macrófago, o anticorpo primário anti-FABP4 *goat anti-mouse* #AF1443 (R&D Systems). Os anticorpos fluorescentes secundários foram o Alexa fluor 488 *goat anti-rabbit* #A11008® (Molecular Probes) e o Alexa fluor 488 *rabbit anti-goat* #A11078® (Molecular Probes) na diluição 1:1000. Para marcação nuclear adicionamos To-pro-3 *iodide* 642/661 #T3605® (Molecular Probes) na diluição 1:300.

#### 4.4 PADRONIZAÇÃO DOS PRIMERS DOS GENES FABP4, IFI202B, FLT1, ARHGEF6, IGF2BP3 E PARD3 PARA *REAL-TIME* PCR

Uma vez obtidas as amostras iniciais de RNA total das culturas em monocamada das linhagens B16F10, MDMEC e IC-21, foram realizados os experimentos para padronização dos iniciadores (*primers*) e execução dos ensaios de expressão gênica por *real-time PCR*. Foram utilizados os iniciadores dos genes Fabp4, Ifi202b, Flt1, Igf2bp3(Imp3) e Pard3 a partir dos resultados de LIMA (2007). Para o gene Argef6(Cool2), os primers foram obtidos do artigo de (KOHN et al. 2004).

Para realização dos cálculos de expressão relativa por *real-time PCR*, utilizou-se a metodologia proposta por PFAFFL et al. (2001), onde a razão de expressão relativa é determinada com base nas eficiências dos genes alvos e de genes referência (*housekeeping genes*).

$$= \frac{(E \text{ gene alvo})^{\Delta CT(\text{amostra referência} - \text{amostra alvo})}}{(E \text{ gene referência})^{\Delta CT(\text{amostra referência} - \text{amostra alvo})}}$$

[E= eficiência, CT= limiar de ciclo de amplificação (*Cicle Threshold*)]

Inicialmente seria utilizado apenas o gene de expressão constitutiva Gapdh (gliceraldeído-fosfato desidrogenase) para os cálculos de expressão relativa. Todavia, conforme discutido no artigo de (VANDESOMPELE et al. 2002), até mesmo os

genes constitutivos podem variar a expressão, interferindo consideravelmente com os resultados de expressão gênica por *real-time* PCR, sendo proposto pelos autores a utilização de ao menos 03 genes referência e, através de uma ferramenta de padronização elaborada pelos mesmos conhecida como GENORM® (<http://medgen.ugent.be/genorm/>), a obtenção de normalizadores adequados. Dessa forma, foram selecionados mais 02 genes referências,  $\beta$ Actina e Hprt1 (hipoxantina-fosforibosil transferase 1), a partir de dados da literatura. Os resultados de expressão gênica obtidos com os 03 genes referência foram plotados no GENORM que forneceu um fator normalizador numérico, substituindo o denominador da formula proposta por PFAFFL et al. (2001), como representado a seguir.

$$= \frac{\Delta CT(\text{referência} - \text{amostra})}{\text{Fator normalização (GENORM)}} \text{ (E gene alvo)}$$

Todos os genes foram padronizados antes da realização dos ensaios de *real-time* PCR e avaliação de expressão relativa. O Quadro 3 apresenta os *primers* dos genes avaliados no projeto.

**Quadro 3** - Genes e *primers* selecionados para as reações de *real-time* PCR

<b>Gene</b>	<b>Primer Foward (5'-3')</b>	<b>Primer Reverse (5'-3')</b>	<b>Amplicon cDNA</b>
Fabp4	AAAGAGAAAACGAGATGGTGACAAG	TGTGGAAGTCACGCCTTTCA	64bp
Imp3	CCACTTCTATGCTTGCCAGGTT	TGCTTTACCTGAGTCAGAATTCCT	63bp
Ifi202b	CTGAGAGCTACGAGGTACAGTTACATG	GGGTTACATCACTCACTGTTTTTCA	73bp
Pard3	GCGGATCAGCAGATGTAACGA	TTCTCGGTCATCCAGTTCTGTCT	88bp
Flt1	CAAGCCCAAGGCCTCCAT	CCCGCCTCCTTGCTTTTACT	60bp
Cool2	AGTACTGCTGCCCTGGAAGA	CCACAAAGCACAAAGCTCAA	467bp
Hprt1	TGGATATGCCCTTGACTATAATGAGT	GGCTTTTCCAGTTTCACTAATGACA	55bp
$\beta$ Actina	TGGCTCCTAGCACCATGAAGA	CACCGATCCACACAGAGTACTTG	69bp
Gapdh	GGGCTGGCATTGCTCTCA	TGCTGTAGCCGTATTCATTGTCA	73bp

Para padronização dos genes alvos e referências, seguiram-se os passos de *real-time PCR* descritos na caracterização das células endoteliais, utilizando-se, como descrito, um *pool* de amostras de RNA total a partir de diferentes linhagens celulares isogênicas de camundongos C57BL/6 (células endoteliais, fibroblastos normais, melanoma B16F10 e pulmão total), provenientes de biopsias e de linhagens disponíveis no laboratório, para posterior confecção do cDNA referência (*pool*) das reações de PCR.

Utilizando-se 10ng do cDNA em duplicata para cada gene, testaram-se 03 concentrações (100nM, 200nM e 400nM) de um mix dos primers *forward e reverse* e se executou *real-time PCR*, estabelecendo-se, a partir dos resultados reunidos, a concentração de 100nM para Fabp4, Ifi202b, Pard3, Flt1, Imp3 e Gapdh, de 200 $\mu$ M para o gene Arhgef6 e 400nM para os genes  $\beta$ Actina e Hprt1 (Quadro 4).

Em seguida, avaliou-se a eficiência dos *primers* dos genes previamente citados, utilizando-se concentrações decrescentes de cDNA referência (*pool*) (100ng, 10ng, 1,0ng, 0,1ng e 0,01ng) em duplicata para cada gene. Consideraram-se como tendo eficiência adequada os genes com valores entre 1,8 e 2,2 (slope de -3,1 a -3,6) (Quadro 5) e concluímos a etapa de padronizações dos *primers*.

**Quadro 4** - Representação dos valores dos limiares de ciclo de amplificação (CT) ideais para cada gene testado.

<i>Gene</i>	<i>Concentração</i>	<i>CT</i>	<i>CT médio</i>	<i>CT SD</i>
<i>Fabp4</i>	100µM	23.34265	23.20677	0.192163
<i>Fabp4</i>	100µM	23.07089	23.20677	0.192163
<i>Ifi202b</i>	100µM	29.93012	29.94104	0.015443
<i>Ifi202b</i>	100µM	29.95196	29.94104	0.015443
<i>Pard3</i>	100µM	24.13096	24.12126	0.013716
<i>Pard3</i>	100µM	24.11156	24.12126	0.013716
<i>Flt1</i>	100µM	25.95085	25.93863	0.017281
<i>Flt1</i>	100µM	25.92641	25.93863	0.017281
<i>Imp3</i>	100µM	25.96083	25.94725	0.01921
<i>Imp3</i>	100µM	25.93367	25.94725	0.01921
<i>Arhgef6</i>	200µM	26.77224	26.69536	0.108724
<i>Arhgef6</i>	200µM	26.61848	26.69536	0.108724
<i>Gapdh</i>	100µM	18.66256	18.65599	0.009291
<i>Gapdh</i>	100µM	18.64942	18.65599	0.009291
<i>bActina</i>	400µM	17.76343	17.8528	0.126392
<i>bActina</i>	400µM	17.94217	17.8528	0.126392
<i>Hprt1</i>	400µM	24.48805	24.5529	0.101883
<i>Hprt1</i>	400µM	24.62494	24.5529	0.101883

**Legenda:** A partir de duplicatas de amostras de 10ng de cDNA do pool de RNA de referência, testaram-se para cada gene as concentrações de 100µM, 200µM e 400µM. CT = limiar de ciclo de amplificação, SD= desvio padrão.

**Quadro 5** - Eficiência dos *primers*

<i>Gene</i>	<i>Slope</i>	<i>Eficiência</i>	<i>Eficiência (%)</i>
<i>Arhgef6</i>	-3.0550	2.1248694	100
<i>Fabp4</i>	-3.5340	1.9185162	91.85
<i>Flt1</i>	-3.5350	1.9181627	91.81
<i>Ifi202b</i>	-3.7310	1.8536369	85.36
<i>Imp3</i>	-3.6560	1.8772537	87.72
<i>Pard3</i>	-3.4360	1.9545019	95.45
<i>Gapdh</i>	-3.46	1.9455126	94.55
<i>βActina</i>	-3.33	1.9944551	99.44
<i>Hprt1</i>	-3.63	1.8837660	88.37

Com os resultados da padronização dos *primers* finalizados, seguiram-se os experimentos de *real-time* PCR para avaliação de cinética de expressão gênica nas linhagens B16F10, MDMEC e IC-21 cultivadas em monocamada e tratadas com melfalano e TNF-alpha isolados e em associação.

## **4.5 PADRONIZAÇÃO DA CULTURA TRIDIMENSIONAL COM CÉLULAS B16F10, CÉLULAS ENDOTELIAIS E MACRÓFAGOS**

### **4.5.1 Estabelecimento de esferóides de células B16F10 em gel de agarose**

Objetivando a determinação de um modelo que representasse melhor a estrutura das lesões tumorais *in vivo*, assim como, avaliasse a interação intercelular existente entre célula neoplásica, endotélio e macrófago; foi proposto o estabelecimento de culturas tridimensionais (esferóides) com as linhagens de melanoma murino (B16F10), endotélio (MDMEC) e macrófago (IC-21).

Utilizando-se uma placa de 96 poços de fundo chato, foram distribuídos 100µL de agarose LMP (*low melting point*) autoclavada a 1% diluída em DMEM nos poços e deixada a placa em repouso para secagem do gel por 30 minutos. Após, foram distribuídos 150µL de meio DMEM contendo  $3,0 \times 10^3$  células B16F10 ressuspendidas em 150µL de meio/poço e deixadas na incubadora de CO<sub>2</sub>. Após 07 dias, observou-se a formação de esferoides coesos nos respectivos poços das placas. As imagens contendo os esferoides de células B16F10 encontram-se no tópicos de anexos (Anexo 6). Essa metodologia foi testada para o estabelecimento de esferoides com células endoteliais e macrófagos sem sucesso.

#### **4.5.2 Estabelecimento de esferóides pelo método gota invertida**

Avaliou-se o estabelecimento dos esferóides de células endoteliais, testando-se a metodologia da gota invertida, utilizando a placa micro NUNC® de 60 poços. Distribuíram-se  $3,0 \times 10^3$  células MDMEC em 20µL de meio DMEM suplementado em cada poço da placa e deixou-se em incubação a 37°C com CO<sub>2</sub> a 5%. Após 03 dias de cultivo, observou-se a formação de esferóides coesos e bem delimitados. Os esferóides se mantiveram coesos até 07 dias de incubação, todavia não foi observado crescimento importante dos mesmos no decorrer desse período, mantendo-se diminutos. As imagens com os esferóides de células endoteliais encontram-se representados no tópico de anexos (Anexo 7). Esta metodologia foi testada com as células B16F10 e macrófagos, mas não se observou formação de esferóides por esse método.

#### **4.6 ESTABELECIMENTO DE ESFERÓIDES MISTOS DE CÉLULAS B16F10, MDMEC E IC-21 PELO MÉTODO GOTA INVERTIDA ADAPTADO PARA PLACA DE 96 POÇOS COM GEL DE AGAROSE LMP 1%**

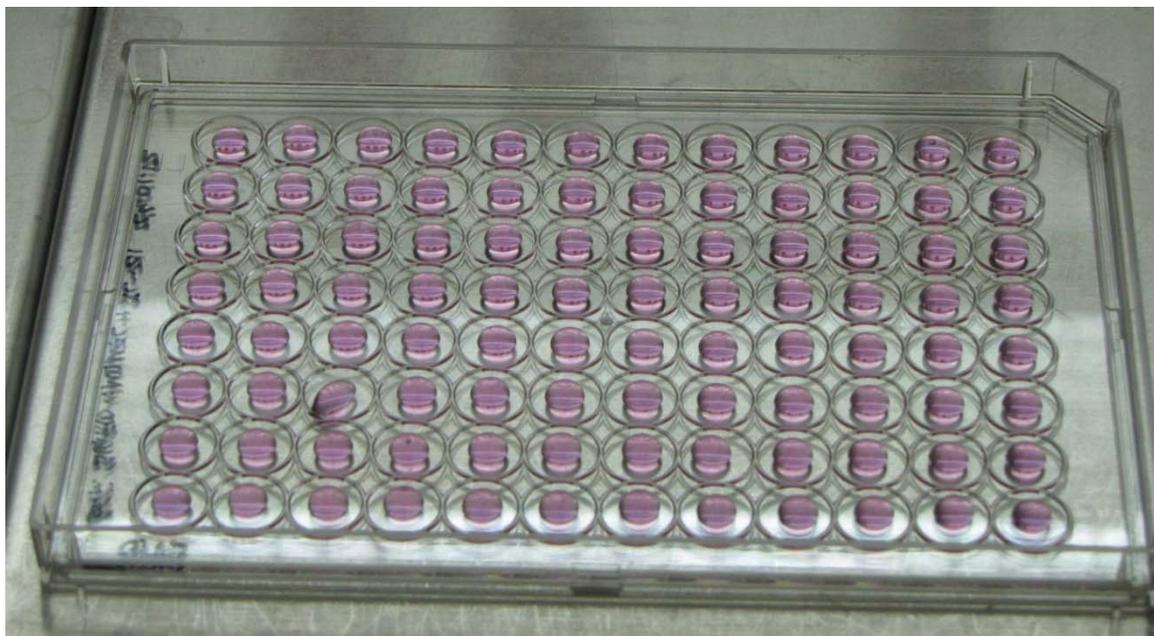
Testou-se o estabelecimento de esferóides mistos com as linhagens B16F10, MDMEC e IC-21, utilizando-se a metodologia de gota invertida, pois com a metodologia do gel de agarose não houve sucesso. Em experimentos anteriores, utilizando a placa micro NUNC® de 60 poços, foi obtido sucesso na formação de esferóides de MDMEC, todavia, observou-se que os esferóides formados por esse método eram difíceis de coletar e manipular, já que os poços eram diminutos e com

pouco volume de meio (20 $\mu$ L) em cada poço. Tendo em vista que o objetivo das coculturas era a avaliação do padrão de citotoxicidade e expressão gênica das linhagens após os tratamentos com as drogas melfalano e TNF-alpha, tentou-se padronizar um novo método de maior praticidade para utilização dos esferóides. Outro ponto que se definiu foi o emprego das linhagens B16F10, MDMEC e IC-21 apenas com as combinações B16F10 e MDMEC e com as três linhagens juntas, excluindo as combinações MDMEC e IC-21; e B16F10 e IC-21, considerando-se o pouco significado que a associação de células endoteliais com macrófago e de melanoma com macrófago traria aos experimentos de expressão gênica por não traduzirem um cenário observável *in vivo*.

Para realização deste experimento, adaptou-se, então, o método descrito no artigo de HERRMANN et al. (2008) considerando sua potencial praticidade e reprodutibilidade.

Prepararam-se duas placas de 96 poços de fundo chato com gel de agarose LMP 1% dissolvido em 100 $\mu$ L de meio DMEM por poço, da mesma forma do que foi descrito para a obtenção dos esferóides B16F10, mas, agora, após secagem do gel, distribuíram-se 150 $\mu$ L de meio DMEM-SBF10% em cada poço, que serviria para o posterior cultivo dos esferóides a serem obtidos conforme o descrito a seguir. Plaquearam-se as linhagens nas combinações propostas anteriormente (B16F10+MDMEC e B16F10+MDMEC+IC-21), mantendo o total de  $3 \times 10^3$  células/poço, com igual proporção entre elas e ressuspensas em 20 $\mu$ L de meio DMEM, tendo-se uma placa para cada cocultura testada. Agora, ao invés de distribuírem-se os cultivos diretamente sobre o gel de agarose, plaqueou-os nos aros

contidos na face interna da tampa da placa, onde cada aro corresponde à borda do poço contido na mesma, como representado na imagem seguinte.

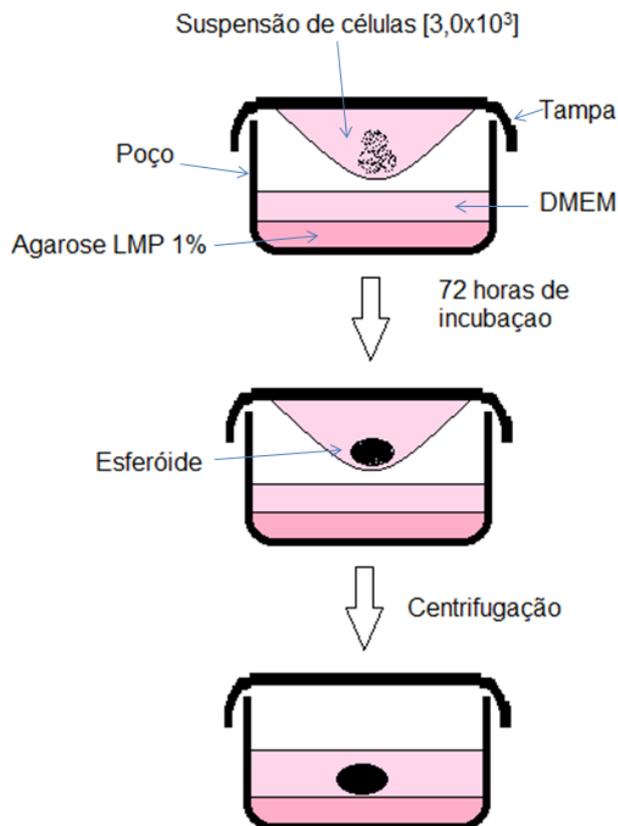


**Legenda:** Células das linhagens B16F10, MDMEC e IC-21 foram cocultivadas na concentração final de  $3,0 \times 10^3$  células em  $20 \mu\text{L}$  de meio DMEM por poço e plaqueadas nos aros da tampa de uma placa 96 poços de fundo chato.

**Figura 2** - Imagem demonstrando a tampa de uma placa 96 poços preparada com as células B16F10, MDMEC e IC-21 em cocultivo e distribuídas em  $20 \mu\text{L}$  de meio DMEM para cada um dos aros da tampa.

Uma vez preparados os cultivos multicelulares, virou-se a tampa cuidadosamente sobre a placa para evitar que as gotas se deformassem no contato com os aros dos poços e, em seguida, colocaram-se as placas com as tampas numa estufa com agitação circular por 02 horas a  $37^\circ\text{C}$  a 100rpm. Após esse período, transferiram-se as placas para uma incubadora a  $37^\circ\text{C}$  com  $\text{CO}_2$  a 5%, por mais 72 horas.

Decorridos 03 dias de incubação, evidenciou-se a formação de esferóides bem coesos com todas as combinações celulares propostas (B16F10 + MDMEC e B16F10 + MDMEC + IC-21). A placa foi então centrifugada a 500 RPM por 1 minuto, a fim de transferir os esferóides contidos nos aros da tampa para os fundos dos respectivos poços contendo o gel de agarose LMP 1% e o meio DMEM+ SBF10%. A seguir, deixaram-se as placas em incubação por mais 04 a 05 dias para se observar a manutenção e viabilidade dos esferóides formados. Após 05 dias, os esferóides se mantiveram coesos. As imagens com os esferóides mistos contendo as linhagens B16F10, MDMEC e IC-21 encontram-se representadas no tópico de anexos (Anexo 8). A seguir uma representação esquemática do processo de obtenção dos esferóides.



**Figura 3** - Representação gráfica do processo de obtenção dos esferóides utilizando a metodologia da gota invertida, com o preparo das amostras na superfície dos aros da tampa de uma placa de 96 poços, sendo colocadas em suspensão na forma de gotas. Após 3 dias ocorre a formação de um esferóide coeso em cada aro do poço, sendo então transferido, após centrifugação, para o fundo do poço contendo meio e gel de agarose.

#### **4.7 CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DOS ESFERÓIDES DE MELANOMA B16F10 E ESFERÓIDES MISTOS COM AS LINHAGENS DE MELANOMA B16F10, CÉLULAS ENDOTELIAIS (MDMEC) E MACRÓFAGOS IC-21**

Uma vez determinada a metodologia para obtenção das culturas tridimensionais, procurou-se avaliar as características morfohistológicas dessas estruturas, realizando fixação e emblocamento em parafina e coloração com

hematoxilina e eosina (HE) dos esferóides de B16F10 e das coculturas B16F10-MDMEC e B16F10-MDMEC-IC-21.

Inicialmente, prepararam-se as placas com os esferóides de células B16F10, conforme relatado em tópico anterior. Como os esferóides eram estruturas diminutas, foi preparado um *pool* de esferóides de cada cultura testada. Utilizando-se uma ponteira p200 com a ponta cortada para aumentar o diâmetro da mesma, realizou-se a captura de cada esferoide contido em cada poço da placa de 96 poços aspirando-os num volume de 30-40 $\mu$ L e os transferindo para um tubo eppendorf de 1,7mL. Assim, com todos os esferóides da placa transferidos para o tubo 1,7mL, aspirou-se o meio de cultura proveniente dos volumes dispensados durante a transferência e adicionou-se cerca de 1mL de paraformaldeído a 4% (PFA4%) para fixação, durante 20 minutos, agitando-se periodicamente o tubo. Após fixação, cautelosamente, aspirou-se o PFA4%, lavou-se a cultura com PBS 1x por 03 vezes e deixou-se a amostra conservada em PBS1 x a 4°C até posterior parafinização e coloração com HE.

Prosseguiu-se, então, com a etapa de parafinização, contando com a colaboração do técnico em anatomia patológica Carlos Ferreira Nascimento. Nessa etapa, aspirou-se o PBS 1x contido nas amostras, substituindo-se por álcool para desidratação. Logo após, diafanizou-se a amostra com xilol em substituição ao álcool e, finalmente, impregnou-se com parafina líquida a 60°C e, após secagem, prepararam-se pequenos blocos de parafina. Os blocos foram cortados e prepararam-se as lâminas para coloração com HE. Resumidamente, nessa etapa, desparafinizaram-se e hidrataram-se os cortes, coraram-se com solução de hematoxilina por 15 minutos, lavando-se, em seguida, com água por 10min,

corando-se com eosina por 10 minutos, lavando-se novamente em água, desidratando-se em álcool 70% rapidamente e selando-se a lâmina com a lamínula. Após sucesso do método de coloração com HE dos esferóides B16F10, procedeu-se ao preparo das lâminas de HE das coculturas tridimensionais, contendo duas linhagens (B16F10-MDMEC) e três linhagens (B16F10-MDMEC-IC-21). O resultado da coloração histoquímica com HE dos esferóides B16F10, assim como dos esferóides mistos, foi registrado em microscópio adaptado para captura de imagens fotográficas e está representado no tópico de anexos (Anexo 9).

#### **4.8 PADRONIZAÇÃO DA DOSE DE DOXORRUBICINA PARA CONTROLE DE CITOTOXICIDADE COM MELFALANO E TNF-ALPHA PELO MTT**

A fim de avaliar a sensibilidade das linhagens de melanoma, células endoteliais e macrófagos ao efeito citotóxico do melfalano e do TNF-alpha e verificar alguma possível interação entre tais drogas, realizaram-se ensaios de toxicidade *in vitro* com as linhagens B16F10. Inicialmente, padronizou-se a dose de doxorubicina como controle de citotoxicidade dos ensaios, conforme sugestão da banca qualificadora do projeto, sendo a metodologia definida para a citotoxicidade da doxorubicina empregada para avaliação da citotoxicidade do melfalano e TNF-alpha subsequentemente.

Ressuspenderam-se  $3 \times 10^3$  células B16F10 em 200 $\mu$ L de meio DMEM por poço e plaqueou-las em 02 placas de 96 poços de fundo chato, correspondendo uma ao ensaio de citotoxicidade após 24 horas de tratamento e a outra ao ensaio de 48

horas. Nessas placas tinha-se um grupo controle (meio DMEM+SBF10% sem droga) e os grupos de tratamentos, com sextuplicatas para o controle e para cada grupo/tratamento. Após distribuição das células, a placa foi colocada na incubadora de CO<sub>2</sub> a 5% por 6 horas para que aderissem ao fundo do poço. A partir de dados da literatura, foram pré-selecionadas as doses de doxorubicina na concentração 0,5µg/mL e 1,0µg/mL como as de maior poder citotóxico (NAGY et al. 1997; DA SILVA et al. 2010). Após a incubação de 06 horas, aspirou-se cautelosamente o meio das placas e o substituiu-se por 200µL de meio DMEM-SBF10% contendo as doses acima mencionadas, sendo 06 poços com meio DMEM-SBF10% sem doxorubicina que corresponderam ao grupo controle, 06 poços com meio contendo doxorubicina (Adriblastina RD ® - Pfizer) [0,5µg/mL] e 06 poços com doxorubicina [1,0µg/mL] e colocaram-se as placas novamente na estufa. Após 24 horas, aspirou-se o meio com os tratamentos e adicionaram-se 200µL/poço de DMEM+SBF10% contendo MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, Sigma) na concentração 50µg/mL, retornando a placa para a incubadora. Após 3 horas, o meio contendo MTT foi removido e adicionou-se DMSO (Sigma) 200µL por poço para solubilização dos cristais formados produzidos. Nesse momento, aparece uma solução azulada, sendo a quantidade da cor azul proporcional ao número de células viáveis. Colocou-se a placa para leitura no leitor de ELISA Spectramax M5 (Molecular Devices®) calibrado na absorvância 540nm, obtendo-se os números de absorvância dos poços da placa. O mesmo procedimento foi realizado para a segunda placa após 48 horas do tratamento.

Avaliou-se os resultados numéricos obtidos na leitura no programa estatístico GraphPrism 4.0 (Graphpad Software ®), utilizando os cálculos de ANOVA

(*analysis of variance*) com pós-teste Tukey para as variáveis de distribuição paramétrica ou Kruskal-Wallis com pós-teste Dunnett para os cálculos não paramétricos.

Observou-se atividade citotóxica da doxorrubicina tanto em 24 horas quanto em 48 horas para as doses 0,5µg/mL e 1,0µg/mL e para os protocolos futuros foi escolhida a dose de 1,0µg/mL pela maior atividade citotóxica relativa. O gráfico com o resultado da citotoxicidade da doxorrubicina encontra-se representado no tópico de anexos (Anexo 10).

#### **4.9 ENSAIO DE PADRONIZAÇÃO DE DOSE DE MELFALANO E TNF-ALPHA**

Para avaliação da citotoxicidade do melfalano e TNF-alpha utilizaram-se células de melanoma B16F10 e de queratinócitos primários derivados de prepúcio humano. Os queratinócitos foram incluídos no experimento para avaliação da citotoxicidade do TNF-alpha, conforme orientação da banca de qualificação desse trabalho, visto apresentar atividade citotóxica direta nessas células. A partir da dose determinada com queratinócitos testou-se o TNF-alpha nas células B16F10.

Distribuíram-se as células em placas de 96 poços e plaqueando-as na concentração de  $3,0 \times 10^3$  células por poço, com sextuplicadas para cada grupo/tratamento, conforme na metodologia de citotoxicidade com doxorrubicina. Após 6 horas de incubação, aspirou-se o meio DMEM+SBF10% e adicionou-se meio novo com as doses M1=melfalano 36,9µM, M2=18,5µM, M3=12,3µM, T10=TNF-alpha 10ng/mL, T100= TNF-alpha 100ng/mL, D = doxorrubicina 1,0µg/mL e as

combinações T10+M1, T10+M2, T10+M3, T100+M1, T100+M2, T100+M3 em sextuplicata para cada grupo de tratamento em uma placa para 24 horas e outra para 48 horas. Para cada experimento (placa), tínhamos um grupo controle (C), contendo células de melanoma B16F10 com meio DMEM+SBF10% e um grupo controle K, contendo queratinócitos de prepúcio humano para avaliação de citotoxicidade exclusiva do TNF-alpha, como descrito anteriormente.

Após 24 horas e 48 horas as placas preparadas com MTT foram lidas no leitor espectraMax M5. Para cada avaliação de citotoxicidade, foram realizados pelo menos 02 ensaios, selecionando-se dentre esses, as doses de melfalano 36,9 $\mu$ M, TNF-alpha 100ng/mL e a combinação melfalano 36,9 $\mu$ M e TNF-alpha 100ng/mL por apresentarem atividade citotóxica em 48 horas com significância estatística ( $p < 0,05$ ).

Para confirmação do efeito citotóxico das doses selecionadas (melfalano 36,9 $\mu$ M e TNF-alpha 100ng/mL), realizou-se um novo ensaio com doses escalonadas das referidas drogas, tendo-se para o melfalano as doses: M1 = melfalano 3690 $\mu$ M; M2 = melfalano 369 $\mu$ M; M3 = melfalano 36,9 $\mu$ M; M4 = melfalano 3,69 $\mu$ M; M5 = melfalano 0,369 $\mu$ M e para o Tnf-alpha as doses: T1 = TNF-alpha 1000ng/mL; T2 = TNF-alpha 100ng/mL; T3 = TNF-alpha 10ng/mL; T4 = TNF-alpha 0,1ng/mL. Foi comprovada atividade citotóxica apenas para os tratamentos selecionados no experimento anterior e em doses superiores a essas. As Figuras com as doses padronizadas para citotoxicidade encontram-se representadas no tópico de anexos (Anexo 11).

#### 4.10 AVALIAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO APÓS OS TRATAMENTOS COM MEL E TNF-A

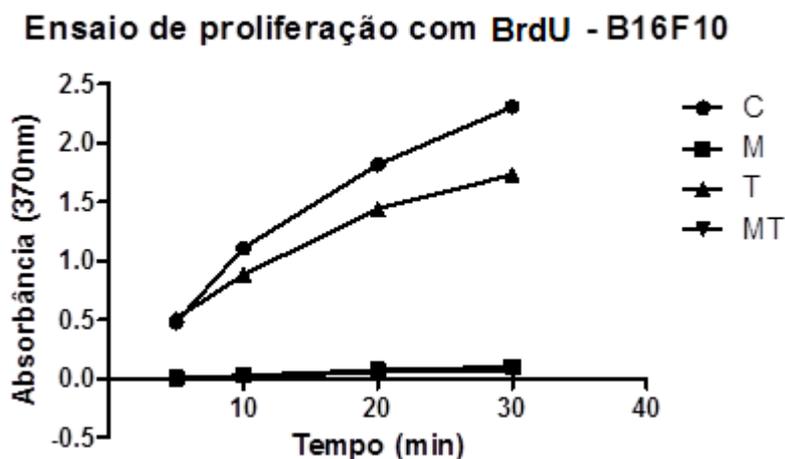
A fim de avaliar se a citotoxicidade observada nos ensaios com a metodologia do MTT descritos anteriormente dever-se-ia ou não à inibição da proliferação celular, realizaram-se experimentos de análise de proliferação pela incorporação BrdU nas linhagens testadas. Nesse ensaio, as células viáveis e em proliferação incorporam o BrdU durante a síntese da cadeia de DNA, mensurando-se a proporção dessas células com o kit colorimétrico (*Kit Cell proliferation BrdU colorimetric* – Roche ®), onde se evidencia, após uma sequência de reações, o aparecimento de coloração azul que é proporcional a quantidade de células em atividade proliferativa.

Utilizaram-se placas de 96 poços de fundo chato, plaqueando-se  $3 \times 10^3$  células/poço, ressuspendidas em 100µL de meio DMEM+SBF10% (células B16F10), DMEM suplementado com fatores de crescimento endotelial (células MDMEC) ou RMPI+SBF10% (células IC-21), tendo-se sextuplicatas para cada grupo de tratamento e controles. Foram realizados pelo menos 02 ensaios separados para cada linhagem. Testaram-se as mesmas doses selecionadas nos ensaios de citotoxicidade com MTT, incubando-se as células por 48 horas igualmente. Após as 48 horas com os tratamentos, procedeu-se o experimento de proliferação obedecendo à metodologia do kit, como descrito a seguir.

Após o período de tratamento de 48 horas, adicionam-se a cada poço contendo os tratamentos e aos controles 10µL da solução BrdU *labeling*® e deixa-se a placa na incubadora CO<sub>2</sub> 5% a 37°C por 02 horas. Ao término desse período,

aspira-se o meio, adicionando 200 $\mu$ L por poço da solução *Fixdenat*® e mantém-se por 30 minutos em temperatura ambiente. No passo seguinte, remove-se a solução anterior e adiciona-se 100 $\mu$ L do anticorpo *anti-BrdU-POD working*® em cada poço, deixando em temperatura ambiente por 90 minutos. Remove-se o anticorpo, lavando os poços com PBS 1x por 03 vezes e adicionam-se 100 $\mu$ L de *Substrate solution* ®. Após esse último passo, ocorre o aparecimento de coloração azul claro num intervalo de 05 a 30 minutos. Analisou-se a placa no leitor de ELISA (SpectraMax M5®) por absorbância no comprimento de onda 370nm e os valores de absorbância foram analisados estatisticamente no Graphpad Prism 4.0. Os tratamentos foram comparados com o grupo controle.

Durante a realização deste experimento, a intensidade da coloração azul obtida na reação de incorporação de BrdU era progressivamente maior no decorrer do tempo entre 05 a 30 minutos. Por esse motivo, foram realizadas leituras seriadas com intervalos de 5', 10', 20' e 30 minutos entre elas para registro adequado dos valores de absorbância. O gráfico resultante dessas leituras demonstrou que o intervalo ideal de leitura se deu aos 10 minutos do surgimento da coloração inicial, quando os resultados dos tratamentos expressos nas curvas se separam. Em intervalos superiores (20' e 30') a quantidade de BrdU incorporada e consequente coloração azul aumentaram em demasiado e distorceram os resultados da leitura, ultrapassando em muito o limite de 1,0 proposto pelo kit. Vide Figura a seguir.



**Legenda:** Células B16F10 foram cultivadas numa placa 96 poços de fundo chato na concentração  $3 \times 10^3$  células/poço, tratadas e submetidas a ensaio de proliferação com melfalano e TNF- $\alpha$ , tendo-se sextuplicatas para cada grupo de tratamento. O gráfico representa a curva de incorporação de BrdU no decorrer do tempo. C= controle sem tratamento, M= melfalano 36,9 $\mu$ M, T=TNF- $\alpha$  100ng/mL MT= melfalano 36,9 $\mu$ M + TNF- $\alpha$  100ng/mL .

**Figura 4 -** Cinética de incorporação do BrdU no ensaio de proliferação. Observa-se que apenas aos 10min as curvas se separam entre o grupo controle e tratamento com TNF- $\alpha$  e a leitura da absorbância se dá de forma adequada. Intervalos de 20' e 30 minutos aumentam a intensidade da absorbância distorcendo a leitura pelo método.

#### 4.11 MEIO CONDICIONADO PELAS LINHAGENS B16F10, MDMEC E IC-21

Conforme descrito nos objetivos do projeto, foram realizados ensaios de citotoxicidade em meio condicionado por cada uma das linhagens celulares disponíveis, a fim de avaliar como substâncias produzidas por cada linhagem modificariam o padrão de citotoxicidade obtido com meio DMEM padrão suplementado com soro bovino a 10% (DMEM+SBF10%).

Para preparo do meio condicionado, células B16F10 foram cultivadas em garrafas 150T até atingirem confluência de 80%. Nesse momento, aspirou-se o meio padrão DMEM–SBF10% e adicionou-se meio novo DMEM acrescido de SBF a 2% e colocou-se a garrafa em incubação por 24 horas. A utilização de soro bovino fetal a 2% visou diminuir a quantidade de fatores de crescimento exógenos no meio, permitindo que fatores produzidos diretamente pela linhagem pudessem ser avaliados.

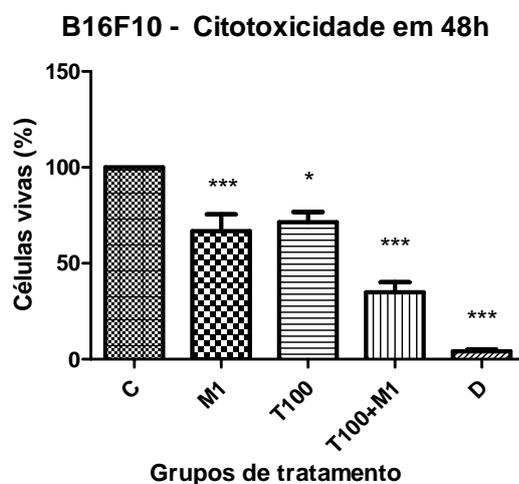
Após o período de 24 horas, aspirou-se o meio condicionado pelas células B16F10, filtrou-se (filtro 22 $\mu$ m) e o armazenou em freezers -80°C para posterior uso nos ensaios de citotoxicidade e de expressão gênica. O mesmo protocolo foi utilizado para obtenção de meio condicionado nas demais linhagens (MDMEC e IC-21).

Foi testado também o condicionamento de meio DMEM sem suplementação com soro bovino fetal, ou seja, DMEM puro, todavia, após 24 horas, todas as células do cultivo encontravam-se mortas, inviabilizando a condicionamento de DMEM sem soro, mantendo-se, então, a suplementação com SBF 2%.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE E PADRONIZAÇÃO DE DOSE DE MELFALANO E TNF-ALPHA

Para avaliação da citotoxicidade do melfalano e TNF-alpha utilizaram-se células de melanoma B16F10. Após 48 horas evidenciamos efeito citotóxico significativo ( $p < 0,05$ ) com as doses de melfalano  $36,9\mu\text{M}$ , TNF-alpha  $100\text{ng/mL}$  e a combinação melfalano  $36,9\mu\text{M}$  e TNF-alpha  $100\text{ng/mL}$  ( $p < 0,05$ ), conforme resultado a seguir.



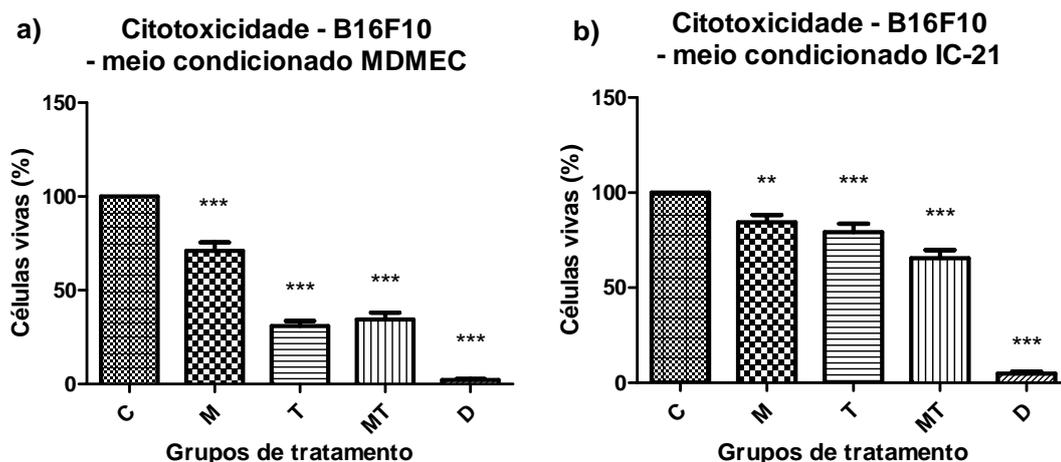
**Legenda:** Células B16F10 foram cultivadas numa placa 96 poços de fundo chato na concentração  $3,0 \times 10^3$  células/poço e em sextuplicata para cada grupo de tratamento. O gráfico representa o resultado de 3 ensaios. C = grupo controle; M1 = melfalano  $36,9\text{nM}$ ; T100 = TNF-alpha  $100\text{ng/mL}$ ; D = doxorrubicina  $1,0\mu\text{g/mL}$ ;  $*=p < 0,05$ ;  $***= p < 0,001$ . Os tratamentos foram comparados com o grupo controle (sem tratamento). A percentagem de células vivas foi estimada pela razão entre a absorbância obtida nas amostras dos grupos de tratamento e a absorbância das amostras controle.

**Figura 5** - Observa-se atividade citotóxica importante e significativa com as doses de melfalano =  $36,9\text{nM}$ , TNF-alpha =  $100\text{ng/mL}$  e a combinação de ambas.

## **5.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE COM MELFALANO E TNF-ALPHA UTILIZANDO-SE MEIO DMEM CONDICIONADO**

Avaliamos o padrão de citotoxicidade das drogas melfalano e TNF-alpha, utilizando os meios condicionados pelas linhagens MDMEC e IC-21, obtidos como descrito no tópico 4.6 da metodologia.

Para cada meio condicionado testado, realizamos ao menos 02 experimentos isolados, para garantir a reprodutibilidade dos ensaios. Quando tratamos as células B16F10 em meio condicionado por células MDMEC, evidenciamos uma modificação importante do padrão de toxicidade apresentado quando cultivadas em meio DMEM+SBF10%. Embora mantida a significância da atividade citotóxica das drogas testadas, observamos maior citotoxicidade do TNF-alpha, representada pelo menor número de células viáveis após 48 horas (Figura 6-a). Avaliamos também o comportamento das células B16F10 quando tratadas com meio condicionado por células de macrófago (IC-21). Em comparação às células crescidas em meio DMEM+SBF10%, foi mantida a citotoxicidade de todas as drogas, mas com maior proporção de células viáveis após 48 horas de tratamento com melfalano e TNF-alpha, conferindo uma aparente resistência ao efeito das drogas (Figura 6-b). A diferença provavelmente não se deve à menor concentração de SBF no meio condicionado, uma vez que observamos efeitos distintos com meio condicionado por IC-21 e MDMEC.



**Legenda:** Células B16F10 foram cultivadas numa placa 96 poços fundo chato na concentração  $3 \times 10^3$  células/poço e em sextuplicata para cada grupo de tratamento. O gráfico representa o resultado de 02 ensaios isolados. A percentagem de células vivas foi estimada pela razão entre a absorbância obtida nas amostras dos grupos de tratamento e a absorbância das amostras controle. C = grupo controle, M = melfalano  $36,9 \mu\text{M}$ , T = TNF- $\alpha$   $100 \text{ng/mL}$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ .

**Figura 6** - Ensaio de citotoxicidade em células B16F10 com os meios condicionados por células MDMEC e IC-21. Em **a)** o resultado dos ensaios de citotoxicidade com meio condicionado por MDMEC, onde se observa atividade citotóxica todas as drogas testadas e com maior intensidade para o TNF- $\alpha$  quando comparada com meio DMEM+SBF10%. Em **b)**, o resultado dos ensaios de citotoxicidade com meio condicionado por IC-21, onde se evidencia atividade citotóxica significativa de todas as drogas testadas, mas em menor proporção quando comparada com meio DMEM+SBF10%.

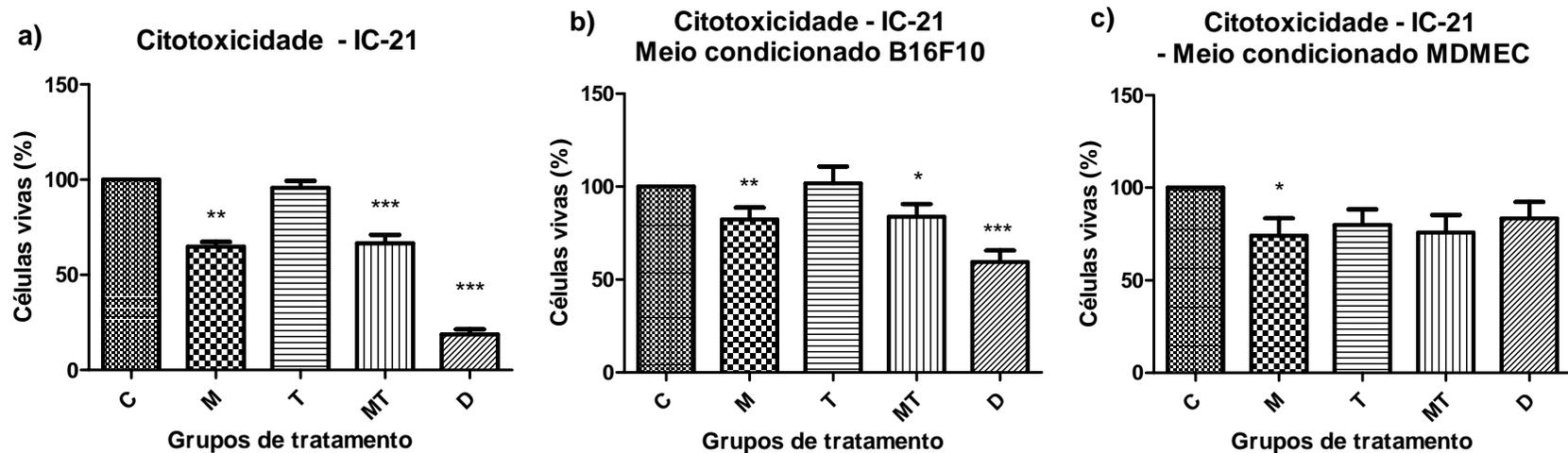
Realizamos também os ensaios de citotoxicidade com as linhagens de célula endotelial de camundongo (MDMEC) e macrófago murino (IC-21). Inicialmente, verificamos o perfil de citotoxicidade do melfalano e TNF- $\alpha$  com células cultivadas em meio DMEM+SBF10% e, posteriormente, com meio condicionado. Para cada linhagem e meio utilizados foram realizados pelo menos 03 ensaios, a fim de fortalecer os achados experimentais.

Para a linhagem de macrófago murino (IC-21) (Figura 7), observamos um padrão de citotoxicidade diferente das células de melanoma B16F10 (Figura 5), com perda da atividade citotóxica do TNF- $\alpha$ . Quando tratadas em meio condicionado

houve diminuição do efeito citotóxico da associação das drogas melfalano e TNF-alpha, assim como da atividade da doxorrubicina, embora ainda mantendo a significância estatística. Quando cultivadas em meio condicionado por MDMEC, observamos atividade citotóxica apenas para o grupo melaflano 36,9  $\mu$ M com perda da atividade da doxorrubicina, do TNF-alpha 100ng/mL e da associação de TNF-alpha e melfalano, como demonstrado na Figura 7.

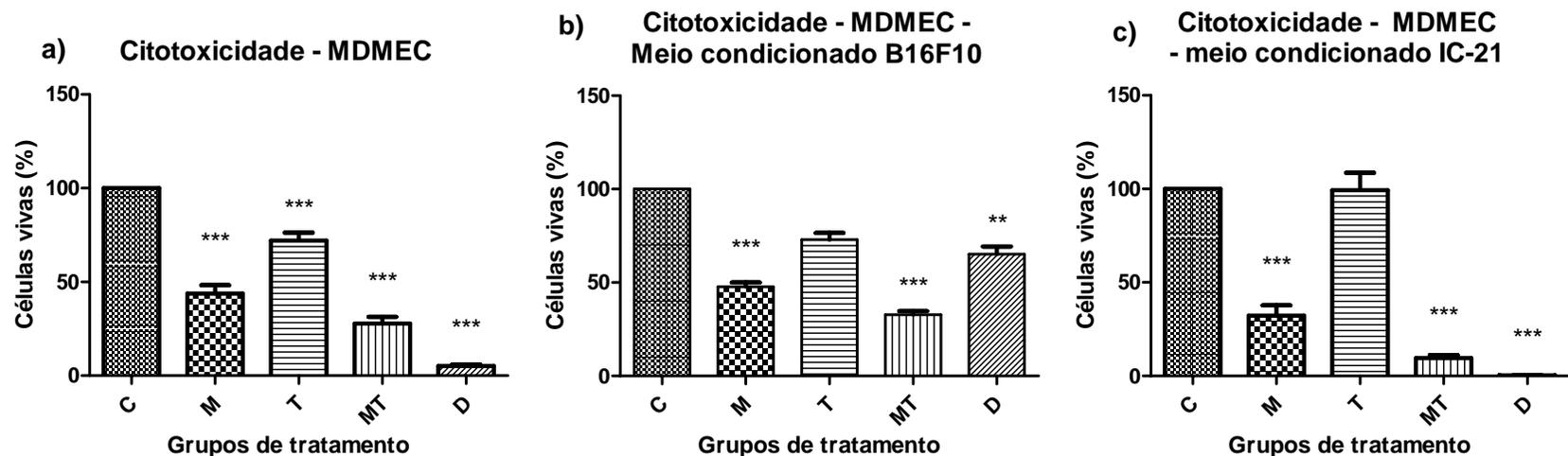
Repetimos o experimento descrito anteriormente para a linhagem de células endoteliais MDMEC. Para essas células, observamos atividade citotóxica significativa associada ao tratamento com melfalano 36,9 $\mu$ M, TNF-alpha 100ng/mL e de melfalano + TNF-alpha quando em meio DMEM+SBF10%. Comparativamente, quando cultivadas em meio condicionado por células B16F10, verificamos a manutenção da atividade citotóxica do melfalano, mas houve perda da atividade de TNF-alpha 100ng/mL isoladamente, além de relevante diminuição da citotoxicidade da doxorrubicina. Quando tratadas com meio condicionado por células IC-21, temos um padrão semelhante ao do obtido com meio condicionado por B16F10, com perda da citotoxicidade do TNF-alpha (Figura 8), mas se mantendo a citotoxicidade das demais drogas.

Apresentamos, após as Figuras 7 e 8, o Quadro com os resultados de citotoxicidade obtidos nas linhagens B16F10, MDMEC e IC-21, quanto cultivadas em meio DMEM+SBF10% e em meio condicionado, a fim de facilitar a análise e entendimento dos resultados já descritos.



**Legenda:** Células IC-21 foram cultivadas em placa 96 poços fundo chato na concentração  $3 \times 10^3$  células/200 $\mu$ L/poço em sextuplicatas para cada grupo de tratamento. Cada gráfico representa o resultado de 03 ensaios. A percentagem de células vivas foi estimada pela razão entre a absorbância obtida nas amostras dos grupos de tratamento e a absorbância das amostras controle. C = grupo controle; M = melfalano 36,9 $\mu$ M; T = TNF-alpha 100ng/mL; MT= melfalano 36,9 $\mu$ M + TNF-alpha 100ng/mL; D = doxorrubicina 1,0 $\mu$ g/mL \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ .

**Figura 7** - Ensaio de citotoxicidade com MTT em células IC-21 em meio DMEM+SBF10%, DMEM condicionado por B16F10 e por MDMEC. Em **a)** evidencia-se atividade citotóxica apenas com melfalano e a associação melfalano e TNF-alpha, além da doxorrubicina, em células IC-21 com meio DMEM+SBF10%; em **b)**, observa-se diminuição da atividade citotóxica das drogas nas células IC-21 quando em meio DMEM condicionado B16F10, embora ainda significativa; em **c)** quando tratadas em meio condicionado por MDMEC, a atividade citotóxica é mantida apenas no grupo de tratamento com melfalano.



**Legenda:** Células endoteliais MDMEC foram distribuídas numa placa de 96 poços na concentração  $3 \times 10^3$  células por poço e submetidas a ensaio de citotoxicidade com melfalano e TNF-alpha, tendo-se sextuplicatas para cada grupo de tratamento. Cada gráfico representa o resultado de 03 ensaios. A percentagem de células vivas foi estimada pela razão entre a absorbância obtida nas amostras dos grupos de tratamento e a absorbância das amostras controle. C = controle sem tratamento, M = melfalano  $36,9 \mu\text{M}$ , T = TNF-alpha  $100 \text{ng/mL}$ , MT = melfalano  $36,9 \mu\text{M}$  + TNF-alpha  $100 \text{ng/mL}$  e D = doxorubicina  $1,0 \mu\text{g/mL}$ . \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

**Figura 8** - Após avaliação em 48 horas. Em **a)** o ensaio de citotoxicidade de células MDMEC com meio DMEM+SBF10% demonstrando atividade significativa para todos os tratamentos, com efeito citotóxico menor do TNF-alpha, quando comparado ao melfalano ou à associação melfalano+TNF-alpha. Em **b)** ensaio com meio DMEM condicionado B16F10: observa-se perda da atividade citotóxica de TNF-alpha e diminuição do efeito da doxorubicina, embora ainda significativo e, em **c)**, ensaio com meio condicionado por IC-21, onde se observou a perda da citotoxicidade do TNF-alpha, mas se preservando a citotoxicidade das demais drogas.

A seguir o Quadro representa padrões de citotoxicidade observados nas diferentes linhagens em meio DMEM+SBF10% e em meio condicionado.

**Quadro 6** - Padrões de citotoxicidade observados nos cultivos em monocamada com meio DMEM+SBF10% e meio condicionado.

B16F10 monocamada								
DMEM+SBF10%			Meio MDMEC			Meio IC-21		
M	T	MT	M	T	MT	M	T	MT
++	+	+++	++	+++	+++	+	+	++
MDMEC monocamada								
DMEM+SBF10%			Meio B16F10			Meio IC-21		
M	T	MT	M	T	MT	M	T	MT
+++	++	+++	+++	0	+++	+++	0	+++
IC-21 monocamada								
DMEM+SBF10%			Meio B16F10			Meio MDMEC		
M	T	MT	M	T	MT	M	T	MT
++	0	+++	++	0	+	+	0	0

**Legenda:** *Tratamentos:* M = melfalano 36,9nM; T= TNF-alpha 100ng/mL; MT=associação de melfalano e TNF-alpha. *Intensidade do efeito citotóxico:* 0 = sem efeito estatisticamente significativo, + menor efeito citotóxico e +++ maior efeito citotóxico.

### 5.3 CITOTOXICIDADE COM MELFALANO E TNF-ALPHA EM ESFERÓIDES

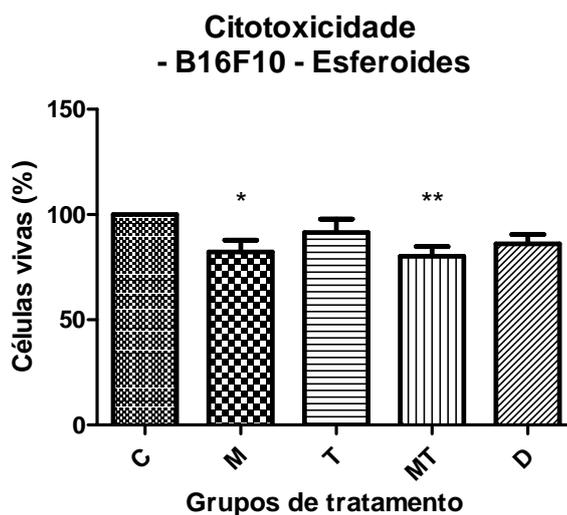
Utilizamos, para este ensaio, esferóides de B16F10 obtidos conforme protocolo descrito anteriormente (gel de agarose LMP 1%) e as doses estabelecidas nos ensaios de citotoxicidade de doxorrubicina 1,0µg/mL, melfalano 36,9µM (M), TNF-alpha 100ng/mL (T) e ambos (M+T) em 48horas.

Preparamos 01 placa de 96 poços, contendo 02 sextuplicatas para cada tratamento testado e para o controle, distribuindo meio DMEM+SBF10% contendo cada um dos 04 tratamentos acima referidos num volume de 160 $\mu$ L/poço. Assim, tínhamos 60 poços preenchidos na placa, contabilizando o grupo controle. Utilizando ponteiros p200 com a ponta cortada com bisturi para aumentar o diâmetro da ponteira e facilitar a captura dos esferóides, aspiramos os esferóides no volume de 40 $\mu$ L e os transferimos cautelosamente para os poços da placa contendo os tratamentos, sempre dispondo de 01 esferoide por poço/tratamento. Após transferência, completávamos, assim, os 200 $\mu$ L de volume final dos tratamentos padronizados no ensaio de citotoxicidade em monocamada e colocamos a placa na estufa por 48h.

Após 48 horas de incubação com as drogas, aspiramos cautelosamente os meios dos poços com uma ponteira p200 conectada a um aspirador a vácuo. Agora, substituímos os tratamentos por 200 $\mu$ L/poço de meio novo contendo MTT 50 $\mu$ g/mL e incubamos a placa por mais 3 horas. Em seguida, centrifugamos novamente a placa a 1000g por 05 minutos, aspiramos o meio contendo o MTT, e adicionamos DMSO 200 $\mu$ L/poço. Nesse momento, com a solubilização dos cristais formazan produzidos pelas células viáveis e o aparecimento da coloração azul típica do método, realizamos a leitura da placa no espectrofotômetro (Spectramax M5) no comprimento de onda 540nm. Os dados numéricos obtidos foram submetidos à análise estatística pelo programa GraphPrism 4.0.

Após análise estatística, foi evidenciada atividade citotóxica apenas de melfalano 36,9 $\mu$ M e da associação melfalano e TNF-alpha 100ng/mL nos esferóides da linhagem B16F10. Interessantemente, houve perda da atividade citotóxica de TNF-alpha 100ng/mL isoladamente e da doxorubicina (Figura 9), fato não

observado quando as células B16F10 foram cultivadas em monocamada. Além disso, a intensidade da atividade citotóxica do melfalano foi reduzida, quando comparada aos resultados obtidos das culturas em monocamada.



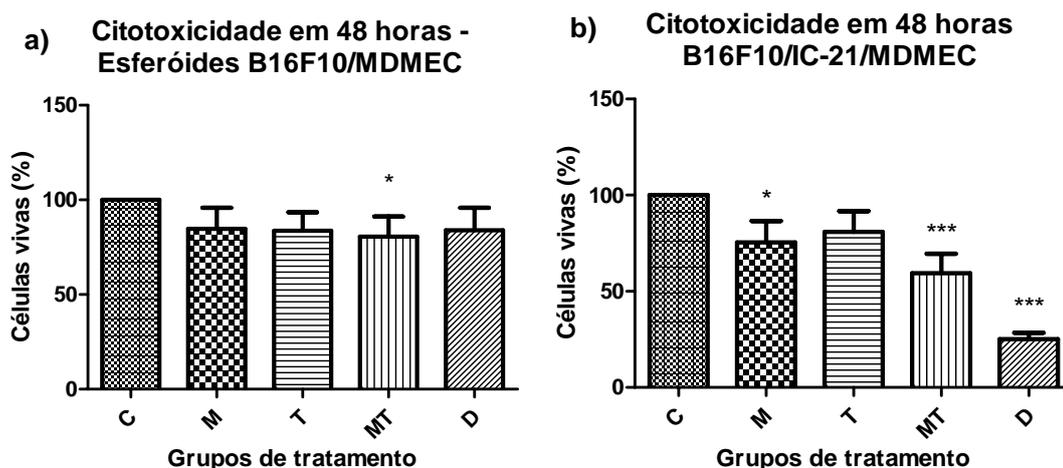
**Legenda:** Células de melanoma murino B16F10 foram cultivadas em placa 96 poços fundo chato, preparada com gel de agarose LMP 1% 100 $\mu$ L/well, na concentração 3,0x10<sup>3</sup> células/poço. Após 07 dias, os esferóides formados foram transferidos para uma placa nova contendo os tratamentos, sendo cada grupo em sextuplicata. O gráfico representa o resultado de 03 ensaios. A porcentagem de células vivas foi estimada pela razão entre a absorbância obtida nas amostras dos grupos de tratamento e a absorbância das amostras controle. C = grupo controle; M = melfalano 36,9 $\mu$ M; T = TNF-alpha 100ng/mL, MT = ambos e D = Doxorrubicina 1,0 $\mu$ g/mL. \* = p<0,05; \*\*=p<0,01.

**Figura 9** - Citotoxicidade em esferóides B16F10. Os tratamentos foram comparados com o grupo controle. Observa-se que melfalano isoladamente possui atividade citotóxica significativa e que essa parece ser potencializada pela associação com Tfn $\alpha$ , embora ambas proporcionalmente menores que as observadas nos cultivos em monocamada. TNF-alpha isoladamente não apresentou atividade citotóxica significativa, assim como a doxorrubicina.

Após avaliação da citotoxicidade dos esferóides de B16F10, buscamos avaliar o padrão de citotoxicidade das drogas, utilizando os esferóides de MDMEC. Porém, os esferóides de MDMED revelaram-se diminutos e difíceis de manipular, dificultando a transferência dos mesmos para as placas dos ensaios de citotoxicidade.

Com o insucesso dos experimentos de citotoxicidade com esferóides MDMEC, esses foram excluídos da análise.

Procedemos, então, os ensaios de citotoxicidade com esferóides mistos (coculturas tridimensionais) compostos com as linhagens B16F10, MDMEC e IC-21. Não experimentamos problemas para realização dos ensaios, no que tange a captura dos esferóides, pois esses apresentaram crescimento adequado após estabelecimento dos mesmos. Tivemos como resultados que os esferóides compostos pelas linhagens B16F10 e MDMEC apresentaram importante diminuição da atividade citotóxica das drogas testadas (melfalano 36,9 $\mu$ M, TNF-alpha 100ng/mL e doxorrubicina 1,0 $\mu$ g/mL), havendo citotoxicidade significativa apenas para a associação melfalano e TNF-alpha (Figura 10a). Para os esferóides compostos pelas três linhagens, evidenciamos atividade citotóxica significativa quando tratados com melfalano e melfalano + TNF-alpha, diferindo do perfil apresentado nos esferóides com as linhagens duas linhagens (B16F10/MDMEC). Observou-se também atividade citotóxica significativa com a doxorrubicina, o que não ocorreu nos demais ensaios com esferóides (Figura 10b).



**Legenda:** Células das linhagens B16F10 (melanoma), MDMEC (células endotelial) e IC-21 (macrófago murino), foram distribuídas nos aros da tampa de uma placa de 96 poços na concentração de  $3 \times 10^3$  células ressuspensas em 20mL de meio DMEM por aro/poço, obedecendo a proporcionalidade entre cada uma das linhagens. Cultivadas por 03 dias, obtiveram-se esferóides com as linhagens B16F10/MDMEC e com as linhagens B16F10/MDMEC/IC-21. Os gráficos representam o resultado de 03 ensaios. A percentagem de células vivas foi estimada pela razão entre a absorbância obtida nas amostras dos grupos de tratamento e a absorbância das amostras controle. C = grupo controle; M = melfalano 36,9 $\mu$ M; T = TNF-alpha 100ng/mL, MT = melfalano+TNF-alpha e D = Doxorubicina 1,0 $\mu$ g/mL. \* =  $p < 0,05$ ; \*\*\*= $p.001$ .

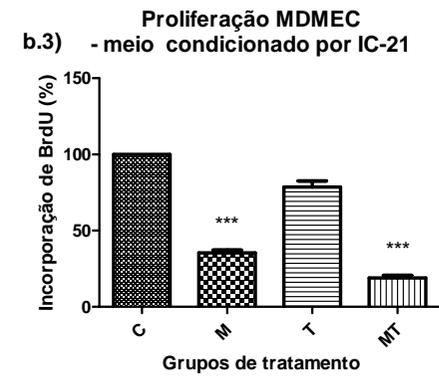
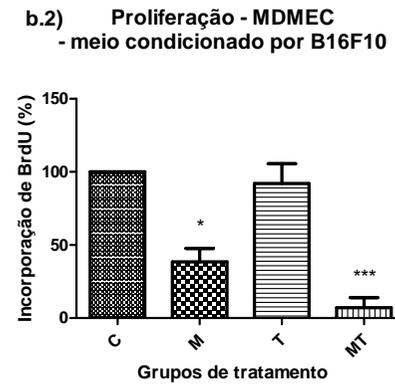
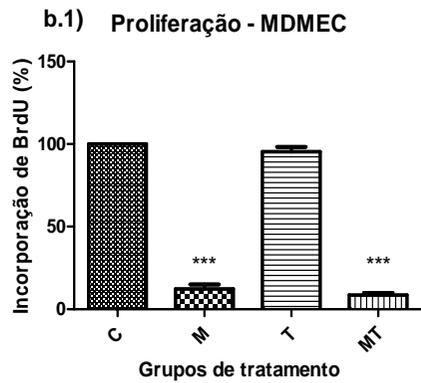
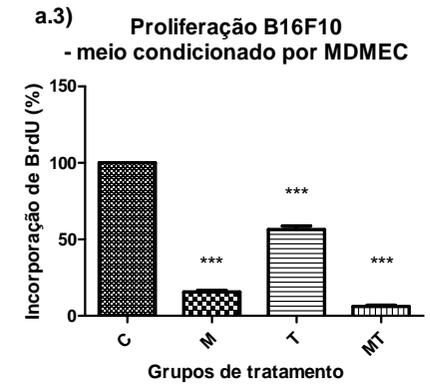
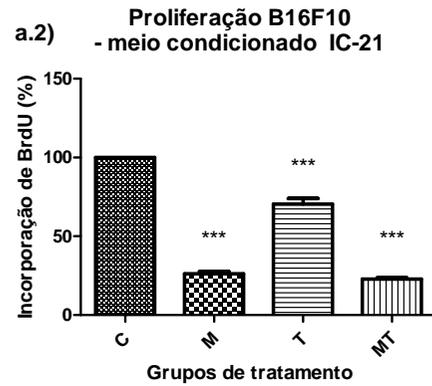
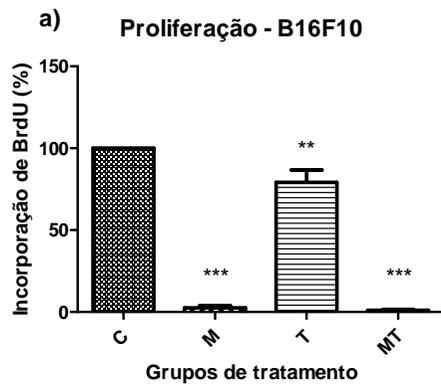
**Figura 10** - Citotoxicidade em esferóides mistos com duas linhagens B16F10/MDMEC e com três linhagens B16F10/MDMEC/IC-21. Os tratamentos foram comparados com o grupo controle. Em **a)**, ensaio de citotoxicidade com esferóides compostos por células B16F10/MDMEC: evidencia-se atividade citotóxica significativa apenas para a combinação de melfalano e TNF-alpha. Em **b)** Ensaio de citotoxicidade com esferóides compostos por células B16F10/MDMEC/IC-21: observa-se que melfalano isoladamente possui atividade citotóxica significativa e que essa parece ser potencializada pela associação com Tfn. A doxorubicina também apresentou atividade citotóxica significativa. TNF-alpha isoladamente não apresentou atividade citotóxica significativa.

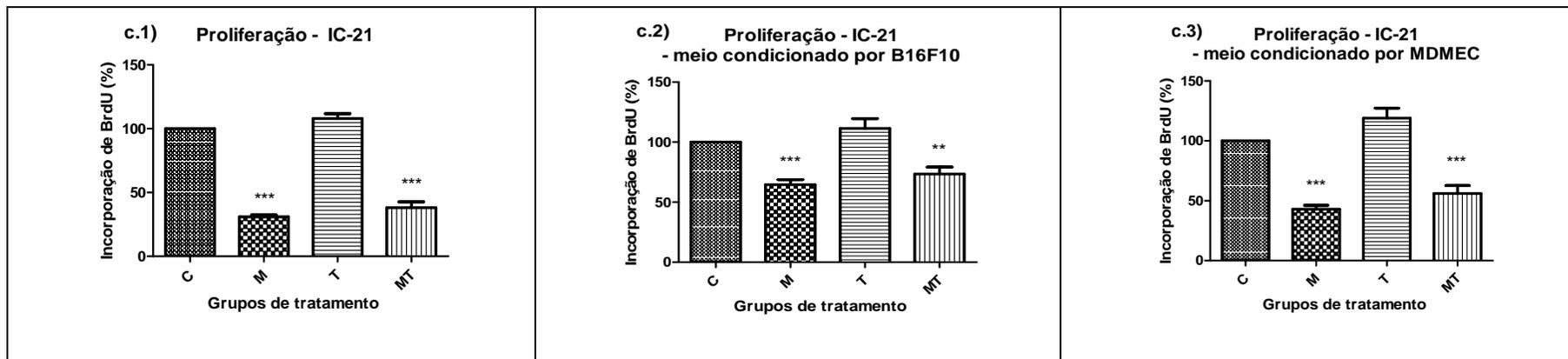
#### 5.4 AVALIAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO APÓS OS TRATAMENTOS COM MELFALANO E TNF-ALPHA

Seguimos para os ensaios de proliferação com as linhagens B16F10, MDMEC e IC-21 utilizando-se meio padrão e os meios condicionados por cada uma das linhagens. Observamos importante inibição da proliferação nas células tratadas

com melfalano 36,9 $\mu$ M e com a associação melfalano e TNF-alpha 100ng/mL. TNF-alpha isoladamente apresentou inibição significativa apenas para a linhagem B16F10 e essa inibição pareceu proporcionalmente maior no meio condicionado por células endoteliais, como representado na Figura 11(a1, a2 e a3). Para as células endoteliais manteve-se a inibição da proliferação pelos tratamentos contendo melfalano, conforme o que foi verificado para o melanoma, mas não foi vista inibição da proliferação pelo TNF-alpha (Figura 11: b1, b2 e b3). No caso da linhagem de macrófagos (IC-21), o TNF-alpha pareceu produzir um efeito de estímulo à proliferação quando comparado com o grupo controle, embora não significativo, além de modificar o padrão de resposta da associação de drogas melfalano e TNF-alpha com menor inibição de proliferação, quando comparada com as demais linhagens (B16F10 e MDMEC). Vide Figura 11: c1, c2 e c3.

Dessa forma, a atividade citotóxica observada nos ensaios com MTT com as linhagens B16F10, MDMEC e IC-21, deve-se, em grande medida, à inibição de proliferação pelo melfalano e pela associação de melfalano e TNF-alpha. O TNF-alpha apresentou menor inibição nas células de melanoma e nenhuma atividade antiproliferativa significativa.



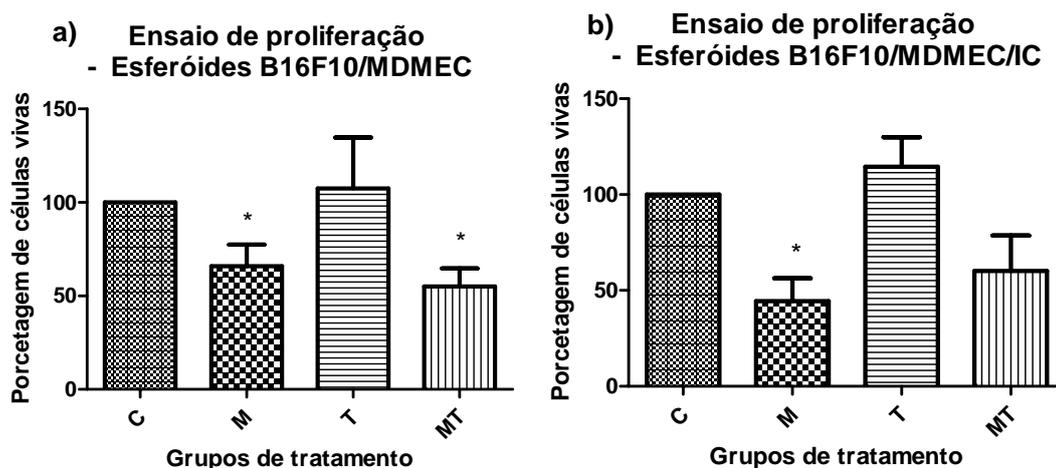


**Legenda:** Células B16F10, MDMEC e IC-2 foram cultivadas numa placa 96 poços fundo chato na concentração  $3 \times 10^3$  células/poço e submetidas a ensaio de proliferação com melfalano e TNF-alpha, tendo-se sextuplicatas para cada grupo de tratamento. Os tratamentos foram comparados com o grupo controle. Cada gráfico representa o resultado de pelo menos 02 ensaios. Para a linhagem B16F10 também foram testados os meios condicionados por MDMEC e IC-21. Para as linhagens MDMEC e IC-21 os ensaios foram realizados em meio DMEM condicionado por células B16F10 e meio DMEM condicionado por células MDMEC ou IC-21. A percentagem de células vivas foi estimada pela razão entre a absorbância obtida nas amostras dos grupos de tratamento e a absorbância das amostras controle. C = controle sem tratamento, M = melfalano  $36,9 \mu\text{M}$ , T = TNF-alpha  $100 \text{ng/mL}$  MT = melfalano  $36,9 \mu\text{M}$  + TNF-alpha  $100 \text{ng/mL}$ . \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ .

**Figura 11 -** Ensaio de proliferação com células B16F10, MDMEC e IC-21. Em **a)** ensaio de proliferação com células B16F10 evidenciando inibição importante da proliferação com os tratamentos contendo melfalano; o mesmo padrão foi observado com os meios condicionados por IC-21(**a.2**) e MDMEC (**a.3**); O TNF-alpha mostrou efeito inibitório em relação ao melfalano, todavia quando avaliamos o TNF-alpha nos meios condicionados, a inibição desse foi proporcionalmente maior no meio condicionado por MDMEC; em **b)**, ensaio de proliferação com MDMEC demonstrando atividade inibitória do melfalano e melfalano+TNF-alpha e ausência de inibição significativa pelo TNF-alpha isoladamente, padrão que se repetiu quando se utilizando meio condicionado por células B16F10 e IC-21 conforme representado em **b.2 e b.3**); em **c)** ensaio com células IC-21, revelando efeito antiproliferativo apenas do melfalano isoladamente e em combinação com TNF-alpha. Esse padrão antiproliferativo manteve-se inalterado quando se utilizou meio DMEM condicionado por células B16F10 e por células MDMEC, conforme **c.2 e c.3**.

Após resultados obtidos nos cultivos em monocamada, procedemos aos ensaios de proliferação em coculturas tridimensionais (esferóides) compostas das linhagens B16F10, MDMEC e IC-21. Para cada cocultura tridimensional testada foi realizado pelo menos 02 ensaios isolados.

Quando utilizados esferóides com linhagens B16F10/MDMEC, foi evidenciada atividade antiproliferativa semelhante à obtida com as culturas em monocamada, embora em menor intensidade, com inibição da proliferação significativa pelo melfalano 36,9 $\mu$ M e com associação de melfalano e TNF-alpha 100ng/mL, mas não com TNF-alpha isoladamente. Nas coculturas tridimensionais compostas pelas linhagens B16F10/MDMEC/IC-21, o efeito antiproliferativo foi observado apenas com melfalano isoladamente, sendo perdida a atividade observada na associação melfalano e TNF-alpha. Tal padrão difere do observado com as referidas coculturas nos ensaios de citotoxicidade com MTT, onde se revelou atividade citotóxica com melfalano isoladamente e em associação com TNF-alpha. Uma explicação possível é que a quantificação da proliferação no grupo melfalano+TNF-alpha, embora numericamente inferior, não atingiu significância talvez por maior variabilidade das amostras no ensaio (Figura 12), ou por existir, neste cenário, maior indução de apoptose direta pelo TNF como contribuinte para diminuição de viabilidade celular observada no ensaio de MTT.



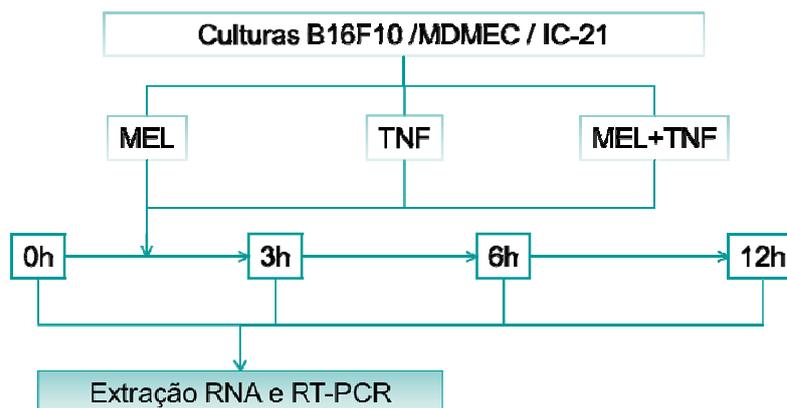
**Legenda:** Células das linhagens B16F10, MDMEC e IC-21 foram distribuídas nos aros da tampa de uma placa de 96 poços na concentração de  $3,0 \times 10^3$  células ressuspensas em  $20 \mu\text{L}$  de meio DMEM por aro/poço, obedecendo a proporcionalidade entre cada uma das linhagens e cultivadas por 3 dias, obtendo-se, assim, esferóides com as linhagens B16F10/MDMEC e com as linhagens B16F10/MDMEC/IC-21. Os gráficos representam o resultado de pelo menos 02 ensaios. A porcentagem de células vivas foi estimada pela razão entre a absorbância obtida nas amostras dos grupos de tratamento e a absorbância das amostras controle. C = grupo controle; M = melfalano  $36,9 \mu\text{M}$ ; T = TNF- $\alpha$   $100 \text{ng/mL}$ , MT = melfalano+TNF- $\alpha$ . \* =  $p < 0,05$ .

**Figura 12** - Ensaio de proliferação com esferóides de células B16F10, MDMEC e IC-21. Em **a)** ensaio de proliferação com esferóides mistos B16F10/MDMEC demonstrando inibição da proliferação celular nos tratamentos melfalano  $36,9 \mu\text{M}$  isolado e em associação com TNF- $\alpha$   $100 \text{ng/mL}$ ; em **b)**, ensaio com esferóides mistos B16F10/MDMEC/IC-21 revelando atividade antiproliferativa significativa apenas para o grupo tratado com melfalano, embora também se observe inibição da proliferação com a associação melfalano+TNF- $\alpha$ , mas não significativa.

## 5.5 CINÉTICA DE EXPRESSÃO GÊNICA EM RESPOSTA AOS TRATAMENTOS COM MELFALANO E TNF-ALPHA

Realizamos os experimentos de cinética de expressão gênica dos cultivos de células B16F10, MDMEC e IC-21 em monocamada em placas 60mm, utilizando meio suplementado com SBF10% e os meios condicionados; e também as culturas tridimensionais, submetendo-as aos tratamentos com melfalano  $36,9 \mu\text{M}$ , TNF- $\alpha$   $100 \text{ng/mL}$  e melfalano + TNF- $\alpha$  nos tempos 15 minutos, 3 horas, 6 horas e 12

horas e comparando-os com os controles. Dessa forma, tínhamos, para cada linhagem, tipo de cultivo (monocamada ou tridimensional) e meio utilizado, 16 grupos avaliados (04 grupos em 04 tempos), como exemplificado no diagrama a seguir.

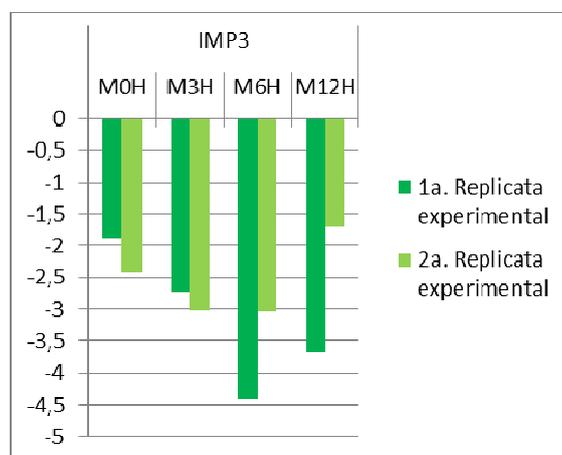
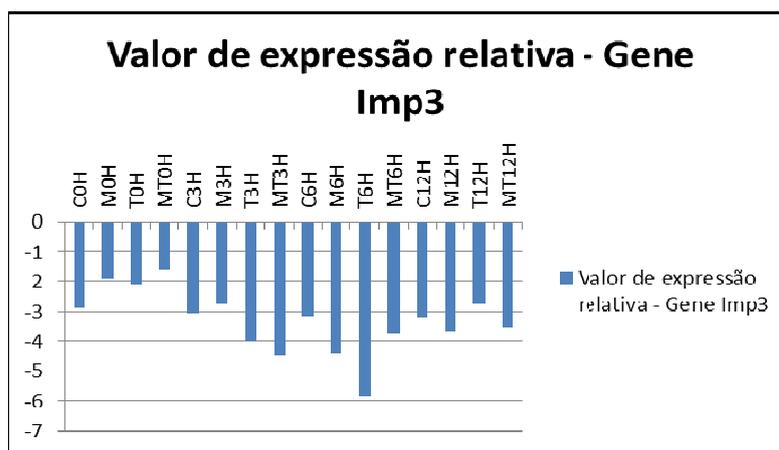


**Figura 13** - Diagrama dos experimentos de cinética de expressão

Avaliamos o perfil da expressão gênica das amostras das células B16F10 em monocamada primeiramente. Todos os genes alvos foram testados, assim como os genes referência selecionados. Procedemos, no mínimo, 02 experimentos isolados de cinética de expressão, para cada linhagem analisada, e com as respectivas reações de *real-time* PCR, objetivando uma verificação mais acurada e consistente dos resultados. Os genes que apresentassem CT maior que 35, foram considerados como de expressão muito baixa ou inexistente.

As etapas de tratamento das culturas, extração de RNA total, transcrição reversa do DNA molde e *real-time* PCR, seguiram as metodologias descritas nos tópicos de metodologia.

Para os 02 experimentos de cinética de expressão gênica realizados com células B16F10 cultivadas em monocamada, não evidenciamos a expressão dos genes *Argef6*, *Ifi202b* e *Flt1*. O gene *Imp3* apresentou expressão bastante variável entre os grupos de tratamento avaliados (Figura 14). Apesar disso, identificamos que o tratamento com melfalano inibiu a expressão entre 3 horas e 6 horas de exposição.

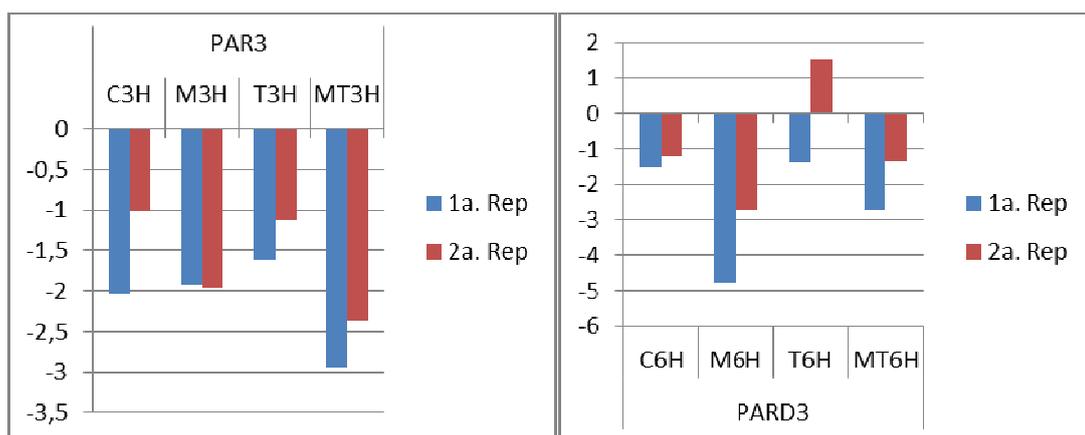


**Legenda:** Células B16F10 foram cultivadas em monocamada num total de  $10 \times 10^5$  células por placa de 60mm e tratadas com as melfalano  $36,9 \mu\text{M}$ , TNF-alpha  $100 \text{ng}/\text{mL}$  e melfalano+TNF-alpha durante os tempos 0h (15 minutos), 3h, 6h e 12h e, posteriormente, realizada avaliação da expressão gênica por real-time PCR. (C=grupo controle, M=melfalano, T=TNF-alpha e MT= melfalano+TNF-alpha, 0h = 15' de exposição, 3h= 3 horas de exposição, 6h= 6 horas de exposição e 12h= 12 horas de exposição). Os valores de expressão relativa foram comparados entre os tratamentos e os controles e entre os tratamentos entre si.

**Figura 14** - O gráfico representa os valores de expressão relativa do gene *Imp3*. Observa-se expressão diminuída do gene em todos os tratamentos e controles, de forma variável, porém o tratamento com melfalano inibiu a expressão do gene a partir entre 3 e 6 horas de tratamento.

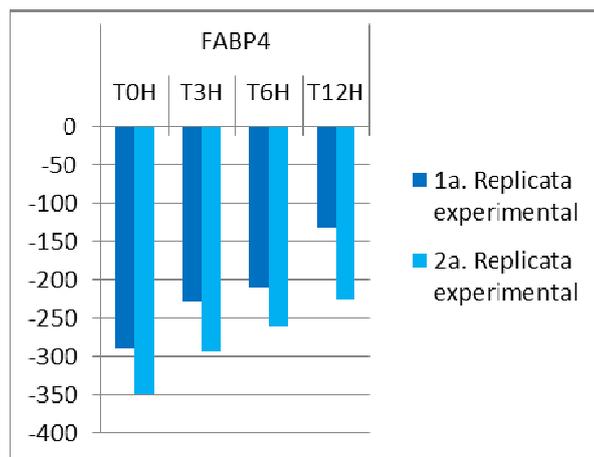
Para o gene *Pard3* observamos modificação do padrão de expressão das amostras de B16F10 em monocamada tratadas com melfalano isoladamente e em associação com TNF- $\alpha$  com inibição da expressão do referido gene iniciando-se após o tempo 3 horas, com expressão relativa (ER)  $>1,5$ . Esse efeito é permanente e se potencializa após 6 horas de exposição ao tratamento (ER  $>2,5$ ) (Figura 15).

O gene *Fabp4* apresentou baixa expressão nas células B16F10 cultivadas em monocamada, mas observamos modificação da cinética de expressão quando estas foram tratadas com TNF- $\alpha$  100ng/mL no decorrer dos tempos estudados (Figura 16), com aumento progressivo da expressão do referido gene.



**Legenda:** Células B16F10 foram cultivadas em monocamada num total de  $10 \times 10^5$  células por placa de 60mm, tratadas com as melfalano 36,9 $\mu$ M, TNF- $\alpha$  100ng/mL e melfalano+TNF- $\alpha$  durante os tempos 0h (15 minutos), 3h, 6h e 12h e posteriormente realizada avaliação da expressão gênica por real-time PCR. Os valores de expressão relativa foram comparados entre os tratamentos e os controles e entre os tratamentos entre si. (C = Grupo controle, M = melfalano 36,9 $\mu$ M, T = TNF- $\alpha$  100ng/mL, MT= melfalano + TNF- $\alpha$ , 0h = 15' de exposição, 3h= 3 horas de exposição, 6h= 6 horas de exposição e 12h= 12 horas de exposição, 1<sup>a</sup> Rep= 1<sup>a</sup> replicata experimental, 2<sup>a</sup> Rep= 2<sup>a</sup> replicata experimental).

**Figura 15** - O gráfico representa o perfil de expressão relativa de 02 experimentos de cinética de expressão para o gene *Pard3* após 3 horas e após 6 horas de tratamento. Observa-se diminuição da expressão do gene no grupo tratado com melfalano 36,9 $\mu$ M isoladamente e em associação com TNF- $\alpha$  100ng/mL.

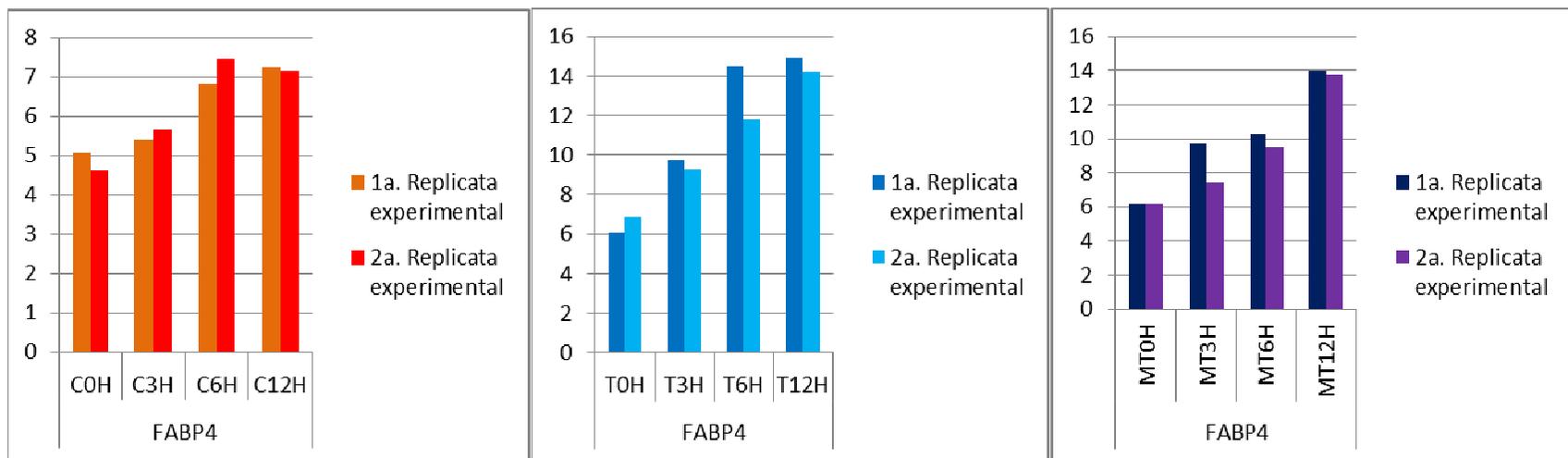


**Legenda:** Células B16F10 foram cultivadas em monocamada num total de  $10 \times 10^5$  células por placa de 60mm, tratadas com as melfalano  $36,9 \mu\text{M}$ , TNF-alpha  $100 \text{ng/mL}$  e melfalano+TNF-alpha durante os tempos 0h (15 minutos), 3h, 6h e 12h e posteriormente realizada avaliação da expressão gênica por real-time PCR. Os valores de expressão relativa foram comparados entre os tratamentos e os controles e entre os tratamentos entre si. (T = TNF-alpha  $100 \text{ng/mL}$ , 0h = 15' de exposição, 3h= 3 horas de exposição, 6h= 6 horas de exposição e 12h= 12 horas de exposição).

**Figura 16** - O gráfico representa o perfil de expressão relativa de 02 experimentos de cinética de expressão para o gene Fabp4. Observa-se aumento progressivo da expressão do referido gene no decorrer do tempo.

Prosseguimos com os experimentos de cinética de expressão gênica e real-time PCR com a linhagem de células endoteliais (MDMEC) cultivadas em monocamada. Não foi observada expressão consistente dos genes Arhgef6 e Ifi202b.

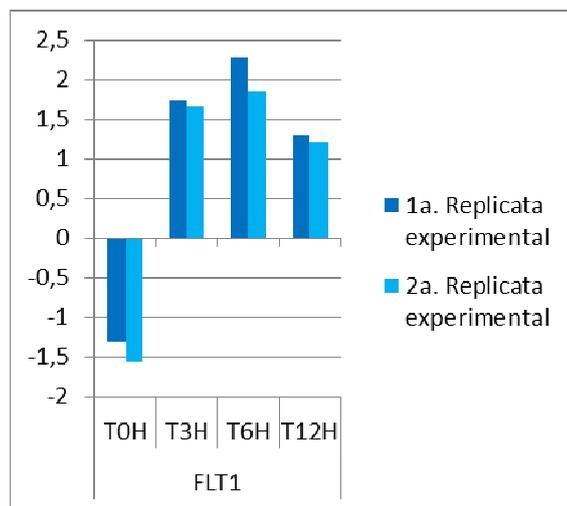
Na linhagem MDMEC cultivada em monocamada, o gene Fabp4 apresentou aumento da expressão no decorrer do tempo de cultivo de 15 minutos (0h) à 12 horas com meio DMEM+SBF10% suplementado nos controles sem drogas, aparentando sofrer influência do fatores de crescimento endotelial presentes no meio suplementado. Observamos que os tratamentos com TNF-alpha  $100 \text{ng/mL}$  e melfalano  $36,9 \mu\text{M}$  associado com TNF-alpha  $100 \text{ng/mL}$  potencializaram esse efeito de aumento de expressão do gene (Figura 17).



**Legenda:** Células MDMEC foram cultivadas em monocamada num total de  $10 \times 10^5$  células por placa de 60mm e tratadas com as melfalano  $36,9 \mu\text{M}$ , TNF-alpha  $100 \text{ng/mL}$  e melfalano+TNF-alpha durante os tempos 0h (15 minutos), 3h, 6h e 12h e posteriormente realizada avaliação da expressão gênica por real-time PCR. (C= Controle, T=TNF-alpha e MT= melfalano+TNF-alpha, 0h = 15' de exposição, 3h= 3 horas de exposição, 6h= 6 horas de exposição e 12h= 12 horas de exposição). Os valores de expressão relativa foram comparados entre os tratamentos e os controles e entre os tratamentos entre si.

**Figura 17 -** O gráfico representa o perfil de expressão relativa de 02 experimentos de cinética de expressão para o gene Fabp4. Observa-se aumento progressivo da expressão do referido gene no decorrer do tempo nos tratamentos contendo TNF-alpha (TNF-alpha e melfalano+TNF-alpha).

Quando avaliamos o gene *Flt1*, evidenciamos que o tratamento com TNF-alpha 100ng/mL modificou a cinética de expressão, com aumento da expressão do gene nos tempos 3h e 6h e diminuição da expressão após 12 horas (Figura 18).



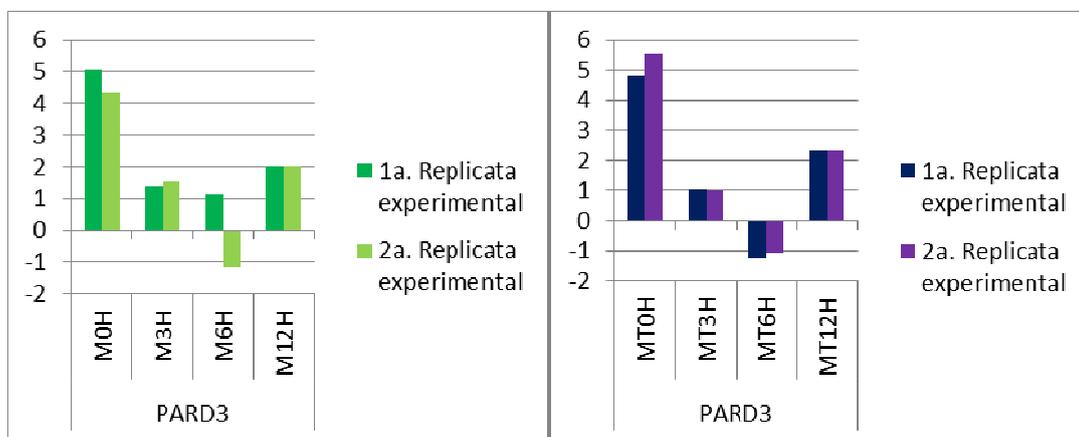
**Legenda:** Células MDMEC foram cultivadas em monocamada num total de  $10 \times 10^5$  células por placa de 60mm e tratadas com as melfalano 36,9 $\mu$ M, TNF-alpha 100ng/mL e melfalano+TNF-alpha durante os tempos 0h (15 minutos), 3h, 6h e 12h e posteriormente realizada avaliação da expressão gênica por real-time PCR. (T=TNF-alpha, 0h = 15' de exposição, 3h= 3 horas de exposição, 6h= 6 horas de exposição e 12h= 12 horas de exposição). Os valores de expressão relativa foram comparados entre os tratamentos e os controles e entre os tratamentos entre si.

**Figura 18** - O gráfico representa o perfil de expressão relativa de 02 experimentos de cinética de expressão para o gene *Flt1*. Observa-se aumento progressivo da expressão do referido gene nos tempo 3h e 6h e diminuição da expressão após 12h.

Em culturas MDMEC em monocamada, o gene *Pard3* teve cinética de expressão modificada pelos tratamento com melfalano 36,9 $\mu$ M isoladamente e em associação com TNF-alpha 100ng/mL. Observamos que após 3h e 6h de tratamento ocorre inibição da expressão do gene, que se mantém até 12h (Figura 19).

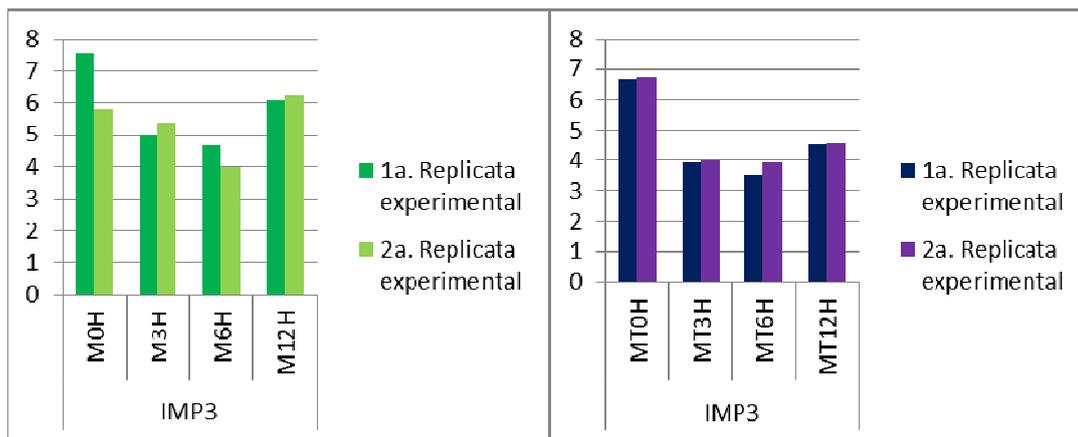
O último gene a apresentar expressão nas culturas MDMEC em monocamada foi *Igf2bp3*(*Imp3*), que teve a cinética de expressão modificada pelos tratamentos contendo melfalano 36,9 $\mu$ M isoladamente e em associação com TNF-alpha

100ng/mL. Observamos que os tratamentos inibem a expressão de *Igf2bp3* após 3h, 6h e 12h (Figura 20).



**Legenda:** Células MDMEC foram cultivadas em monocamada num total de  $10 \times 10^5$  células por placa de 60mm, tratadas com as melfalano 36,9 $\mu$ M, TNF-alpha 100ng//mL e melfalano+TNF-alpha durante os tempos 0h (15 minutos), 3h, 6h e 12h e posteriormente realizada avaliação da expressão gênica por real-time PCR. Os valores de expressão relativa foram comparados entre os tratamentos e os controles e entre os tratamentos entre si. (M = melfalano 36,9 $\mu$ M, MT= melfalano + TNF-alpha, 0h = 15' de exposição, 3h= 3 horas de exposição, 6h= 6 horas de exposição e 12h= 12 horas de exposição).

**Figura 19** - O gráfico representa o perfil de expressão relativa de 02 experimentos de cinética de expressão para o gene *Pard3*. Observa-se inibição da expressão do gene no grupo tratado com melfalano 36,9 $\mu$ M isoladamente e em associação com TNF-alpha 100ng/mL após 3 e 6h de tratamento que é mantida até 12h.

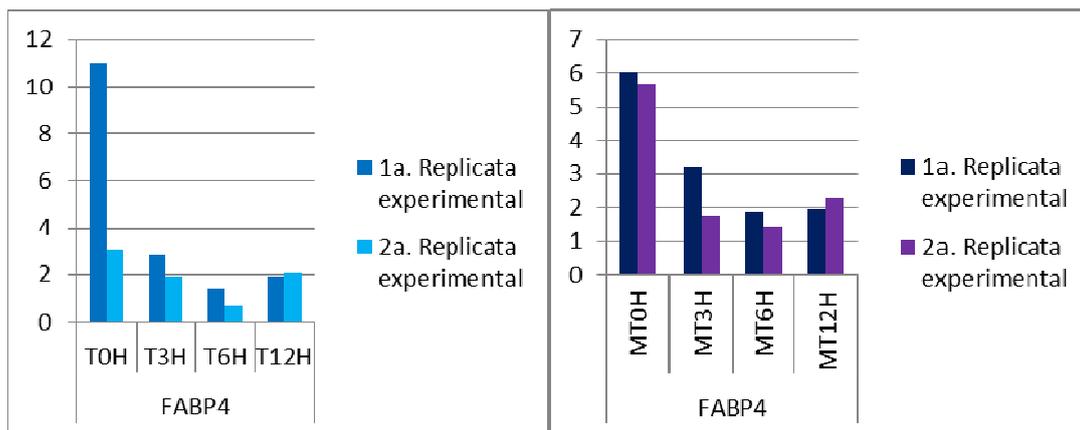


**Legenda:** Células MDMEC foram cultivadas em monocamada num total de  $10 \times 10^5$  células por placa de 60mm, tratadas com as melfalano 36,9 $\mu$ M, TNF-alpha 100ng/mL e melfalano+TNF-alpha durante os tempos 0h (15 minutos), 3h, 6h e 12h e posteriormente realizada avaliação da expressão gênica por real-time PCR. Os valores de expressão relativa foram comparados entre os tratamentos e os controles e entre os tratamentos entre si. (MT= melfalano + TNF-alpha, 0h = 15' de exposição, 3h= 3 horas de exposição, 6h= 6 horas de exposição e 12h= 12 horas de exposição).

**Figura 20** - O gráfico representa o perfil de expressão relativa de 02 experimentos de cinética de expressão para o gene *Imp3*. Observa-se inibição da expressão do gene no grupo tratado com melfalano 36,9 $\mu$ M isoladamente em 3 e 6 horas de tratamento e de melfalano em associação com TNF-alpha 100ng/mL após 3, 6h e 12h de tratamento.

Nas culturas de macrófagos (IC-21) cultivadas em monocamada os genes *Pard3*, *Ifi202b* não apresentaram expressão relevante pelo método de real-time PCR. Para os genes *Flt1*, *Imp3* e *Arhgef6*, embora expressos, não identificamos modificação da cinética de expressão com os tratamentos.

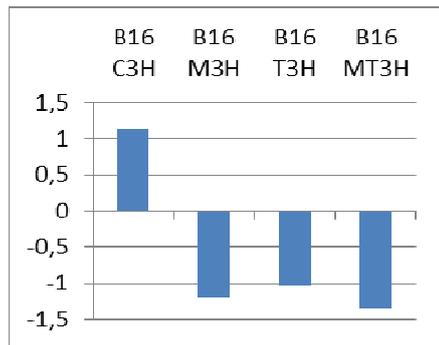
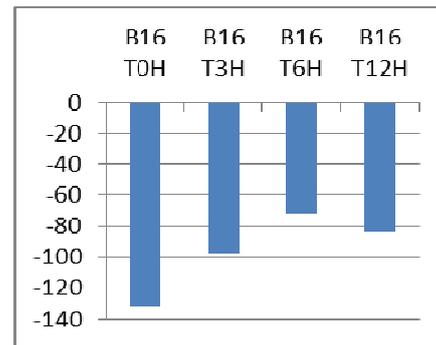
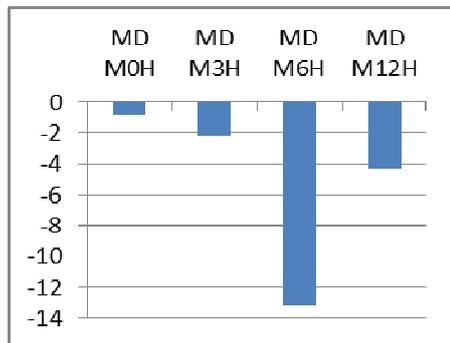
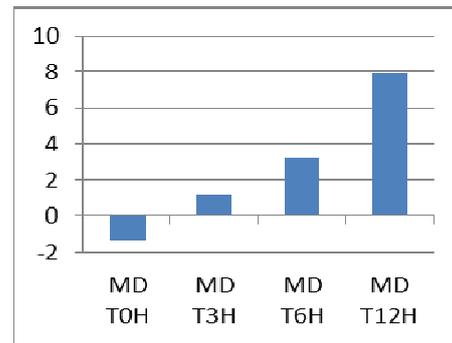
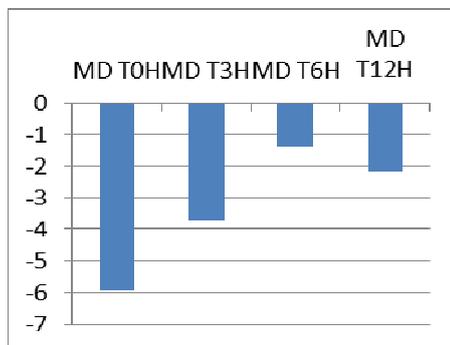
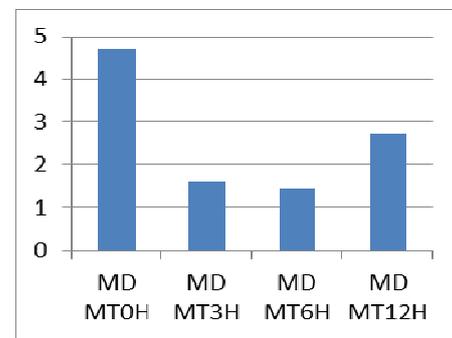
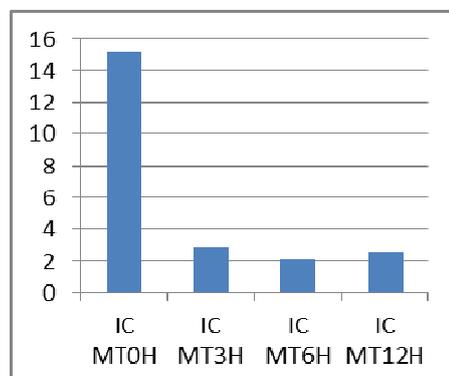
Com o gene *Fabp4*, observamos que os tratamentos com TNF-alpha e a associação Melfalano e TNF-alpha modificaram a cinética de expressão, apresentando diminuição da expressão após 3 horas e que se manteve até 12 horas de tratamento (Figura 21).



**Legenda:** Células IC-21 foram cultivadas em monocamada num total de  $10 \times 10^5$  células por placa de 60mm, tratadas com as melfalano  $36,9\mu\text{M}$ , TNF-alpha  $100\text{ng}/\text{mL}$  e melfalano+TNF-alpha durante os tempos 0h (15 minutos), 3h, 6h e 12h e posteriormente realizada avaliação da expressão gênica por real-time PCR. Os valores de expressão relativa foram comparados entre os tratamentos e os controles e entre os tratamentos entre si. (T=TNF-alpha, MT= melfalano + TNF-alpha, 0h = 15' de exposição, 3h= 3 horas de exposição, 6h= 6 horas de exposição e 12h= 12 horas de exposição).

**Figura 21** - O gráfico representa o perfil de expressão relativa de 02 experimentos de cinética de expressão para o gene Fabp4. Observa-se inibição da expressão do gene no grupo tratado com TNF-alpha  $100\text{ng}/\text{mL}$  e da associação melfalano  $36,9\mu\text{M}$  com TNF-alpha  $100\text{ng}/\text{mL}$  após 3, 6h e 12h de tratamento.

Todos os resultados de expressão gênica descritos no decorrer dos parágrafos anteriores foram repetidos em um novo ensaio isolado, para cada uma das linhagens, com novo cultivo celular, tratamento com drogas e avaliação da expressão por RT-real-time PCR, a fim de validarmos os resultados. Assim sendo, para a linhagem B16F10 reavaliamos a expressão dos genes Pard3 e Fabp4; para a linhagem MDMEC, os genes Pard3, Fabp4, Flt1 e Imp3; e para IC-21 o gene Fabp4. Os achados de expressão gênica foram semelhantes aos resultados prévios em todos os genes e linhagens testados como apresentado a seguir.

**Células B16F10 - Gene Pard3****Gene Fabp4****Células endoteliais - Gene Pard3****Gene Fabp4****Células endoteliais - Gene Flt1****Gene Imp3****Macrófagos - Gene Fabp4**

**Figura 22** – Gráficos dos resultados de expressão dos genes selecionados para a 3ª replicata.

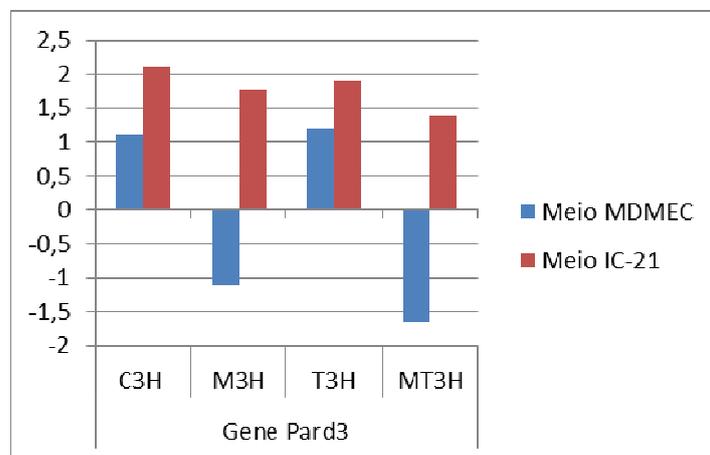
Após análise dos resultados de expressão com as linhagens B16F10, MDMEC e IC-21 cultivadas em monocamada, observamos que apenas os genes Fabp4 e Pard3 apresentaram modificação consistente da cinética de expressão em todas as três linhagens com os tratamentos testados. Com o resultado obtido dessa série de experimentos, definimos esses dois genes como alvos principais das análises de expressão gênica nos ensaios subsequentes.

## **5.6 CINÉTICA DE EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS B16F10, MDMEC E IC-21 CULTIVADAS EM MONOCAMADA, UTILIZANDO-SE MEIO CONDICIONADO**

Realizamos os experimentos de cinética de expressão gênica nas linhagens B16F10, MDMEC e IC-2 cultivadas em monocamada, conforme a metodologia descrita no tópico anterior, porém, nesta fase, buscamos avaliar a modificação do perfil de expressão com os tratamentos melfalano 36,9 $\mu$ M, TNF-alpha 100ng/mL e ambos, utilizando os meios condicionados por cada tipo celular. Nesse cenário, averiguaríamos como fatores de crescimento produzidos exclusivamente por cada cultura, poderiam modificar a expressão dos genes avaliados. Assim sendo, as células B16F10 foram testadas com os meios condicionados por células MDMEC e IC-21; as células MDMEC, com os meios condicionados por B16F10 e IC-21; e, por fim, as células IC-21, com os meios condicionados por B16F10 e MDMEC.

Para a cultura de melanoma B16F10, tínhamos observado no meio padrão (DMEM+SBF10%) que o gene Pard3 teve expressão diminuída pelo tratamento com melfalano e com associação melfalano e TNF-alpha após 3 horas de tratamento. Nos

meios condicionados, o padrão de inibição se manteve; todavia, no meio condicionado por IC-21, essa inibição pareceu menor (Figura 23).



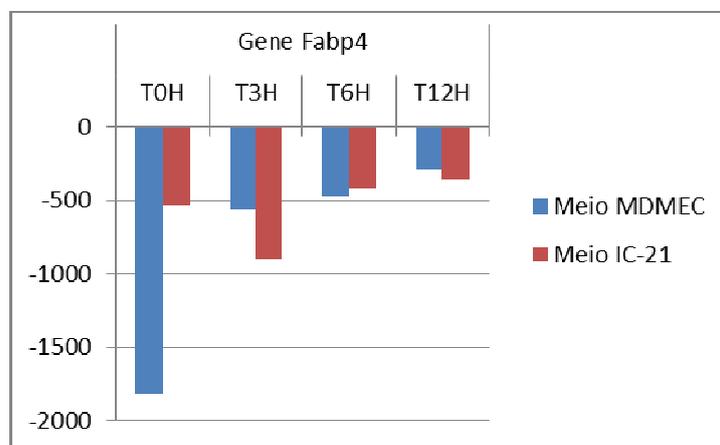
**Legenda:** Células B16F10 foram cultivadas em monocamada num total de  $10 \times 10^5$  células por placa de 60mm, tratadas com as melfalano  $36,9 \mu\text{M}$ , TNF-alpha  $100 \text{ng}/\text{mL}$  e melfalano+TNF-alpha durante os tempos 0h (15 minutos), 3h, 6h e 12h e posteriormente realizada avaliação da expressão gênica por real-time PCR. Os valores de expressão relativa foram comparados entre os tratamentos e os controles e entre os tratamentos entre si. C= grupo controle, M= melfalano  $36,9 \mu\text{M}$ , T= TNF-alpha  $100 \text{ng}/\text{mL}$ ; MT= melfalano + TNF-alpha e 3h= 3 horas de exposição ao tratamento.

**Figura 23** - O gráfico representa o perfil de expressão relativa do gene Pard3 em células B16F10 cultivadas em monocamada, utilizando-se meios condicionados. Nas barras vermelhas o resultado da expressão com meio condicionado por células IC-21; nas barras azuis o resultado do cultivo com meio condicionado por células MDMEC. Observou-se que com os meios condicionados houve diminuição da expressão com os tratamentos contendo melfalano.

Para o gene Fabp4, no tratamento com meio DMEM-SBF10%, observamos o aumento progressivo da expressão gênica com os tratamentos com TNF-alpha em 3 horas, 6 horas e 12 horas. Esse padrão se manteve no tratamento com meio condicionado por células MDMEC, provavelmente, porque nessa linhagem o tratamento TNF-alpha aumentou a expressão do referido gene e, dessa forma, teríamos um efeito sinérgico do meio condicionado.

Já quando as células B16F10 foram tratadas com meio condicionado por IC-21, observamos que houve diminuição da expressão do gene Fabp4, após o

tratamento com TNF-alpha em 3 horas, apenas retomando os níveis de expressão após 12 horas. Interessantemente, esse padrão se assemelha ao obtido no tratamento com TNF-alpha nas células IC-21 cultivadas em monocamada com meio DMEM-SBF10%, onde também, observamos diminuição da expressão de Fabp4 após 3 horas de tratamento com TNF-alpha. Aparentemente, as células B16F10, quando tratadas com meio condicionado por IC-21, mimetizam o perfil de expressão dessas células (Figura 24).

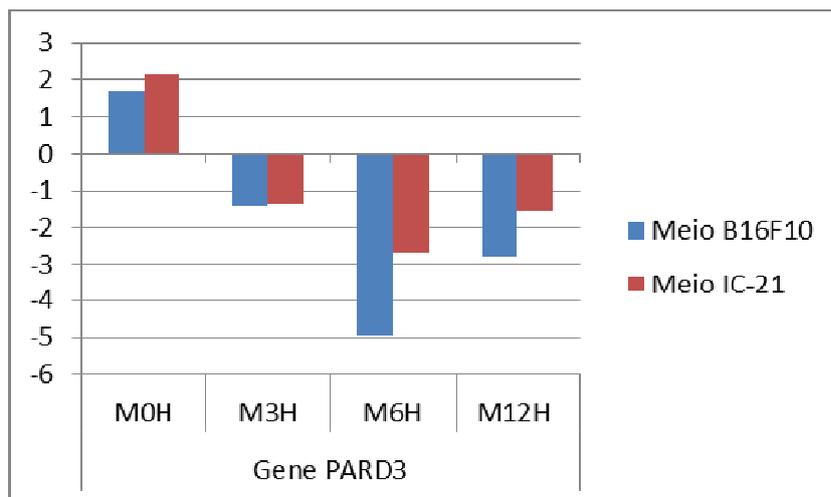


**Legenda:** Células B16F10 foram cultivadas em monocamada num total de  $10 \times 10^5$  células por placa de 60mm, tratadas com as melfalano  $36,9 \mu\text{M}$ , TNF-alpha  $100 \text{ng/mL}$  e melfalano+TNF-alpha durante os tempos 0h (15 minutos), 3h, 6h e 12h e posteriormente realizada avaliação da expressão gênica por real-time PCR. Os valores de expressão relativa foram comparados entre os tratamentos e os controles e entre os tratamentos entre si. T= TNF-alpha  $100 \text{ng/mL}$ , 0h = 15' de exposição, 3h= 3 horas de exposição, 6h= 6 horas de exposição e 12h= 12 horas de exposição.

**Figura 24** - O gráfico representa o perfil de expressão relativa da cinética de expressão para o gene Fabp4. Nas barras em vermelho o padrão obtido com meio condicionado por células IC-21 revelando diminuição da expressão do gene. Nas barras azuis, a cinética de expressão, utilizando-se meio condicionado por células MDMEC, com aumento da expressão no decorrer dos tratamentos de 3h a 12h.

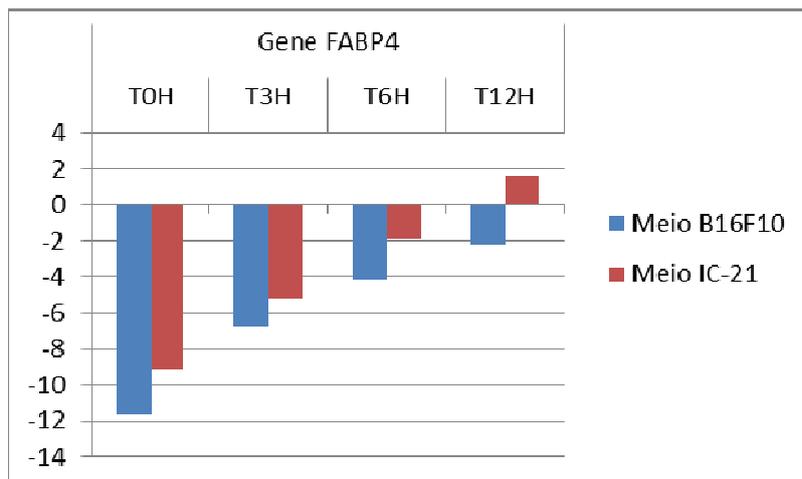
Na linhagem de células MDMEC cultivadas em monocamada, o gene *Pard3* não sofreu alteração no padrão de cinética de expressão obtido com meio DMEM-SBF10% suplementado com fatores de crescimento de endotélio, quando utilizamos os meios condicionados por B16F10 e por IC-21. Manteve-se a inibição da expressão do gene após 3 horas, sendo esta maior após 6 horas de tratamento com melfalano. Todavia a magnitude da inibição foi menor com o meio condicionado por células IC-21 (Figura 25).

Para o gene *Fabp4*, nas células MDMEC tratadas sob meio condicionado pelas linhagens B16F10 e IC-21, não observamos modificação no padrão de expressão obtido com meio DMEM+SBF10% suplementado, mantendo-se o estímulo à expressão de gene no decorrer do tempo com o tratamento com TNF-alpha 100ng/mL (Figura 26).



**Legenda:** Células MDMEC foram cultivadas em monocamada num total de  $10 \times 10^5$  células por placa de 60mm, tratadas com as melfalano  $36,9 \mu\text{M}$ , TNF-alpha  $100 \text{ng}/\text{mL}$  e melfalano+TNF-alpha durante os tempos 0h (15 minutos), 3h, 6h e 12h e posteriormente realizada avaliação da expressão gênica por real-time PCR. Os valores de expressão relativa foram comparados entre os tratamentos e os controles e entre os tratamentos entre si. C= grupo controle, M= melfalano  $36,9 \mu\text{M}$ . 0h = 15' de exposição, 3h= 3 horas de exposição, 6h= 6 horas de exposição e 12h= 12 horas de exposição ao tratamento.

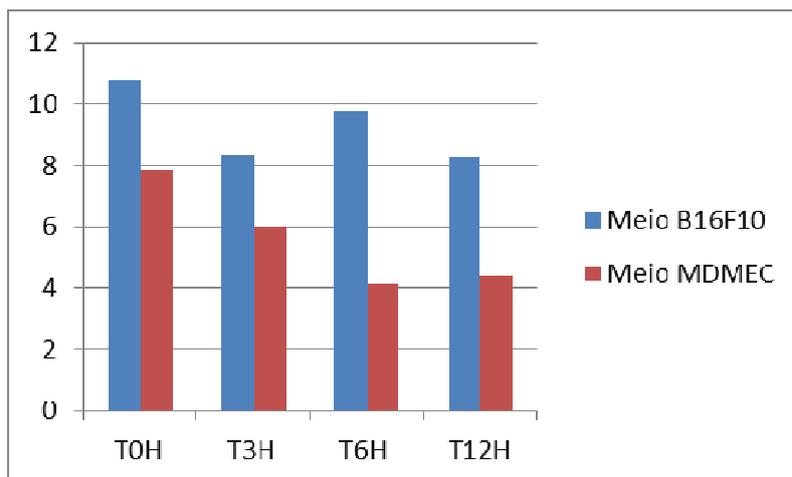
**Figura 25** - O gráfico representa o perfil de expressão relativa do gene Pard3 em células MDMEC cultivadas em monocamada, utilizando-se os meios condicionados. Nas barras vermelhas, o resultado da expressão com meio condicionado por células IC-21; nas barras azuis, o resultado da expressão com meio condicionado por células B16F10. Observou-se que o padrão de expressão do gene não foi modificado pelos meios condicionados, com inibição do gene a partir de 3 horas de tratamento. Todavia, com meio condicionado por IC-21, a magnitude da inibição foi menor.



**Legenda:** Células MDMEC foram cultivadas em monocamada num total de  $10 \times 10^5$  células por placa de 60mm, tratadas com as melfalano  $36,9 \mu\text{M}$ , TNF-alpha  $100 \text{ng}/\text{mL}$  e melfalano+TNF-alpha durante os tempos 0h (15 minutos), 3h, 6h e 12h e posteriormente realizada avaliação da expressão gênica por real-time PCR. Os valores de expressão relativa foram comparados entre os tratamentos e os controles e entre os tratamentos entre si. T= TNF-alpha  $100 \text{ng}/\text{mL}$ ; 0h = 15' de exposição, 3h= 3 horas de exposição, 6h= 6 horas de exposição e 12h= 12 horas de exposição ao tratamento.

**Figura 26** - O gráfico representa o perfil de expressão relativa do gene Fabp4 em células MDMEC cultivadas em monocamada, utilizando-se os meios condicionados. Nas barras vermelhas o resultado da expressão com meio condicionado por células IC-21; nas barras azuis o resultado do cultivo com meio condicionado por células B16F10. Observou-se que o padrão de expressão do gene não foi modificado pelos meios condicionados, com estímulo a expressão a partir de 3 horas de tratamento com TNF-alpha.

Concluindo a avaliação de expressão gênica em monocamada, a cinética de expressão do gene Fabp4 foi avaliada em macrófagos IC-21 com os meios condicionados e após tratamento com TNF-alpha. Não houve modificação do padrão de expressão do gene, utilizando-se meio condicionado por células MDMEC, mantendo-se a inibição da expressão a partir de 3 horas de tratamento. Por outro lado, quando utilizamos o meio condicionado por células B16F10, houve redução do efeito inibitório do tratamento com TNF-alpha, principalmente após 6 horas de tratamento (Figura 27).



**Legenda:** Células IC-21 foram cultivadas em monocamada num total de  $10 \times 10^5$  células por placa de 60mm, tratadas com as melfalano  $36,9 \mu\text{M}$ , TNF-alpha  $100 \text{ng/mL}$  e melfalano+TNF-alpha durante os tempos 0h (15 minutos), 3h, 6h e 12h e posteriormente realizada avaliação da expressão gênica por real-time PCR. Os valores de expressão relativa foram comparados entre os tratamentos e os controles e entre os tratamentos entre si. T= TNF-alpha  $100 \text{ng/mL}$ . 0h = 15' de exposição, 3h= 3 horas de exposição, 6h= 6 horas de exposição e 12h= 12 horas de exposição ao tratamento.

**Figura 27** - O gráfico representa o perfil de expressão relativa do gene Fabp4 em células IC-21 cultivadas em monocamada, utilizando-se os meios condicionados. Nas barras vermelhas o resultado da expressão com meio condicionado por células MDMEC e nas barras azuis o resultado do cultivo com meio condicionado por células B16F10. Observou-se modificação da cinética de expressão com o meio condicionado por células B16F10, havendo diminuição do efeito inibitório do TNF-alpha, principalmente após 6 horas de tratamento.

## 5.7 CINÉTICA DE EXPRESSÃO GÊNICA EM CULTURAS TRIDIMENSIONAIS (ESFERÓIDES)

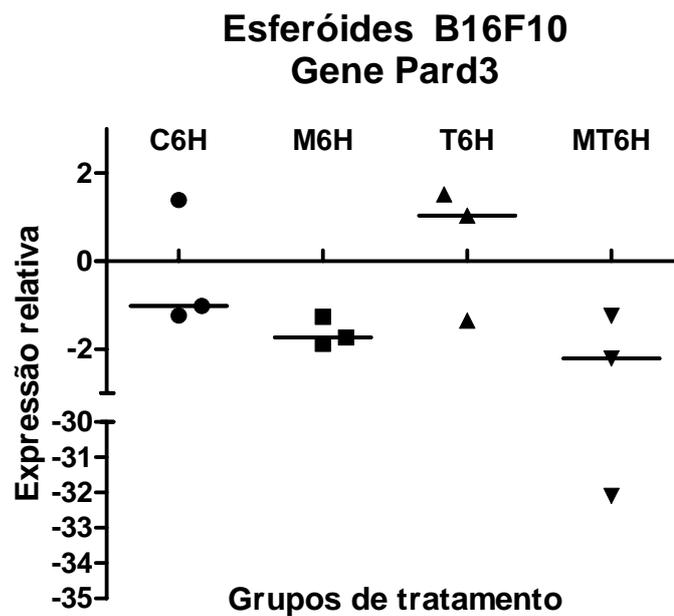
Após os resultados de expressão de culturas em monocamada com os meios suplementados com SBF10% e os meios condicionados, buscamos avaliar se a cultivo tridimensional (esferóides) modificaria a cinética de expressão dos genes selecionados (Arhgef6, Fabp4, Igf2bp3, Flt1, Pard3 e Ifi202b) com a linhagem de melanoma B16F10 e testamos, também, se as coculturas tridimensionais compostas das células B16F10 e MDMEC e as compostas pelas três linhagens (B16F10-MDMEC-IC-21) modificariam o perfil de expressão observado nos cultivos em monocamada.

De maneira geral, observamos que, nos cultivos tridimensionais, houve maior variabilidade dos padrões de cinética de expressão entre os ensaios, necessitando assim de 03 experimentos para analisarmos os resultados. Os genes Ifi202b, Arhgef6, Flt1 e Igf2bp3 não apresentaram expressão ou tiveram expressão muito baixa nos cultivos tridimensionais. Os genes Pard3 e Fabp4 apresentaram expressão relevante e foram analisados.

Para o gene Pard3, evidenciamos um padrão de expressão gênica com os esferóides B16F10 semelhante ao obtido com as células B16F10 cultivadas em monocamada, havendo inibição da expressão com melfalano 36,9 $\mu$ M e com a associação melfalano e TNF-alpha 100ng/mL. Todavia, esse padrão só foi observado nos esferóides mais tardiamente, após 6 horas de tratamento (nas culturas em monocamada ocorreu após 3 horas), sugerindo um aparente retardo da inibição do referido gene no cultivo tridimensional (Figura 28). Observamos também, em dois

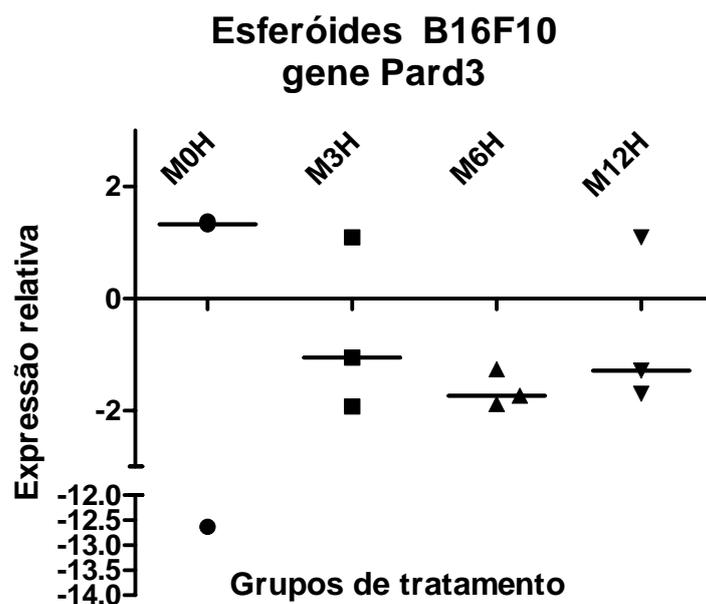
dos ensaios, que o efeito inibitório do tratamento com melfalano 36,9 $\mu$ M foi maior apenas após 6 horas de tratamento, sendo menor ou perdendo-se após 12 horas. Em um dos experimentos não observamos o padrão referido (Figura 29).

Ainda utilizando-se os esferóides de B16F10, analisamos o perfil de expressão do gene Fabp4. Evidenciamos, inicialmente, que a expressão basal (tempo 15 minutos) do gene foi maior no cultivo tridimensional com ER variando aproximadamente entre -70 e -20; ao passo que, nas culturas em monocamada variou aproximadamente entre -350 e -120. Na avaliação da cinética, em dois dos ensaios, houve aumento da expressão do gene Fabp4 no decorrer do tempo com o tratamento TNF-alpha 100ng/mL, semelhantemente aos cultivos em monocamada (Figura 30). Em um dos ensaios houve diminuição da expressão.



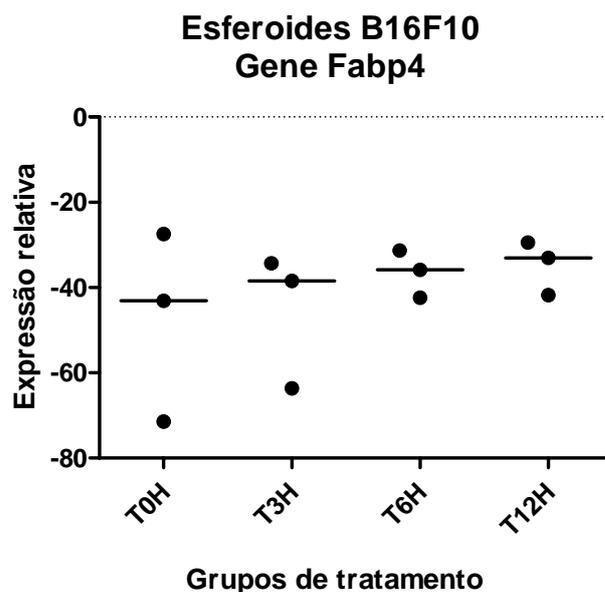
**Legenda:** Células de melanoma B16F10 foram cultivadas em placa 96 poços fundo chato, preparada com gel de agarose LMP 1% 100 $\mu$ L/well, na concentração 3,0x10<sup>3</sup> células/poço. Após 07 dias, os esferóides formados foram transferidos para os poços de uma placa de 04 poços de 20mm/poço, contendo os tratamentos, tendo-se cerca de 08 esferóides por poço. O gráfico representa o resultado de 03 ensaios isolados. C = grupo controle; M = melfalano 36,9 $\mu$ M; T = TNF-alpha 100ng/mL, MT = melfalano e TNF-alpha; 6H = 6 horas de exposição ao tratamento.

**Figura 28** - Observa-se que os tratamentos contendo melfalano 36,9 $\mu$ M inibiram a expressão do gene *Pard3* após 6 horas de tratamento. Houve modificação do padrão de expressão, comparativamente as culturas de B16F10 em monocamada, onde a inibição pelo melfalano foi mais precoce, ocorrendo com 03 horas de tratamento.



**Legenda:** Células de melanoma B16F10 foram cultivadas em placa 96 poços de fundo chato, preparada com gel de agarose LMP 1% 100 $\mu$ L/po, na concentração 3,0x10<sup>3</sup> células/poço. Após 07 dias, os esferóides formados foram transferidos para os poços de uma placa de 04 poços de 20mm/poço, contendo os tratamentos, tendo-se cerca de 08 esferóides por poço. O gráfico representa o resultado de 03 ensaios isolados. M = melfalano 36,9 $\mu$ M; 0h = 15' de exposição, 3h= 3 horas de exposição, 6h= 6 horas de exposição e 12h= 12 horas de exposição ao tratamento.

**Figura 29** - Observa-se inibição da expressão do gene Pard3 com o melfalano após 6 horas de tratamento nos ensaios de cinética de expressão. Tal efeito inibitório se perde ou é diminuído após 12 horas de tratamento. Em um dos ensaios houve variação da expressão inicial observada em 0h de exposição com melfalano que se apresentou negativa.



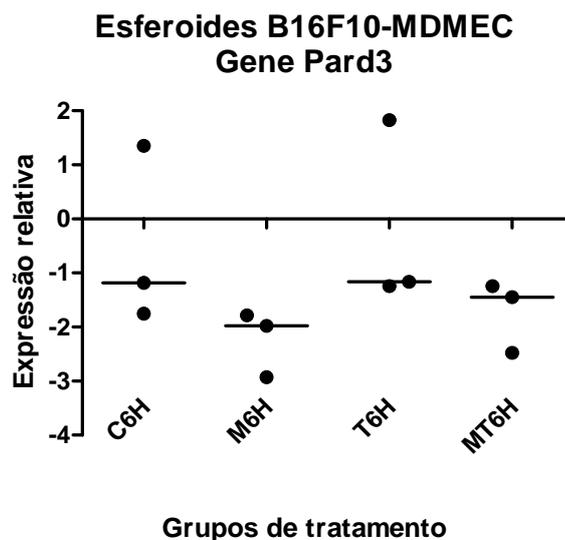
**Legenda.** Células de melanoma B16F10 foram cultivadas em placa 96 poços de fundo chato, preparada com gel de agarose LMP 1% 100 $\mu$ L/well, na concentração 3,0x10<sup>3</sup>células/poço. Após 07 dias, os esferóides formados foram transferidos para os poços de uma placa de 04 poços de 20mm/poço, contendo os tratamentos, tendo-se cerca de 08 esferóides por poço. O gráfico representa o resultado de 03 ensaios isolados. T = TNF-alpha 100ng/mL; 0h = 15' de exposição, 3h= 3 horas de exposição, 6h= 6 horas de exposição e 12h= 12 horas de exposição ao tratamento.

**Figura 30** - Observa-se que o tratamento com TNF-alpha promoveu aumento da expressão do gene Fabp4 no decorrer do tempo nos ensaios com esferóides B16F10.

Seguimos para os experimentos de expressão gênica utilizando as coculturas tridimensionais com as linhagens de melanoma B16F10 e de células endoteliais MDMEC. Executamos os protocolos nos moldes do que foi descrito para os esferóides de células B16F10. Foram realizados 04 experimentos de cinética de expressão no total. Assim como o que foi descrito para os esferóides contendo 01 linhagem, evidenciamos maior variabilidade dos resultados de expressão também com as coculturas tridimensionais, justificando assim a necessidade de um maior número de ensaios para avaliação mais acurada dos resultados. Apresentamos os resultados de 03 desses ensaios, pois, em um deles (o terceiro realizado), houve

perda de amostras por aspiração acidental dos esferóides na retirada dos meios de cultura para extração do RNA total.

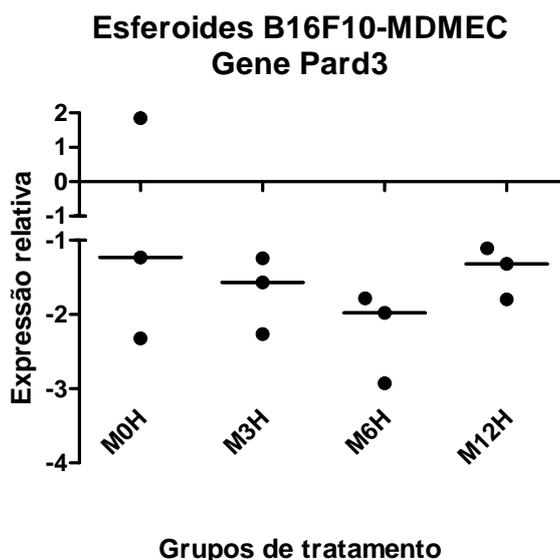
Analisando a expressão do gene *Pard3* nos esferóides B16F10-MDMEC, obtivemos um perfil de expressão semelhante ao que foi visto com os esferóides B16F10. Os tratamentos contendo melfanano 36,9 $\mu$ M e melfalano com TNF- $\alpha$  100ng/mL inibiram a expressão do gene, porém mais tardiamente, em 6 horas de tratamento, quando comparados com os experimentos dos cultivos em monocamada cuja inibição já ocorre após 3 horas de tratamento (Figura 31). Avaliamos também a cinética de expressão no decorrer dos tempos de tratamento com melfalano e verificamos que o efeito inibitório foi maior decorridas 6 horas de tratamento. Após 12 horas, houve menor inibição da expressão gênica, retornando aos níveis iniciais de expressão (Figura 32).



**Legenda:** Células de melanoma B16F10 e células endoteliais (MDMEC) foram cocultivadas em placa 96 poços de fundo chato, preparada com gel de agarose LMP 1% 100 $\mu$ L/well, na concentração 3,0x10<sup>3</sup> células/poço utilizando-se o protocolo da gota invertida. Após 07 dias, os esferóides formados foram transferidos para os poços de uma placa de 04 poços de 20mm/poço, contendo os tratamentos, tendo-se cerca de 08 esferóides por poço. O gráfico representa o resultado de 03 ensaios isolados. M = melfalano 36,9 $\mu$ M; 0h = 15' de exposição, 3h= 3 horas de exposição, 6h= 6 horas de exposição e 12h= 12 horas de exposição ao tratamento.

**Figura 31** - Expressão do gene Pard3 em esferóides de células B16F10 e MDMEC.

Observa-se que os tratamentos com melfalano isolado e em associação com TNF- $\alpha$  inibiram a expressão do gene Pard3 de forma consistente entre os 03 ensaios realizados.

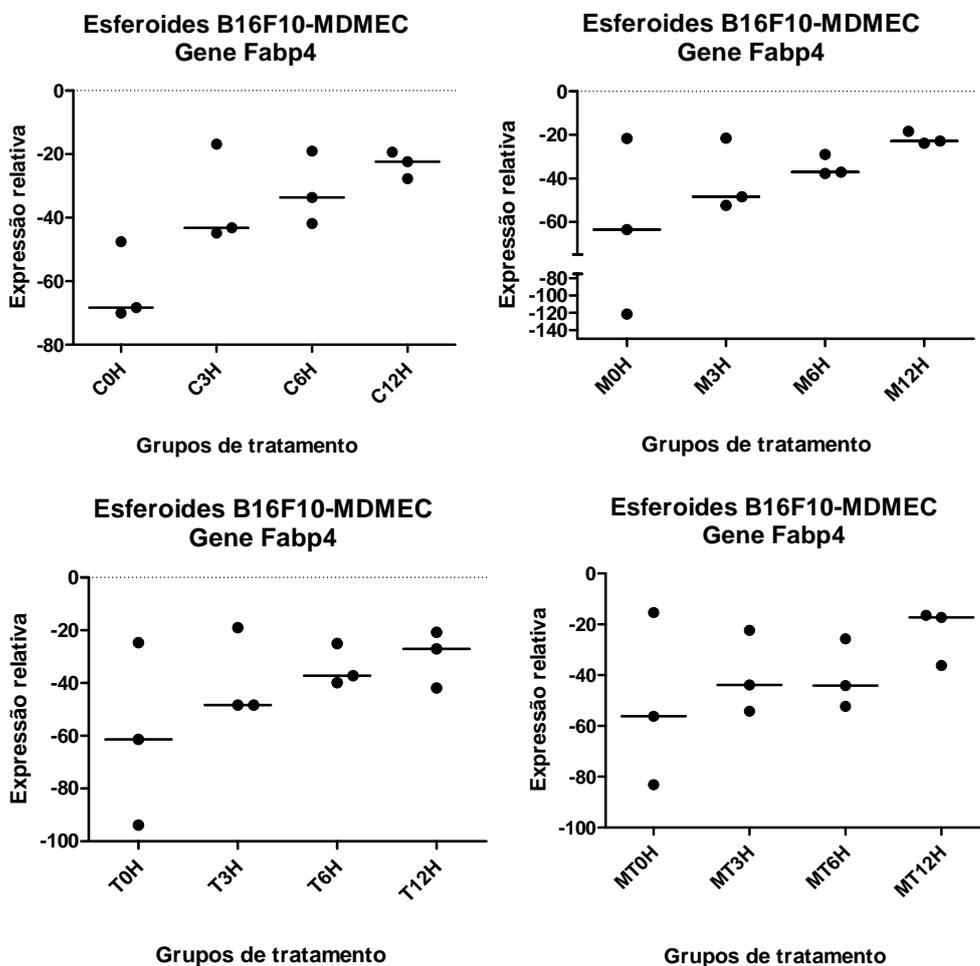


**Legenda:** Células de melanoma B16F10 e células endoteliais (MDMEC) foram cocultivadas em placa 96 poços de fundo chato, preparada com gel de agarose LMP 1% 100 $\mu$ L/well, na concentração 3,0x10<sup>3</sup> células/poço utilizando-se o protocolo da gota invertida. Após 07 dias, os esferóides formados foram transferidos para os poços de uma placa de 04 poços de 20mm/poço, contendo os tratamentos, tendo-se cerca de 08 esferóides por poço. O gráfico representa o resultado de 03 ensaios isolados. C = grupo controle; M = melfalano 36,9 $\mu$ M; T = TNF-alpha 100ng/mL, MT = melfalano e TNF-alpha; 0h = 15' de exposição, 3h= 3 horas de exposição, 6h= 6 horas de exposição e 12h= 12 horas de exposição ao tratamento.

**Figura 32** - Cinética de expressão do gene Pard3 em esferóides de células B16F10 e MDMEC. Observa-se que os tratamentos com melfalano 36,9 $\mu$ M inibiram a expressão do gene Pard3 progressivamente no decorrer do tempo, com o máximo de inibição ocorrendo após 6 horas de tratamento.

Para o gene Fabp4 observamos aumento progressivo da expressão do gene no decorrer do tempo nos controles tratados com meio DMEM+SBF10% sem drogas e esse padrão não foi modificado pelos tratamentos, seja com melfalano ou com TNF-alpha. Nos cultivos em monocamada das células B16F10, apenas o tratamento com TNF-alpha proporcionou aumento consistente da expressão de Fabp4. Já nos cultivos de MDMEC em monocamada tanto os controles, quanto os grupos contendo TNF-alpha apresentaram aumento da expressão. Acreditamos que as coculturas tridimensionais de B16F10-MDMEC preservam o padrão observado tanto para as

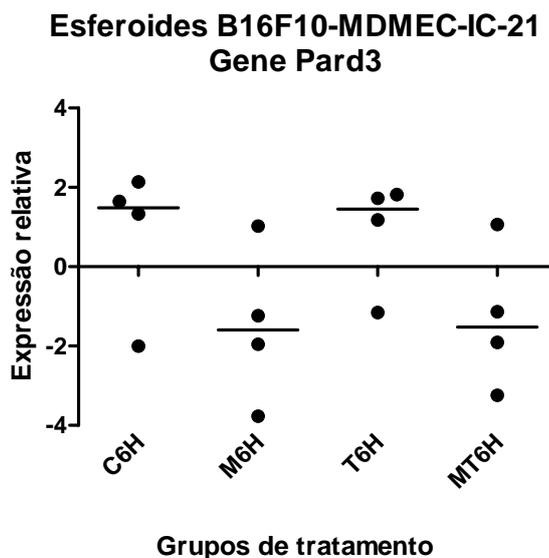
células B16F10, quanto para as MDMEC, mantendo assim o perfil de aumento de expressão nos controles e nos tratamentos mutuamente (Figura 33).



**Legenda:** Células de melanoma B16F10 e células endoteliais (MDMEC) foram cocultivadas em placa 96 poços de fundo chato, preparada com gel de agarose LMP 1% 100 $\mu$ L/poço, na concentração  $3,0 \times 10^3$  células/poço utilizando-se o protocolo da gota invertida. Após 07 dias, os esferóides formados foram transferidos para os poços de uma placa de 04 poços de 20mm/poço, contendo os tratamentos, tendo-se cerca de 08 esferóides por poço. O gráfico representa o resultado de 03 ensaios isolados. C = grupo controle; M = melfalano 36,9 $\mu$ M; T = TNF-alpha 100ng/mL, MT = melfalano e TNF-alpha; 0h = 15' de exposição, 3h= 3 horas de exposição, 6h= 6 horas de exposição e 12h= 12 horas de exposição ao tratamento.

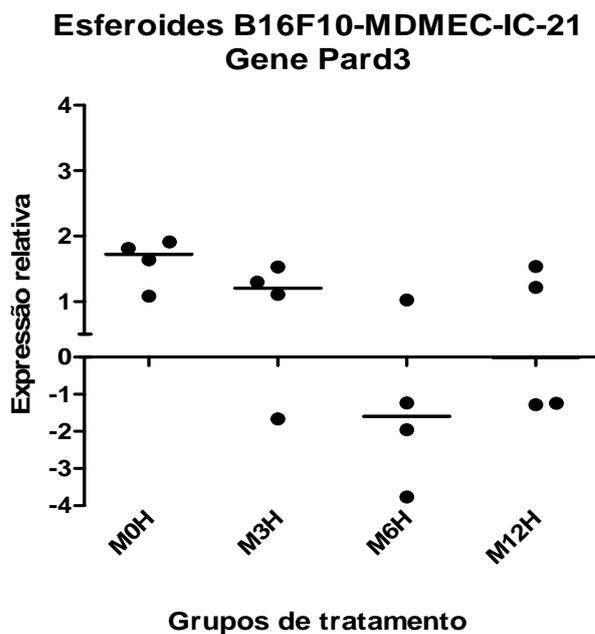
**Figura 33** - Cinética de expressão do gene Fabp4 em esferóides de células B16F10 e MDMEC. Observa-se que o gene Fabp4 teve expressão aumentada nos esferóides B16F10-MDMEC no decorrer do tempo tanto nos controles contendo meio DMEM+SBF10%, quanto nos meios contendo as drogas melfalano e TNF-alpha.

Para concluir os experimentos de cinética de expressão, avaliamos o efeito das drogas nos esferóides compostos pelos 03 tipos celulares (B16F10, MDMEC e IC-21). Não observamos expressão dos genes *Arhgef6*, *Flt1* e *Ifi202b* nesses cultivos celulares. O gene *Igf2bp3* apresentou expressão estável, em detrimento dos tratamentos testados, não se observando modificação consistente do padrão de expressão. Apenas os genes *Pard3* e *Fabp4* apresentaram modificação da expressão, a ser relata a seguir. Para essa etapa, foram realizados 04 ensaios isolados com esferóides B16F10-MDMEC-IC-21, visto que observamos variação dos padrões de expressão entre os ensaios, necessitando de um maior número de ensaios para avaliação consistentes dos resultados. Para o gene *Pard3*, manteve-se o perfil de expressão registrado para os esferóides B16F10 e para os esferóides B16F10-MDMEC, com inibição da expressão pelos tratamentos contendo melfalano 36,9 $\mu$ M após 6 horas de exposição à droga (Figura 34). Foi mantida também a cinética de expressão gênica com inibição máxima pelo melfalano após 6 horas de tratamento (Figura 35).



**Legenda:** Células de melanoma B16F10, células endoteliais (MDMEC) e macrófagos (IC-21) foram cocultivadas em placa 96 poços de fundo chato, preparada com gel de agarose LMP 1% 100 $\mu$ L/poço, na concentração  $3,0 \times 10^3$  células/poço utilizando-se o protocolo da gota invertida. Após 07 dias, os esferóides formados foram transferidos para os poços de uma placa de 04 poços de 20mm/poço, contendo os tratamentos, tendo-se cerca de 08 esferóides por poço. O gráfico representa o resultado de 04 ensaios isolados. C = grupo controle; M = melfalano 36,9 $\mu$ M; T = TNF-alfa 100ng/mL, MT = melfalano e TNF-alfa; 6h= 6 horas de exposição ao tratamento.

**Figura 34** - Expressão do gene Pard3 em esferóides de células B16F10, MDMEC e IC-21. Observa-se que os tratamentos contendo melfalano 36,9 $\mu$ M inibiram, de forma consistente, a expressão do gene Pard3 após 6 horas de tratamento.

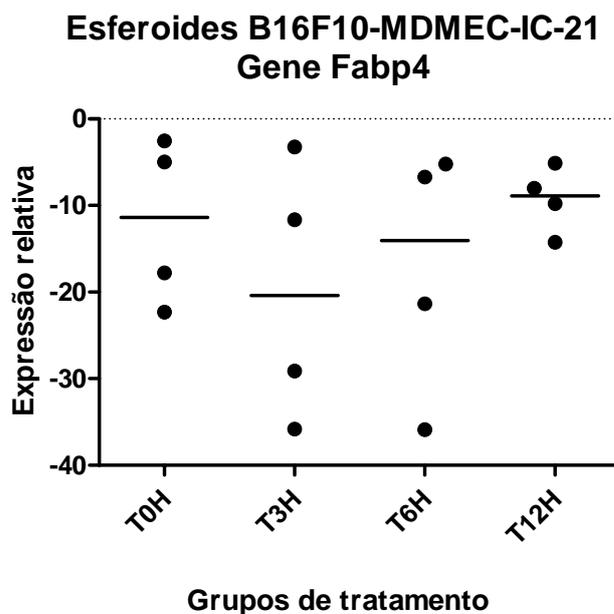


**Legenda:** Células de melanoma B16F10, células endoteliais (MDMEC) e macrófagos (IC-21) foram cocultivadas em placa 96 poços de fundo chato, preparada com gel de agarose LMP 1% 100 $\mu$ L/poço, na concentração 3,0x10<sup>3</sup> células/poço utilizando-se o protocolo da gota invertida. Após 07 dias, os esferóides formados foram transferidos para os poços de uma placa de 04 poços de 20mm/poço, contendo os tratamentos, tendo-se cerca de 08 esferóides por poço. O gráfico representa o resultado de 04 ensaios isolados. M = melfalano 36,9 $\mu$ M; 0h = 15' de exposição, 3h = 3 horas de exposição, 6h = 6 horas de exposição e 12h = 12 horas de exposição ao tratamento.

**Figura 35** - Cinética de expressão do gene Pard3 em esferóides de células B16F10, MDMEC e IC-21. Observa-se que os tratamentos contendo melfalano 36,9 $\mu$ M inibiram a expressão do gene Pard3 progressivamente no decorrer do tempo, com o máximo de inibição ocorrendo após 6 horas de tratamento.

Utilizando esferóides de B16F10-MDMEC-IC-21, observamos que o gene *Fabp4* sofreu diminuição da expressão após 3 horas de tratamento com TNF- $\alpha$  100ng/mL. Esse resultado difere dos registrados com os esferóides de B16F10 e os esferóides B16F10-MDMEC, onde evidenciamos aumento progressivo da expressão do gene durante o tratamento com TNF- $\alpha$ . Dentre as linhagens celulares estudadas, apenas os macrófagos (IC-21) cultivados em monocamada apresentaram esse comportamento de diminuição da expressão de *Fabp4* após 3

horas de exposição ao TNF-alpha. Esse achado sugere que as células IC-21 influenciam diretamente no perfil de expressão gênica das coculturas tridimensionais contendo as três linhagens (Figura 36).



Legenda: Células de melanoma B16F10, células endoteliais (MDMEC) e macrófagos (IC-21) foram cocultivadas em placa 96 poços de fundo chato, preparada com gel de agarose LMP 1% 100µL/poço, na concentração  $3,0 \times 10^3$  células/poço utilizando-se o protocolo da gota invertida. Após 07 dias, os esferóides formados foram transferidos para os poços de uma placa de 04 poços de 20mm/poço, contendo os tratamentos, tendo-se cerca de 08 esferóides por poço. O gráfico representa o resultado de 04 ensaios isolados. T = TNF-alpha 100ng/mL; 0h = 15' de exposição, 3h= 3 horas de exposição, 6h= 6 horas de exposição e 12h= 12 horas de exposição ao tratamento.

**Figura 36** - Cinética de expressão do gene Fabp4 em esferóides de células B16F10, MDMEC e IC-21. Observa-se que o tratamento com TNF-alpha inibiu a expressão do gene Fabp4 no decorrer do tempo, apresentando um perfil diferente do observado nas culturas tridimensionais de B16F10 e B16F10-MDMEC, onde se via estímulo a expressão.

Com a conclusão dos experimentos de expressão gênica em culturas tridimensionais e em monocamada, evidenciamos que apenas os genes Pard3 e Fabp4 tiveram sua expressão modificada de forma consistente entre cultivos celulares testados. O melfalano exerceu atividade inibitória do gene Pard3 nas

culturas em monocamada de B16F10 e de MDMEC e o TNF-alpha aumentou a expressão de Fabp4 nas culturas em monocamada de células B16F10 e MDMEC e diminuiu a expressão deste gene na cultura de macrófagos (IC-21).

O meio condicionado por macrófago (IC-21) pareceu modificar a expressão do gene Fabp4 nas células de melanoma B16F10, em relação aos experimentos utilizando meio DMEM+SBF10%, diminuindo a expressão deste gene sob o tratamento com TNF-alpha. Por outro lado, o meio condicionado por B16F10 modificou a expressão do mesmo gene nas culturas de macrófagos, em relação ao cultivo com meio DMEM+SBF10%, havendo um menor efeito inibitório com o tratamento com TNF-alpha.

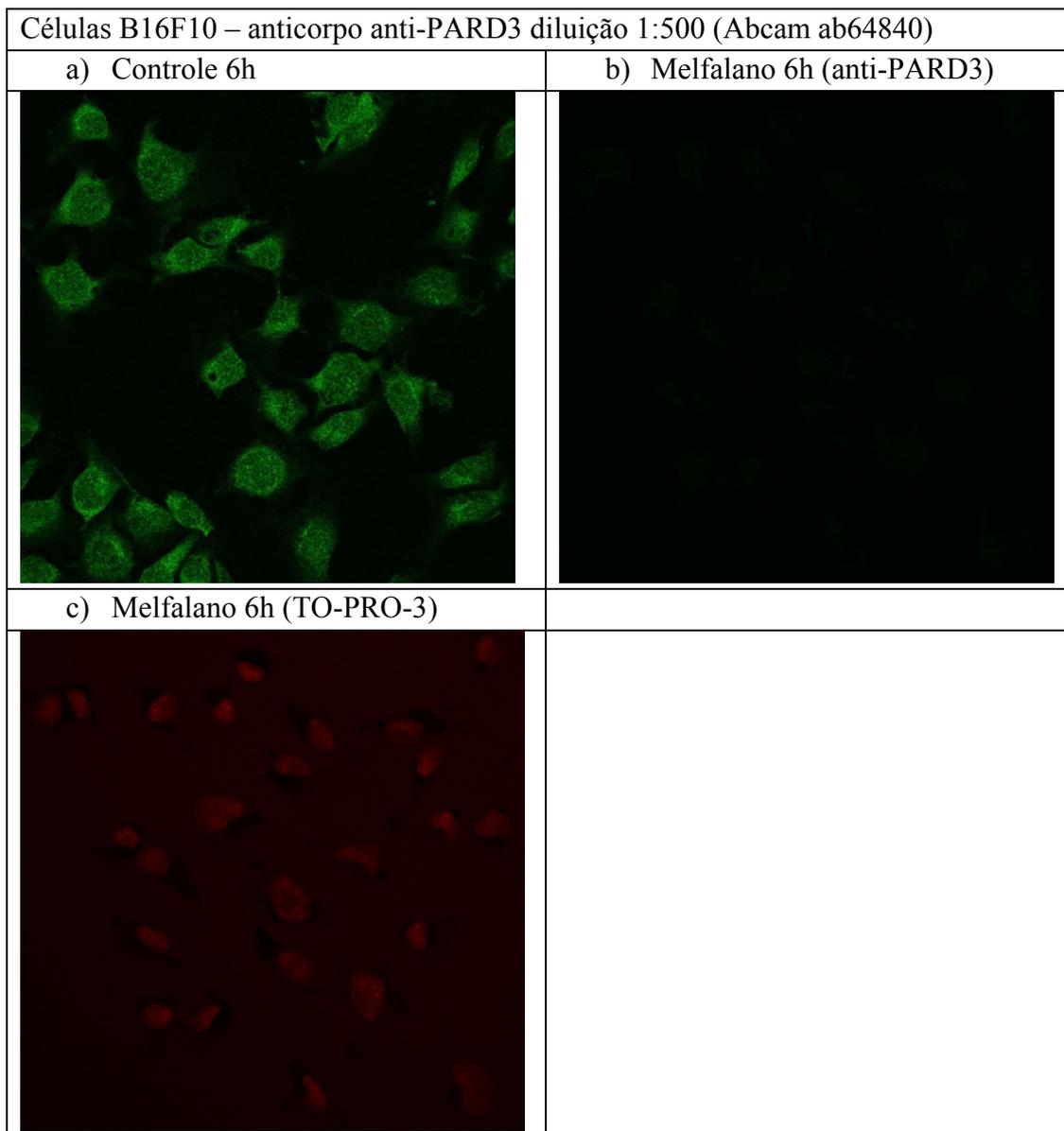
Nas culturas tridimensionais, o padrão de expressão gênica com inibição de Pard3 pelo melfalano foi mantido, embora evidenciado após maiores tempos de exposição à droga (6 horas de exposição versus 3 horas). O gene Fabp4 teve a expressão aumentada pelo tratamento com TNF-alpha nos esferóides de células B16F10 e nos esferóides de B16F10-MDMEC, mas, nos esferóides contendo os três tipos celulares, a expressão do referido gene foi diminuída pelo tratamento com TNF-alpha, sugerindo que a presença de macrófagos na cocultura, modificou o padrão de expressão observado nas culturas tridimensionais das demais linhagens celulares, assemelhando-se ao obtido com o cultivo dos macrófagos em monocamada.

## **5.8 EXPRESSÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA DAS PROTEÍNAS PARD3 E FABP4**

Com os resultados de expressão dos genes *Pard3* e *Fabp4* finalizados nas culturas em monocamada e tridimensionais, avaliamos se a modificação da expressão gênica se refletiu na expressão proteica, utilizando a técnica de imunofluorescência.

De maneira geral seguimos o protocolo de imunofluorescência como o descrito na etapa de caracterização das células endoteliais com o anticorpo anti-CD31. Para leitura da fluorescência utilizamos um microscópio confocal Leica®. O controle da fluorescência foi realizado com amostras de células contendo apenas os anticorpos fluorescentes secundários. Todos os registros foram realizadas descontando a fluorescência basal dos anticorpos secundários.

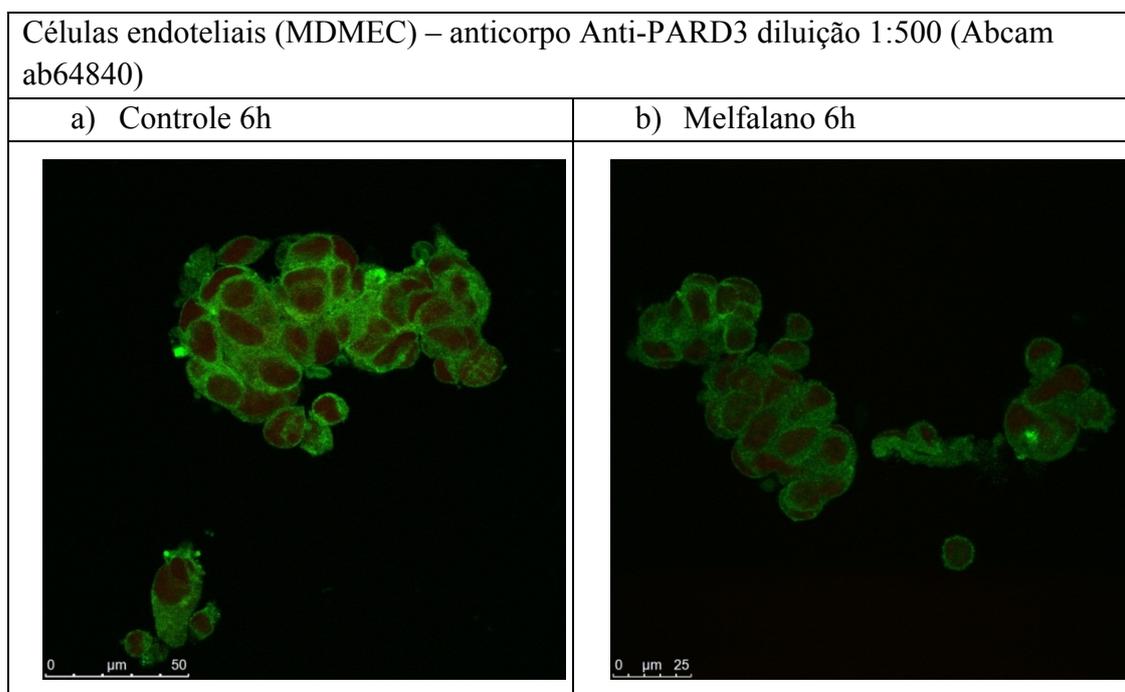
Tínhamos como resultado prévio que o tratamento com melfalano 36,9 $\mu$ M inibiu a expressão do gene *Pard3* nas culturas citadas a partir de 3 horas de tratamento. Realizamos o preparo das lâminas de imunofluorescência com 6 horas de tratamento, propondo garantir um tempo de inibição adequado a suprimir a expressão protéica. De maneira geral, nas culturas testadas, observamos que houve diminuição da expressão da proteína PARD3 após o tratamento com melfalano, em relação ao controle sem tratamento. Nas células de melanoma B16F10, essa diminuição foi absoluta, não apresentando fluorescência após 6 horas de tratamento (Figura 37).



**Legenda:** Células de melanoma B16F10 foram plaqueadas num total de  $1,0 \times 10^5$  células ressuspendidas em  $500 \mu\text{L}$  de meio DMEM+SBF10% sobre laminulas depositadas nos fundos dos poços de uma placa de 04 poços de 20mm/poço e submetidas ao tratamento com melfalano  $36,9 \mu\text{M}$  durante 6 horas. Realizou-se imunofluorescência com o anticorpo primário *rabbit policlonal* anti-PARD3 e secundário fluorescente *goat anti-rabbit* (488) e marcação nuclear com TO-PRO-3. Leitura das lâminas em microscópio confocal Leica no comprimento de emissão de onda 488nm.

**Figura 37 -** Imunofluorescência com anticorpo anti-PARD3 em células B16F10. Em **a)** evidencia-se fluorescência na cor verde representativa da proteína PARD3 nas células B16F10 nos controles sem tratamento; em **b)** diminuição absoluta da fluorescência equivalente à diminuição da expressão proteica nas células tratadas com melfalano  $36,9 \mu\text{M}$ ; e em **c)** a captura da fluorescência representativa a marcação nuclear de TO-PRO-3, confirmando a presença de células no cultivo submetido ao tratamento com melfalano em 6 horas.

Nas culturas de células endoteliais, houve diminuição da expressão proteica de PARD3 após 6 horas de exposição, mas em menor intensidade, quando comparadas as células B16F10 (Figura 38).



**Legenda:** Células endoteliais (MDMEC) foram plaqueadas num total de  $1,0 \times 10^5$  células ressuspendidas em  $500 \mu\text{L}$  de meio DMEM+SBF10% sobre laminulas depositadas nos fundos dos poços de uma placa de 04 poços de  $20\text{mm/poço}$  e submetidas ao tratamento com melfalano  $36,9 \mu\text{M}$  durante 6 horas. Realizou-se imunofluorescência com o anticorpo primário *rabbit policlonal* anti-PARD3 e secundário fluorescente *goat anti-rabbit* (488). Leitura das lâminas em microscópio confocal Leica no comprimento de emissão de onda  $488\text{nm}$

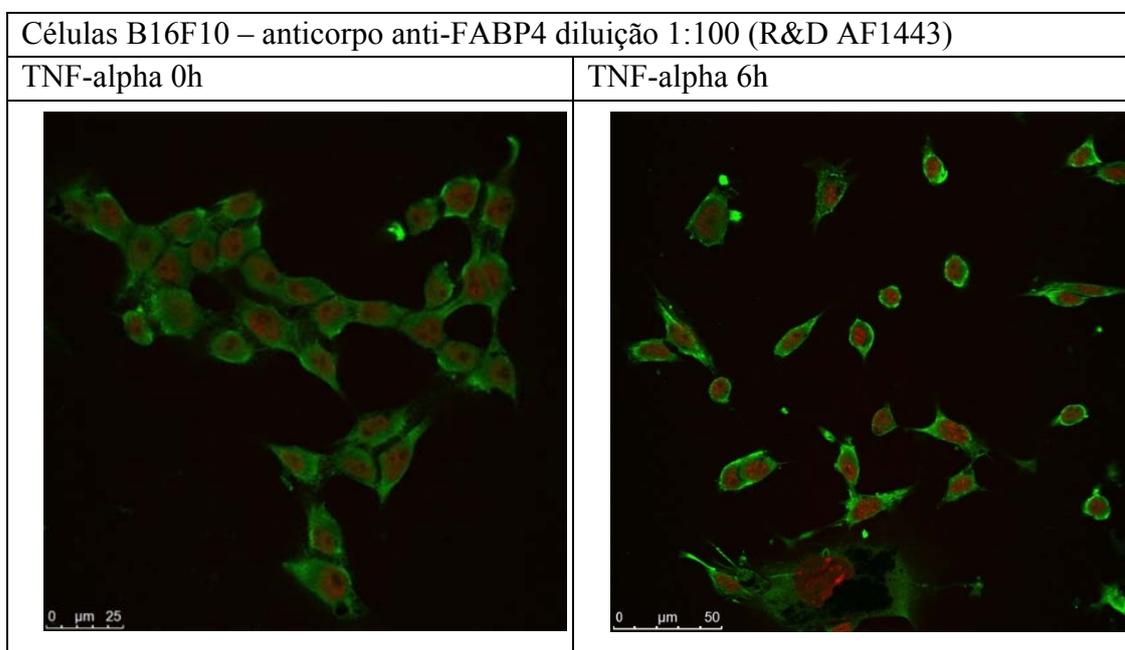
**Figura 38** - Imunofluorescência com anticorpo anti-PARD3 em células endoteliais.

Em **a)** evidencia-se fluorescência na cor verde representativa da proteína PARD3 nas células endoteliais nos controles sem tratamento; e em **b)** diminuição da fluorescência correspondente à diminuição da expressão proteica nas células tratadas com melfalano  $36,9 \mu\text{M}$ .

Os resultados de expressão do gene *Fabp4* demonstraram que para as culturas de células B16F10 e MDMEC, houve aumento da expressão no decorrer dos tempos de 3 a 12 horas com o TNF- $\alpha$   $100\text{ng/mL}$ . Para os macrófagos (IC-21), o efeito

observado foi de diminuição da expressão a partir de 03 horas de tratamento com TNF-alpha 100ng/mL.

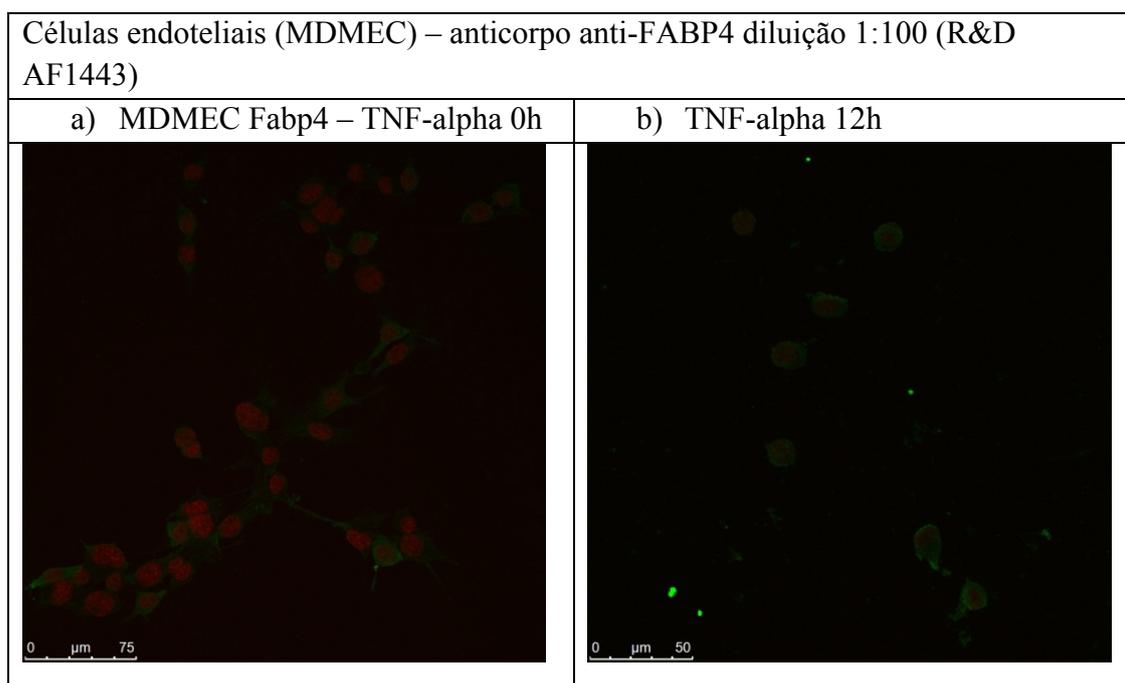
Nas culturas em monocamada das células de melanoma B16F10, observamos que houve expressão basal da proteína FABP4 em 15 minutos de exposição (0 hora) e houve um aparente aumento da expressão proteica em 6 horas de tratamento, evidenciada pela maior concentração de fluorescência intracitoplasmática (Figura 39).



**Legenda:** Células de melanoma B16F10 foram plaqueadas num total de  $1,0 \times 10^5$  células ressuspendidas em  $500 \mu\text{L}$  de meio DMEM-SBF10% sobre laminulas depositadas nos fundos dos poços de uma placa de 04 poços de 20mm/poço e submetidas ao tratamento com TNF-alpha 100ng/mL durante 15 minutos (0 hora) e 6 horas. Realizou-se imunofluorescência com o anticorpo primário *goat anti-mouse* anti-FABP4 e secundário fluorescente *rabbit anti-goat* (488). Leitura das lâminas em microscópio confocal Leica no comprimento de emissão de onda 488nm.

**Figura 39** - Imunofluorescência com anticorpo anti-FABP4 em células B16F10. Em **a)** evidencia-se fluorescência na cor verde representativa da proteína FABP4 nas células B16F10 nos controles sem tratamento; e em **b)** aumento da fluorescência em membrana equivalente ao aumento da expressão proteica nas células tratadas com TNF-alpha 100ng/mL.

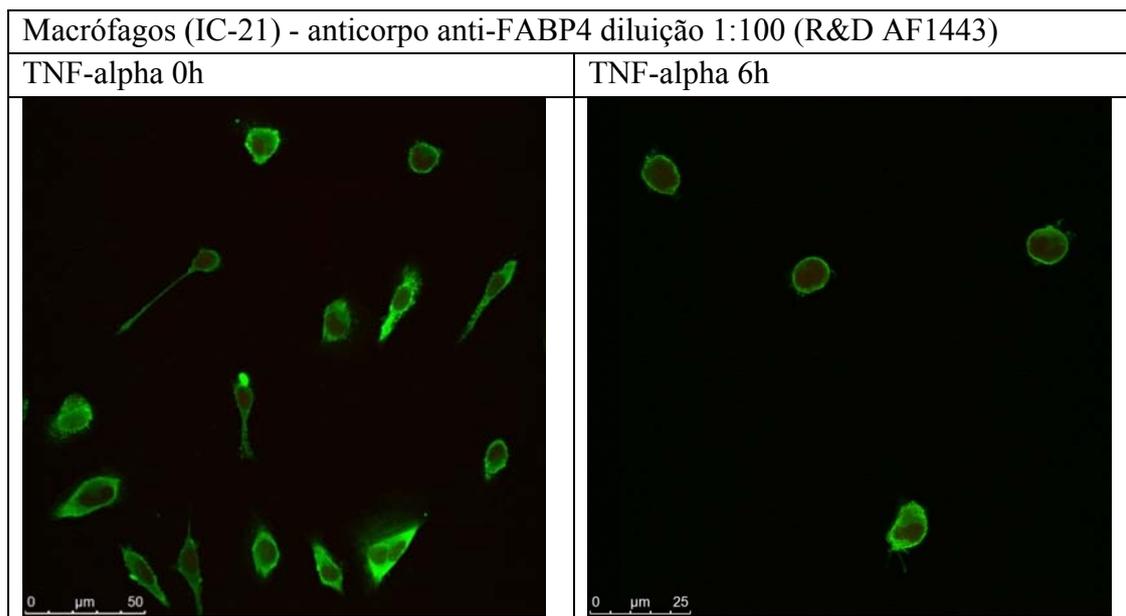
Nas células endoteliais, a marcação da proteína FABP4 pela imunofluorescência com os anticorpos utilizados foi muito baixa, tanto com 15 minutos de tratamento (0 hora) com TNF-alpha 100ng/mL, quanto após 12 horas de exposição, não sendo possível avaliar variações na expressão dessa proteína (Figura 40).



**Legenda:** Células endoteliais (MDMEC) foram plaqueadas num total de  $1,0 \times 10^5$  células ressuspendidas em  $500 \mu\text{L}$  de meio DMEM-SBF10% sobre laminulas depositadas nos fundos dos poços de uma placa de 04 poços de  $20\text{mm/poço}$  e submetidas ao tratamento com TNF-alpha  $100\text{ng/mL}$  durante 15 minutos (0 hora) e 12 horas. Realizou-se imunofluorescência com o anticorpo primário *goat anti-mouse* anti-FABP4 e secundário *rabbit anti-goat* (488). Leitura das lâminas em microscópio confocal Leica no comprimento de emissão de onda  $488\text{nm}$ .

**Figura 40** - Imunofluorescência com anticorpo anti-FABP4 em células endoteliais. Em **a)** e **b)** evidencia-se discreta fluorescência na cor verde representativa da proteína FABP4 nas células endoteliais com 15 minutos de exposição ao TNF-alpha  $100\text{ng/mL}$  e naquelas submetidas a 12 horas de exposição, não sendo possível avaliar variações na expressão de FABP4.

Para as culturas de macrófagos murinos (IC-21), evidenciamos fluorescência referente à expressão da proteína FABP4 em 15 minutos de exposição ao TNF-alpha 100ng/mL e a intensidade da fluorescência foi discretamente menor após 6 horas de tratamento com TNF-alpha (Figura 41).



**Legenda:** Células de macrófago murino (IC-21) foram plaqueadas num total de  $1,0 \times 10^5$  células ressuspendidas em  $500 \mu\text{L}$  de meio DMEM+SBF10% sobre lamínulas depositadas nos fundos dos poços de uma placa de 04 poços de 20mm/poço e submetidas ao tratamento com TNF-alpha 100ng/mL durante 15 minutos (0 hora) e 6 horas. Realizou-se imunofluorescência com o anticorpo primário *goat anti-mouse anti-FABP4* e secundário fluorescente *rabbit anti-goat (488)*. Leitura das lâminas em microscópio confocal Leica no comprimento de emissão de onda 488nm.

**Figura 41** - Imunofluorescência com anticorpo anti-FABP4 em células IC-21. Em **a)** evidencia-se fluorescência na cor verde representativa da proteína FABP4 nas células B16F10 nos controles sem tratamento; e em **b)** diminuição da fluorescência equivalente a diminuição da expressão proteica de FABP4 nas células tratadas com TNF-alpha 100ng/mL.

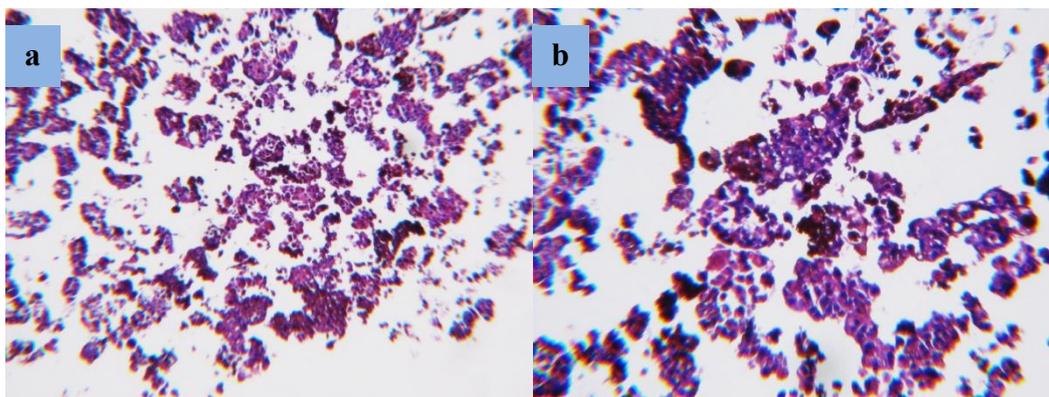
Após a realização dos experimentos de análise da expressão proteica por imunofluorescência, evidenciamos que as modificações da expressão gênica de *Pard3* se traduziram também na expressão da proteína PAR3. Tanto nas células de melanoma B16F10, quanto nas células endoteliais houve diminuição intensidade da fluorescência, correspondendo à diminuição da expressão protéica. Para o gene *Fabp4*, os ensaios de imunofluorescência demonstraram que houve expressão da proteína nas células de melanoma B16F10 e nos macrófagos (IC-21). Nas primeiras houve aumento da intensidade da fluorescência, correspondendo ao aumento da expressão intracitoplasmática da proteína FABP4; nos macrófagos, observamos uma discreta diminuição da intensidade da fluorescência intracitoplasmática, mas que seria compatível com diminuição da expressão da proteína. Para as células endoteliais, não foi observada expressão da proteína FABP4 com os anticorpos utilizados, não sendo possível avaliar modificações nessa linhagem.

## **5.9 EXPRESSÃO PROTEICA POR IMUNOFLUORESCÊNCIA DOS GENES PARD3 E FABP4 EM ESFERÓIDES DE CÉLULAS B16F10 E ESFERÓIDES MISTOS**

Buscamos avaliar se o perfil de expressão dos genes *Pard3* e *Fabp4* observado nas culturas tridimensionais também se correlacionou com a expressão das respectivas proteínas após os tratamentos com TNF-alpha e melfalano.

Executamos os protocolos de estabelecimento dos esferóides da linhagem B16F10 e dos esferóides contendo dois (B16F10-MDMEC) e três tipos celulares (B16F10-MDMEC-IC-21). Após os tratamentos, aspiramos o meio, lavamos com

PBS 1x por 02 vezes e fixamos com PFA 4% por 20 minutos. Observamos que durante os tratamentos os esferóides se fragmentavam, com fragmentação ainda maior durante a etapa de fixação, sendo desfeita a estrutura tridimensional dos mesmos. Apesar disso, preparamos lâminas de HE para avaliar a morfologia das culturas após os tratamentos avaliados. Após visualização das lâminas HE das culturas tridimensionais tratadas, constatamos fragmentação completa dos esferóides. Registramos imagens das lâminas com microscópio adaptado para captura fotográfica. A seguir a imagem de esferóides B16F10-MDMEC com 6 horas de exposição ao tratamento com melfalano 36,9 $\mu$ M, exemplificando o padrão de fragmentação das estruturas esferoidais (Figura 42).



**Legenda:** Células de melanoma B16F10 e células endoteliais (MDMEC) foram cocultivadas em placas 96 poços de fundo chato, preparadas com gel de agarose LMP 1% 100 $\mu$ L/poço, na concentração 3,0x10<sup>3</sup>células/poço utilizando-se o protocolo da gota invertida. Após 07 dias, os esferóides formados de cada placa foram transferidos para um tubo eppendorf de 1,7mL contendo meio DMEM+SBF10%, que representou o grupo controle e outro tubo contendo o melfalano 36,9 $\mu$ M durante 6 horas. Após o período de tratamento, foi realizada fixação das culturas com PFA 4% e posteriormente preparadas lâminas HE, registrando-se as imagens em microscópio adaptado para captura fotográfica.

**Figura 42** - Histoquímica (HE) de esferóides de células B16F10 e MDMEC. Em **a)** observa-se fragmentos de esferóides B16F10-MDMEC submetidos ao tratamento com melfalano 36,9 $\mu$ M por 6 horas (objetiva de 4x) e em **b)** detalhe da extensa fragmentação dos esferóides B16F10-MDMEC. (objetiva 10x).

Perante tal achado, decidimos não proceder com os experimentos de imunofluorescência nos cultivos tridimensionais, pois não poderíamos garantir que o padrão de expressão observado seria o mesmo do obtido com os esferóides intactos, não sendo um modelo confiável de avaliação da expressão proteica.

## **5.10 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS B16F10, UTILIZANDO-SE UM INIBIDOR DE FABP4**

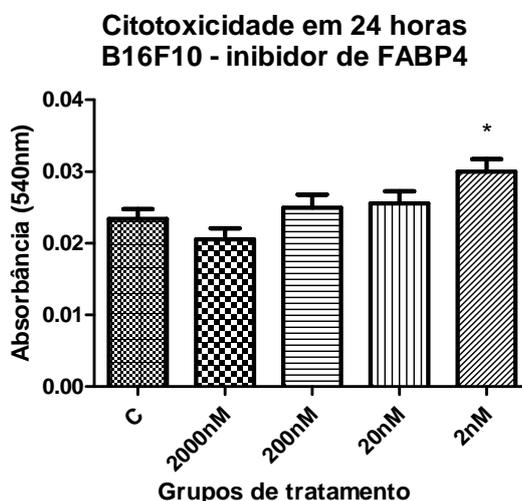
Tomando novamente como base, os resultados de expressão dos genes *Pard3* e *Fabp4* e correspondente expressão proteica dos mesmos, definimos esses genes como potenciais alvos terapêuticos para tratamento do melanoma. Buscamos a disponibilidade comercial de drogas que tivessem esses genes e proteínas como alvos.

Encontramos apenas uma droga inibidora da proteína FABP4, o bifenilazol-oxiacetado (#sc-202606® (Santa Cruz Biotechnology) que atua como inibidor potente e seletivo de FABP, por bloquear o sítio de ligação desta proteína. Para *PARD3* não identificamos nenhuma droga específica.

Realizamos o ensaio de citotoxicidade conforme o descrito para as drogas melfalano e TNF- $\alpha$ , testando-se as doses de 2nM a 2000nM, conforme sugestão do fabricante.

Observamos após 24 horas de tratamento com inibidor de FABP4 que o houve menor proporção de células viáveis na dose de 2000 $\mu$ M, embora sem atividade citotóxica significativa. As doses inferiores (200nM e 20nM) pareceram estimular a proliferação, mas não resultando em significância estatística. A dose de

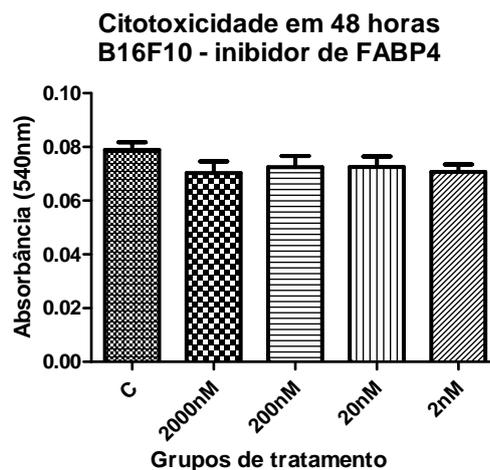
2nM apresentou efeito proliferativo significativo ( $p < 0.05$ ), como representado na Figura 43.



**Legenda:** Células B16F10 foram cultivadas numa placa 96 poços fundo chato na concentração  $3,0 \times 10^3$  células/poço e em sextuplicata para cada grupo de tratamento. O gráfico representa o resultado de 02 ensaios de citotoxicidade com inibidor de FABP4. C = grupo controle; doses de inibidor de FABP 2000nM, 200nM, 20nM e 2nM; \*= $p < 0,05$ .

**Figura 43** - Ensaio de citotoxicidade em células B16F10 com doses escalonadas de inibidor de FABP4, evidenciando-se efeito citotóxico não significativo na dose 2000nM e efeito proliferativo na dose 2nM significativo.

No ensaio de citotoxicidade com inibidor de FABP4 após 48 horas de tratamento, não observamos efeito citotóxico significativo em nenhuma das concentrações testadas, embora com menor quantidade de células viáveis nos grupos tratados com inibidor. Interessantemente o efeito de estímulo à proliferação do inibidor de FABP4 verificado em 24 horas com a dose de 2nM foi perdido após as 48 horas do tratamento (Figura 61).



**Legenda:** Células B16F10 foram cultivadas numa placa 96 poços fundo chato na concentração  $3 \times 10^3$  células/poço e em sextuplicata para cada grupo de tratamento. O gráfico representa o resultado de 2 ensaios de citotoxicidade com inibidor de FABP4. C = grupo controle; doses de inibidor de FABP 2000nM, 200nM, 20nM e 2nM.

**Figura 44** - Ensaio de citotoxicidade em células B16F10 com doses escalonadas de inibidor de FABP4, evidenciando-se efeito citotóxico não significativo do inibidor em todas as doses testadas. Nota-se também a perda do efeito proliferativo verificado com a dose de 2nM do inibidor no ensaio de 24 horas de tratamento.

Embora não proposto nos objetivos iniciais do trabalho, a citotoxicidade com inibidor de FABP4 foi realizada com o objetivo indicado no parágrafo inicial deste tópico. Com os resultados, verificamos que houve estímulo ao crescimento celular com a dose de 2nM após 24 horas de exposição, o que não foi evidenciado com doses superiores ou maiores períodos de tratamento (48 horas). Ponderamos que doses mais elevadas do inibidor ou o maior tempo de exposição à droga possam interferir em outras vias ligadas diretamente ou indiretamente a FABP4, interferindo com a homeostase celular, inibindo o crescimento.

## 6 DISCUSSÃO

O melanoma avançado é uma neoplasia maligna de prognóstico ruim com apenas 5% a 10% dos pacientes com doença metastática sobrevivendo 5 anos. Trata-se de um tumor caracteristicamente resistente aos tratamentos quimioterápicos vigentes, com respostas modestas e até mesmo ausentes.

A resistência tumoral aos quimioterápicos tem sido um grande obstáculo ao sucesso do tratamento do câncer, sendo alvo de pesquisas na oncologia até o presente e, nesse contexto, torna-se importante a busca de modelos que possibilitem compreender o comportamento da célula e microambiente tumorais.

Tomando-se como base os resultados de LIMA (2007), durante a qual se verificou que um grupo de genes foi diferencialmente expresso em melanoma murino (B16F10) quando exposto ao tratamento com melfalano (MEL) e TNF, aplicando-se a técnica de *oligonucleotide microarray*. Observou-se também que o padrão de expressão desses genes nas células tratadas *in vitro* diferiu do observado *in vivo*. Tais achados nos levaram a considerar que fatores ligados ao microambiente tumoral poderiam interferir diretamente na expressão gênica do melanoma, ou ainda que células presentes nesse microambiente tiveram genes modulados pelos referidos tratamentos. Propusemos, para testar essa hipótese, uma série de ensaios de citotoxicidade e proliferação e de expressão gênica e proteica, utilizando células de melanoma (B16F10), células endoteliais (MDMEC) e macrófagos (IC-21) isogênicas à linhagem de melanoma, cultivado-as em monocamada e em cultivos tridimensionais; e expondo-as ao tratamento com as drogas melfalano (MEL) e TNF,

seja em meio de cultura suplementado com SBF10% ou em meio condicionado por cada linhagem. Buscamos, com isso, estabelecer modelos capazes de avaliar a célula neoplásica e parte das interações do microambiente tumoral no contexto do tratamento quimioterápico, considerando a angiogênese (células endoteliais) e inflamação (macrófagos) como os processos mais relevantes nesse sistema.

A utilização de meios condicionados objetivou analisar como substâncias produzidas pelas células tumorais, células endoteliais e macrófagos interfeririam no comportamento de cada linhagem em tratamento. Já a utilização do modelo de esferóides celulares se pautou no entendimento de que os cultivos em três dimensões poderiam oferecer um cenário próximo ao observado em microrregiões tumorais, que diferem em muito dos cultivos em monocamada por sua estrutura de interação célula-célula. Esse modelo tem sido empregado para avaliação de drogas antitumorais e de mecanismos de resistência tumoral com resultados relevantes e já foi testado em linhagens de câncer de mama (MCF-7), adenocarcinoma de colon (HT-29) e carcinoma de pulmão de pequenas células (H1299) com sucesso (WONG et al. 2012).

Graças ao potencial envolvimento em mecanismos relacionados à carcinogênese e proliferação tumoral, selecionamos a partir dos genes que foram modulados nos experimentos de LIMA (2007), um grupo de genes (Ifi202b, Pard3, Arhgef6, Igf2bp3, Flt-1 e Fabp4) para validação de expressão gênica pela técnica de *real-time-PCR*. Desenhamos experimentos de cinética de expressão para esses genes com intervalos de exposição aos tratamentos com melfalano e TNF de 15 minutos a 12 horas, tanto com a célula tumoral, quanto com endotélio e macrófagos, em cultivos de monocamada com meio padrão (DMEM+SBF10% ou RPMI+SBF10%),

com meio condicionado por cada linhagem e em cultivos tridimensionais. Ao observar intervalos maiores de exposição aos tratamentos, procuramos caracterizar melhor o padrão de expressão gênica em resposta aos tratamentos, visto que o registro pontual (num único tempo, como realizado durante a tese de doutorado citada previamente) de aumento ou diminuição de expressão poderia não representar o comportamento real de tal expressão.

Para realização dos experimentos propostos, parte do projeto foi voltada ao estabelecimento dos modelos experimentais. Das linhagens escolhidas, apenas as células de melanoma (B16F10) e de macrófago (IC-21) estavam disponíveis comercialmente, sendo então necessário o isolamento de células endoteliais isogênicas com as demais. Pela técnica de separação imunomagnética, uma população de células primárias foi isolada da derme de camundongos C57BL/6, que são isogênicos a linhagem de melanoma B16F10. Para garantir que se tratavam de células endoteliais de fato, os ensaios de tubulogênese em matrigel, avaliação de expressão gênica por *real-time-PCR* do gene constitutivo *Nos3* (óxido nítrico sintase-3), marcação por imunofluorescência com anticorpo anti-CD31 e imunohistoquímica com os anticorpos anti-CD105 e anti-fator de Von Willenbrand foram realizados. O gene e todas as proteínas citadas são características das células endoteliais e se encontram permanentemente expressas, sendo utilizados como marcadores dessas células (CHA et al. 2005). O sucesso em todos os ensaios propostos confirmou a natureza endotelial da linhagem, sendo nomeadas *murine derived microvascular endothelial cell* (MDMEC). Consideramos que foram indispensáveis todos os passos de caracterização empregados, pois uma linhagem isolada erroneamente comprometeria completamente a interpretação dos resultados

dos experimentos. O ensaio de angiogênese (tubulogênese), por exemplo, embora não totalmente específico para células endoteliais, permite a distinção dessas células de outros tipos celulares que comumente contaminam o cultivo nos processos de isolamento celular, sendo os contaminantes mais comuns os fibroblastos, células essas que se apresentam caracteristicamente em arranjos cubiformes, não formando túbulos (DONG et al. 1997).

Ao iniciarmos os cultivos de endotélio, observamos que as células primárias apresentavam crescimento lento e que rapidamente se tornavam senescentes. Propomos a imortalização da linhagem com o vetor E7 de HPV16 proveniente do sobrenadante de fibroblastos Bosc23. Escolhemos essa abordagem, para garantir reprodutibilidade dos sucessivos ensaios que seriam realizados à jusante, visto que o isolamento das células primárias a cada *round* de experimentos não seria financeiramente e cronologicamente viável, além de resultar na utilização de um número proibitivo de camundongos para os experimentos. Além disso, a utilização de E7 não parece provocar instabilidade genômica nas células transfectadas quando comparadas às estratégias de imortalização induzidas por agentes químicos ou físicos, conforme mencionado no trabalho de (YAMAMOTO et al. 2003).

Com todas as três linhagens disponíveis, foram estabelecidos os cultivos tridimensionais. Como dito, a utilização de culturas 3D tem sido empregada na pesquisa de drogas contra o câncer, servindo de boa interface entre a experimentação *in vitro* versus *in vivo*, diminuindo assim a utilização de animais e permitindo a manipulação de diversas variáveis com resultados mais imediatos que a experimentação *in vivo* (MARRERO et al. 2009). Apesar de considerável aplicação e reprodutibilidade do modelo em diversas publicações, ao nosso conhecimento, a

abordagem envolvendo coculturas tridimensionais com células de melanoma, células endoteliais e macrófagos é inédita. Ao final da padronização, obtivemos sucesso no estabelecimento dos esferóides compostos por melanoma (B16F10) apenas, por 2 linhagens (B16F10+MDMEC) e pelas 3 linhagens. Para caracterização morfohistológica dessas estruturas, preparamos lâminas coradas com hematoxilina-eosina (vide anexo 9) e constatamos que os esferóides de células B16F10 apresentam duas regiões, uma periférica composta por camadas de células de citoplasma irregular e outra interna, representada por uma cavidade central, contendo debris celulares no seu interior, sugestivos de necrose celular. Além disso, esses esferóides são pouco coesos, apresentando maior fragmentação durante o processo de fixação. Aos moldes do que foi visto para a linhagem B16F10, vimos que os esferóides de células de melanoma e células endoteliais (B16F10+MDMEC) também são compostos por duas regiões celulares, mas o aspecto do esferoide neste grupo é mais coeso. Em sua camada periférica, duas populações de células foram observadas: uma com citoplasma basofílico e irregular e outra com citoplasma mais eosinofílico e formato arredondado. Verificamos também a formação de estruturas semelhante à microvasos nas camadas de células periféricas de alguns esferóides, sugerindo uma diferenciação das células endoteliais em estruturas vasculares. Nos esferóides compostos pelas três linhagens celulares (B16F10+MDMEC+IC-21) manteve-se o aspecto coeso e a presença de duas regiões celulares distintas, mas vimos que, na camada periférica deste cultivo, além da presença de estruturas capilariformes, existem células com prolongamentos citoplasmáticos intercelulares e repletos de melanina, sugerindo melanófagos (macrófagos). A característica de maior coesão intercelular das coculturas 3D, quando comparadas aos esferóides composto por

melanoma apenas, poderia ser explicada pelo fato de as células tumorais apresentarem um padrão de crescimento mais desordenado, ao passo que as células endoteliais e macrófagos, interagindo com as células de melanoma, preservariam melhor a organização tecidual habitual, facilitando as interações célula-célula, ou organizando mais eficiente a matriz extracelular.

Com os resultados da caracterização histológica, constatamos que houve diferença considerável na estrutura dos esferóides de melanoma quando comparados aos esferóides formados por mais de uma linhagem, no que tange a maior coesão intercelular e ao aspecto das estruturas celulares periféricas das coculturas, com a formação de arranjos capilariformes e presença melanófagos. Além disso, verificamos que, com o crescimento do esferoide, as células mais periféricas se mantêm viáveis; ao passo que as células da camada central, privadas de maior aporte de nutrientes do meio de cultura, tornam-se necróticas. Essas observações sugerem que esse modelo em muito se assemelha às características observadas nas lesões tumorais *in vivo*, onde existe um gradiente de células tumorais proliferativas, situadas mais próximo da periferia do tumor e um grupo de células situadas em regiões mais centrais da lesão, que sofrem os efeitos da hipóxia e da privação de nutrientes, tornando-se assim quiescentes ou mesmo evoluindo para apoptose. Características semelhantes foram descritas por (WONG et al. 2012) que, utilizando esferóides de células pancreáticas humanas BON-1, observaram a presença de duas regiões celulares e, através da marcação imunohistoquímica dos esferóides com Ki-67 e caspase-3 clivada, verificaram que a região central apresentou forte marcação para caspase-3, sendo compatível com necrose, ao passo que, as células da periferia tiveram marcação positiva para Ki-67, representando atividade proliferativa nessa

região (WONG et al. 2012). Achado semelhante também foi relatado por (FRONGIA et al. 2009) que, utilizando um inibidor da fosfatase CDC25, descreveram maior atividade proliferativa em regiões periféricas de esferóides de células carcinoma de cólon (HCT116) (FRONGIA et al. 2009). Consideramos provável que a heterogeneidade desses fenótipos celulares, com parte das células assumindo um comportamento quiescente e não evoluindo para necrose seja responsável em parte pela resistência tumoral às drogas. Por outro lado, ponderamos que o cultivo tridimensional não é capaz de substituir completamente a experimentação *in vivo*, pois, embora tenhamos evidenciado estruturas capilariformes nos esferóides compostos por células endoteliais, é mais provável que esses cultivos se comportem como estruturas avasculares, por não existir um fluxo contínuo de meio/nutrientes nessas estruturas, diferindo do tumor *in vivo* nesse aspecto.

Partindo para análise de citotoxicidade, iniciamos os experimentos nos cultivos em monocamada, utilizando meio padrão DMEM+SBF10% (células endoteliais e melanoma) e RPMI+SBF10% (macrófagos). Comparando com os controles sem tratamento, observamos, para as células de melanoma, que o melfalano (MEL) apresentou atividade citotóxica significativa com a dose de 36,9 $\mu$ M e o TNF com a dose 100ng/mL, sendo a citotoxicidade deste último inferior ao de MEL, mas ainda significativa. Evidenciamos também que o efeito citotóxico foi potencializado pela associação de ambas as drogas, sendo superior ao de cada droga isoladamente. O maior potencial citotóxico de MEL e TNF é congruente com os relatos das respostas obtidas nos pacientes com melanoma localmente avançado, submetidos ao tratamento de perfusão isolada de membro, onde melfalano isoladamente apresenta taxas de resposta completa de 30 a 54%, mas, quando em associação com TNF, essa

resposta aumenta para cerca de 70 a 90% (BARBOUR et al. 2009; DEROOSE et al. 2011).

Nossos resultados de citotoxicidade *in vitro* são compatíveis com os achados *in vivo* de (GUTMAN et al. 1997) que, injetando células B16F10 no subcutâneo de camundongos, testaram a atividade antitumoral de MEL e TNF isoladamente e em combinação e observaram um efeito sinérgico dessas drogas no modelo proposto, com diminuição do volume das lesões tumorais de 16% no grupo tratado com TNF, 25% no grupo tratado com MEL e de 75% no tratamento combinado (GUTMAN et al. 1997).

Constatamos um padrão de citotoxicidade celular semelhante ao obtido nas células B16F10 nos ensaios realizados com células endoteliais, mantendo-se atividade significativa de todas as drogas, mas com uma aparente maior citotoxicidade do TNF. Já para os macrófagos IC-21, apenas a citotoxicidade de MEL e da associação MEL e TNF mantiveram-se estatisticamente significativas e foram, proporcionalmente, menores quando comparadas as demais linhagens, ao passo que o tratamento com TNF isoladamente não apresentou atividade citotóxica, aparentando inclusive preservar a quantidade de células viáveis observada nos controles sem tratamento.

O maior efeito citotóxico de TNF observado nas células endoteliais é compatível com os relatos da literatura. MENON et al. (2006) avaliaram o efeito antitumoral de TNF em melanoma humano e observaram que o TNF causou dano seletivo à vasculatura tumoral, rompendo complexos adesivos de VE-caderina das células endoteliais e aumentando a permeabilidade vascular (MENON et al. 2006). Em outro trabalho, (STROKA et al. 2012) avaliaram o comportamento de células

endoteliais HUVEC sob tratamento com TNF, constatando que essas células sofreram modificações na sua morfologia, com reorganização dos filamentos de F-Actina, aumento do volume celular e da permeabilidade vascular (STROKA et al. 2012). Além disso, descreve-se que TNF pode induzir duas formas de morte celular: apoptose caspase-dependente, levando a condensação da cromatina, fragmentação e formação de corpos apoptóticos e outra caspase independente, caracterizada por necrose na ausência de condensação e de fragmentação da cromatina que poderiam ser responsáveis pelo dano observado nas células endoteliais (MOCELLIN et al. 2005; ROWINSKY 2005).

Avaliando o comportamento apresentado pelos macrófagos, a ausência de atividade citotóxica significativa observada após o tratamento com TNF, havendo talvez um estímulo a proliferação é interessante. De fato, o TNF é uma citocina de papel importante durante a resposta inflamatória, podendo atuar como fator estimulante de macrófagos e monócitos, promovendo sobrevivência celular através da ativação de vias de proliferação e inibição de apoptose dependentes de NFkB, PI3K/AKT e MAPK (MOCELLIN et al. 2005). Consideramos que esse efeito seria responsável pela ausência de atividade citotóxica do TNF na linhagem de macrófago (IC-21) testada.

De posse dos resultados de citotoxicidade em monocamada com meio suplementado com SBF10%, avaliamos a atividade citotóxica das drogas, utilizando os meios condicionados por cada linhagem. Como descrito nas etapas de padronização, não foi possível o condicionamento do meio sem a suplementação de soro bovino fetal, pois as células de melanoma morreram após 24 horas no meio sem soro, fazendo-se necessária a suplementação com 2% de SBF. Para garantir a

homogeneidade de condições dos experimentos, suplementamos os meios condicionados pelas demais linhagens (MDMEC e IC-21) também com SBF a 2%. Observamos que as células de melanoma sofreram importante influência dos meios condicionados, com modificação do padrão de citotoxicidade observado com meio com SBF10%.

Quando utilizado o meio condicionado por células endoteliais, houve maior atividade citotóxica de TNF, inclusive sendo superior àquela obtida com MEL. Da mesma forma, também foi observada uma maior atividade citotóxica da associação de MEL e TNF. Nos experimentos utilizando meio condicionado por macrófagos, o padrão também foi modificado, havendo agora diminuição do efeito citotóxico de MEL e da associação MEL e TNF, com mais células viáveis, embora mantendo a significância estatística em relação ao grupo controle. A atividade de TNF manteve-se praticamente inalterada. Comparando os ensaios com o meio condicionado por células endoteliais e o por macrófagos, observamos padrões distintos de citotoxicidade, sugerindo que substâncias produzidas por cada linhagem alteraram a sensibilidade das células de melanoma às drogas. Acreditamos ser pouco provável que a menor concentração de SBF nos meios condicionados fosse responsável por tal modificação, pois, se assim fosse, o padrão de citotoxicidade dos meios condicionados seria o mesmo independente da linhagem que o condicionou.

Continuando os experimentos com meio condicionado, testamos as células endoteliais em meio condicionado por melanoma e por macrófago e observamos que, com o meio condicionado por melanoma, mantiveram-se a atividade citotóxica de MEL e da associação MEL e TNF, mas houve redução da atividade citotóxica de TNF com perda da significância estatística quando comparada aos controles sem

tratamento. Quando utilizamos meio condicionado por macrófagos, novamente não houve citotoxicidade significativa promovida por TNF, havendo aparentemente maior número de células viáveis. Nos tratamentos contendo MEL e MEL+ TNF, a atividade citotóxica foi proporcionalmente maior a observada com meio com soro apenas. Nos experimentos de citotoxicidade com macrófagos, o meio condicionado por melanoma não modificou o perfil de citotoxicidade, preservando a atividade de MEL e da associação MEL e TNF, porém, no meio condicionado por células endoteliais, apenas MEL manteve atividade, não se observando citotoxicidade significativa com TNF ou MEL+TNF.

Analisando os resultados dos ensaios de citotoxicidade em meio condicionado, constatamos que, interessantemente, o meio condicionado por células endoteliais deixou as células de melanoma mais susceptíveis aos efeitos do TNF, sugerindo que fatores produzidos pelo endotélio presentes no meio condicionado determinariam uma maior sensibilidade das células de melanoma a essa citocina. No nosso trabalho não foi possível se determinar os mecanismos subjacentes a esse achado, pois, embora proposta no desenho do projeto inicial, a dosagem de citocinas no meio condicionado não foi executada pela complexidade do trabalho, em termos de cronograma e custos. Mas propomos que o meio condicionado por endotélio poderia aumentar a sensibilidade do melanoma ao TNF, através da expressão de receptores, como, por exemplo, o receptor 1 de TNF (TNFR-1), estimulando processos de apoptose via TRADD (*TNF receptor associated death domain*) (VAN HORSSSEN et al. 2006). Em um trabalho executado por (RUGGIERO et al. 1987) utilizando linhagens tumorais, foi observado que o número relativo de receptores de TNF presentes em cada linhagem tumoral determinou sua sensibilidade ao efeito

citotóxico dessa citocina. Quando expondo a linhagem de carcinoma de cólon HT-29 ao pré-tratamento com IFN $\gamma$  por 5 horas, observaram que houve um aumento de 3 vezes na quantidade de receptores de TNF nas células testadas e que, ao mesmo tempo, foi verificado efeito citotóxico com doses 3 vezes menores de TNF. Com isso os autores indicaram que a expressão de receptores de TNF induzidos por IFN $\gamma$  poderiam estar envolvidos na resposta citotóxica. No mesmo trabalho, foi avaliado o efeito citotóxico de TNF em uma linhagem de melanoma (ME-180) pré-tratada com o inibidor de síntese protéica cicloheximidina, verificando a ligação de TNF marcado com I<sup>125</sup> nessas células. Os autores constataram que a inibição da síntese proteica resultou em grande diminuição da ligação do TNF, com poucos receptores sendo detectados após 2 horas de exposição ao inibidor, mas com recuperação dos mesmos após substituição com meio fresco. Viram também que o efeito citotóxico de TNF foi reduzido em cerca de 50%, quando o número de receptores foi reduzido em 90% e praticamente abolido com o uso de cicloheximidina por 2 horas, indicando que a atividade citotóxica de TNF é inibida quando o número de receptores cai a um nível crítico (RUGGIERO et al. 1987).

Para as células endoteliais, o meio condicionado por macrófagos, manteve uma maior proporção de células viáveis após exposição ao TNF, sugerindo a preservação da atividade proliferativa dessas células em comparação com os controles sem tratamento. Nesse contexto, acreditamos que esse comportamento resultou no maior efeito citotóxico observado para os tratamentos com MEL e com a associação de MEL e TNF, pois as células endoteliais, mantendo-se em divisão celular, estariam mais suscetíveis ao melfalano, uma droga que atua como alquilante de DNA, induzindo apoptose durante as fases de síntese e replicação. A hipótese de

maior proliferação endotelial no meio condicionado por macrófagos se apoi em dados descritos previamente na literatura. Sabe-se que os macrófagos intratumorais contribuem para a angiogênese, por produção de fatores ligados a neovascularização como VEGF, FGF, TGF $\beta$  e metaloproteases (SICA et al. 2008). Em experimentos utilizando modelos xenográficos de melanoma humano em camundongos, (GAZZANIGA et al. 2007) constataram que a inibição da citocina MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), ligada ao recrutamento de monócitos e macrófagos, promoveu redução significativa da angiogênese tumoral, quando comparada a tumores não tratados e observaram também que a inibição dessa proteína abortou a formação de túbulos *in vitro* pelas células endoteliais em matrigel (GAZZANIGA et al. 2007). Na conclusão dos ensaios em meio condicionado, pudemos averiguar que os macrófagos IC-21, tanto no meio padrão quanto nos meios condicionados, apresentaram maior resistência às drogas testadas, com maior proporção de células viáveis nos tratamentos com MEL e ausência de efeito citotóxico com TNF.

Para a citotoxicidade realizada em culturas tridimensionais, observamos que os esferóides de B16F10 apresentam maior resistência a todos os tratamentos testados, caracterizada pela perda da atividade de TNF e pela menor atividade MEL e da associação MEL+TNF, quando comparadas aos cultivos em monocamada. Um padrão semelhante de resistência aos tratamentos também foi observado nos esferóides compostos pelas 3 linhagens (B16F10+MDMEC+IC-21), com menor atividade do MEL e da associação MEL+TNF e perda de atividade de TNF. Nas coculturas tridimensionais compostas por B16F10+MDMEC, não houve atividade citotóxica dos tratamentos contendo MEL e TNF isoladamente, permanecendo significativa apenas a associação MEL+TNF.

De maneira geral, tais dados são consistentes com um padrão de resistência celular aos tratamentos proporcionado pelo cultivo tridimensional. Acreditamos que isto seja atribuível a uma menor penetração das drogas nos esferóides, com a configuração tridimensional das células *in vitro* mimetizando o microambiente tumoral, havendo maior adesão intercelular, e também por conferir fenótipos celulares mais resistentes ao efeito citotóxico. Em trabalho publicado em 2008, HERRMANN et al., avaliaram a resposta de células HCT-116 a diferentes compostos (cisplatina, 5FU, azacitidina, mitoxantrona, tamoxifeno) e observaram, para todas as drogas avaliadas, que, após 24 horas de exposição aos tratamentos, os esferóides apresentaram maior número de células viáveis e menos apoptose quando comparados aos resultados obtidos de células cultivadas em monocamada. Os autores concluíram que a menor penetração de algumas drogas nos esferóides é responsável por conferir resistência ao tratamento (HERRMANN et al. 2008). Em publicação anterior, KOBAYASHI et al. 1993 demonstraram que os esferóides gerados de sublinhagens de carcinoma mamário murino (EMT-6), que foram mais resistentes aos quimioterápicos ciclofosfamida e cisplatina, manifestaram estrutura mais compacta e que o tratamento dessas células, desagregadas com tripsina, acarretou em perda de parte das propriedades de resistência (KOBAYASHI et al. 1993). Além disso, descrevemos anteriormente que as regiões celulares dos esferóides, uma central e necrótica e outra com células periféricas viáveis, indicariam a presença de um gradiente de distribuição de nutrientes e oxigênio, o que tornaria parte das células tumorais quiescentes e menos susceptíveis aos tratamentos citotóxicos. Consideramos que essas observações se aplicam aos achados de citotoxicidade nos

cultivos tridimensionais, sejam eles compostos por melanoma, por B16F10+MDMEC ou pelas 3 linhagens.

Com finalidade de averiguar a proporção do efeito citotóxico observado nos ensaios com MTT que seria atribuível a inibição da proliferação celular, utilizamos um kit para avaliação colorimétrica da incorporação de BrdU durante a síntese de DNA. De maneira geral, esses experimentos revelaram que a atividade citotóxica vista nas células cultivadas em monocamada com os tratamentos contendo melfalano (MEL isoladamente e MEL+TNF) deve-se principalmente à inibição da proliferação celular e que o TNF, por outro lado, exerce um menor efeito anti-proliferativo que é observado apenas nas células de melanoma, seja em meio condicionado ou em meio com soro.

Já nos cultivos de endotélio, com meio padrão e com meios condicionados por melanoma ou macrófago, o TNF não apresenta atividade anti-proliferativa. Assim sendo, o efeito citotóxico observado por TNF isoladamente na célula endotelial cultivada em meio simples poderia ser atribuído a dano celular direto, induzindo apoptose (MOCELLIN et al. 2004).

Com os macrófagos, constatamos que TNF não apresenta atividade anti-proliferativa em nenhum dos meios testados, aparentando haver, a princípio, um estímulo à proliferação dessas células principalmente quando utilizando os meios condicionados, embora não estatisticamente significativo. Testando a atividade antiproliferativa das drogas nas coculturas tridimensionais, observamos uma importante redução do efeito anti-proliferativo exercido pelo melfalano e manteve-se a ausência de atividade de TNF, quando comparada aos cultivos em monocamada,

resultados semelhantes aos obtidos nos ensaios de citotoxicidade e, provavelmente, explicamos de maneira semelhante.

Partindo para análise de expressão gênica, nos cultivos em monocamada de células B16F10, não observamos expressão dos genes *Arhgef6* e *Ifi202b*, não reproduzindo assim os achados observados *in vivo* (LIMA 2007). Quando avaliamos o gene *Flt1*, constatamos baixa ou mínima expressão desse gene nesses cultivos. Os dados obtidos anteriormente na tese do Dr. Vladimir Lima indicaram, em amostras de tumor derivadas da linhagem de melanoma B16F10 *in vivo*, que houve diminuição da expressão de *Flt1* com expressão relativa (ER)  $<2,0$  e  $p < 0,05$ , para os tratamentos com TNF. Todavia, foi proposto que a expressão não se deveu às células tumorais de melanoma, mas possivelmente pelas células do estroma tumoral, já que, no referido estudo, não se observou modificação da expressão deste gene nas células de melanoma cultivadas *in vitro* em resposta ao tratamento citado. No nosso trabalho, a expressão de *Flt1* foi identificada nas células endoteliais e macrófagos, corroborando a hipótese de que são as células estromais as responsáveis pela expressão de *Flt1*, mas apenas o endotélio teve a expressão modificada pelo TNF, apresentando aumento após 6 horas de exposição ao tratamento. Os nossos resultados são contrários aos observados por LIMA em 2007, fato que poderia ser atribuído às diferenças do cultivo *in vitro*. Por outro lado, estudos experimentais revelam que a proteína de membrana FLT-1 (VEGFR-1) apresenta grande afinidade por VEGF e que, em situações fisiológicas, atuaria como falso receptor, impedindo a ligação da molécula de VEGF com VEGFR2, esse último sabidamente relacionado a sinais mitogênicos e angiogênese. Como resultado, FLT-1 atuaria na inibição da angiogênese fisiológica, como um modulador negativo da ativação VEGFR2

(MENENDEZ et al. 2006; TAKENAKA et al. 2007). Nesse sentido, o aumento da expressão de Flt1 nas células endoteliais pelo TNF poderia induzir diminuição da angiogênese, o que implicaria no bloqueio da vascularização e nutrição tumorais. Esses processos são, de certa forma, compatíveis com os achados do efeito de TNF nos tratamentos de melanoma cutâneo com perfusão isolada de membro, onde se verifica dano vascular extenso e necrose nas lesões tumorais (ROSSI et al. 2008).

O gene *Imp3* apresentou expressão irregular em células B16F10 cultivadas em monocamada, mas identificamos que o tratamento com melfalano inibiu a expressão do gene a partir de 3 horas de exposição. Para as células endoteliais, também observamos o padrão diminuição da expressão com os tratamentos contendo melfalano a partir de 3 horas de exposição ao tratamento. Esses resultados corroboram os achados de LIMA em 2007, onde foi evidenciada diminuição da expressão do gene após o tratamento com melfalano nos melanomas *in vitro*. Traçando-se um paralelo entre os resultados, acreditamos que o tratamento com melfalano promove de fato inibição da expressão desse gene.

IMP3 é uma das proteínas ligantes de RNA envolvidas na localização do mRNA de IGF-II (*insulin-like growth factor-II*) e no seu controle de tradução, estando hiperexpressa em alguns tumores malignos e relacionada ao maior potencial metastático dessas lesões (CHEN et al. 2012). É uma proteína de 580 aminoácidos com 4K domínios de homologia e 2 motivos de reconhecimento de RNA e atua aumentando a expressão proteica de IGF-II. A demonstração da diminuição da expressão de *Igf2bp3* pelo melfalano poderia se traduzir num efeito anti-proliferativo dessa droga tanto nas células de melanoma quanto no endotélio, inibindo sinais mitogênicos provenientes de IGF-II.

Como marcador imunohistoquímico, IMP3 foi descrita como capaz de distinguir melanomas de nevos benignos. Em estudo de MENTRIKOSKI et al. (2009) examinando 43 biópsias de 13 nevos benignos e 30 melanomas, a marcação imunohistoquímica de IMP3 foi detectada em 70% das amostras de melanoma, ao passo que nenhum dos nevos expressou IMP3 (MENTRIKOSKI et al. 2009). WALTER et al. (2009) avaliaram 138 casos de carcinoma mamário invasivo e constataram que a expressão imunohistoquímica de IMP3 foi correlacionada com maior grau histológico, necrose, subtipo triplo negativo (receptores hormonais e HER2 negativos) e expressão de CK5/6, sendo associada a um fenótipo mais agressivo de tumor de mama. Imp3 também se relaciona a maior potencial invasivo no melanoma. (KABBARAH et al. 2010) avaliaram o perfil genômico associado a progressão metastática em melanomas primários e metastáticos, através da técnica de comparação de genomas (*CGH array*). Os autores definiram 32 regiões genômicas que estiveram estatisticamente alteradas no melanoma metastático em comparação com lesões primárias e, na análise funcional dessas regiões, validaram que os genes *IMP3*, *ASPM*, *AKAP9*, *PRKCA*, *RPA3* e *SCAP2* apresentaram atividades pró-invasivas em células de melanoma humano (KABBARAH et al. 2010).

Os genes *Pard3* e *Fabp4* apresentaram modificação da expressão consistente em todas, ou ao menos 2, das linhagens de melanoma, célula endotelial e macrófagos cultivadas em monocamada com meio suplementado por SBF10%. Assim, decidimos centralizar as análises de expressão gênica nos ensaios com meio condicionado e em culturas tridimensionais discutidos mais adiante nestes dois genes.

O gene *Pard3* teve a expressão nos cultivos em monocamada de melanoma e célula endotelial com DMEM+SBF10% modificada pelos tratamentos com

melfalano. Quando comparados aos controles sem tratamento, melfalano inibiu a expressão de *Pard3* em melanoma após 3 horas de exposição com  $ER < 1,5$  e após 6 horas ( $ER < 2,5$ ). De modo semelhante, nas células endoteliais, observamos, na cinética de expressão, que os tratamentos contendo melfalano (MEL e MEL+TNF) inibiram a expressão de *Pard3* a partir de 3 horas até 6 horas de tratamento, com diminuição desse efeito após 12 horas. Esses achados estão de acordo com os resultados obtidos pelo trabalho de LIMA em 2007, onde *in vivo* e *in vitro* a exposição ao melfalano resultou na diminuição da expressão do gene. A combinação desses resultados com nossos achados sugere que *Pard3* sofre regulação negativa tanto na célula tumoral, quanto no microambiente tumoral, aqui representado pelo endotélio.

PAR3 é a proteína codificada pelo gene *Pard3* que possui 3 regiões conservadas (CR1, CR2 e CR3). CR3 está envolvida na ligação com aPKC (*atypical protein kinase C*). Já CR2 possui três domínios PDZ que são módulos de interação interproteica. Em associação com PAR6, moléculas de adesão juncional (JAM) ligam-se a PAR3 através desses domínios (MIZUNO et al. 2003). Em células epiteliais, PAR3 forma complexos com PAR6/aPKC colocalizando-se nas junções ocludentes (*tight junctions*), regulando a formação dessas estruturas e a polarização celular. Sabe-se também que PAR3 interage com várias proteínas, incluindo CDC42, TIAM1 (*T-lymphoma invasion and metastasis 1*), LIM quinase 2, 14-3-3 $\sigma$ , *lethal giant larva* (LGL) e proteínas associadas com PALS1 (*protein associated with Lin Seven 1*), regulando a formação das junções oclusivas, onde a hiperexpressão de PAR3 promove a criação dessas junções, enquanto que a diminuição de expressão atrasa a formação das mesmas (WANG et al. 2006). Em células endoteliais, IDEN et

al. (2006) demonstraram que PAR3 e PAR6 formam complexos diretamente com VE-caderina e que esses complexos são independente da ligação com aPKC na formação das junções aderentes (IDEN et al. 2006). Em outra publicação, Ebnet et al. descreveram que PAR3 encontra-se permanentemente expresso em células endoteliais *in vivo* e que se localiza nas regiões de contato intercelular dessas células quando cultivadas *in vitro* (EBNET et al. 2003).

Descrevendo outra função de PAR3, HONG et al. (2010) demonstraram que as proteínas do complexo PAR6-PAR3-aPKC auxiliam na organização da rede de microtúbulos intracelulares e que essas moléculas estariam implicadas no posicionamento do centróssomo durante a polarização e divisão celular. Demonstraram também, em células neuroepiteliais deficientes em PAR3, que a orientação do fuso mitótico mostrou-se defeituosa prejudicando a divisão celular (HONG et al. 2010). PAR3 pode ainda desempenhar um outro papel, como foi relatado em trabalho de Fang et al., onde ficou demonstrado que PAR3 interage com duas subunidades heterodiméricas da DNA-PK (*DNA dependente protein kinase*), Ku70 e Ku80. Quando essas subunidades se ligam ao domínio catalítico de DNA-PK, formam um complexo que regula o reparo de DNA de quebra de dupla fita (DSBs) não homólogo. A partir desses achados, os autores sugerem que PAR3 atua como um novo componente de DNA-PK, regulando o reparo de DNA (FANG et al. 2007).

Com base nessas informações, hipotetizamos a inibição da expressão de Par3 pelo tratamento com melfalano poderia estar associada com, ou favorecer, a inibição de proliferação e a citotoxicidade observada nas células de melanoma e células endoteliais, por interferir diretamente no mecanismo de reparo do DNA de

quebra de dupla fita, exarcebando inclusive o efeito citotóxico dessa droga, que age como alquilante do DNA, e por prejudicar a polimerização dos microtúbulos interferindo com a polarização celular e formação do fuso mitótico. Além disso, no endotélio, a inibição de PAR3 poderia modificar a estrutura das junções de adesão intercelular, promovendo aumento da permeabilidade vascular, potencializando a distribuição da droga na lesão tumoral.

Ainda nos cultivos em monocamada, identificamos a expressão do gene *Fabp4* em todas as linhagens testadas e que o tratamento com TNF modificou a cinética de expressão desse gene nesses cultivos. Nas células de melanoma e endotélio, TNF promoveu estímulo à expressão do gene no decorrer do tempo, entre 15 minutos e 12 horas de tratamento. Ao passo que, nos macrófagos, o TNF inibiu a expressão de *Fabp4* durante 3 horas e 6 horas de exposição, mantendo-se a inibição até 12 horas. Nos melanomas, a expressão de *Fabp4* foi baixa, enquanto que no endotélio e macrófagos a expressão do gene foi positiva. Nos dados de *microarray* de LIMA (2007), *Fabp4* não apresentou modulação estatisticamente significativa nos grupos tratados, embora com modificação numericamente importante da expressão relativa. Os dados de *real-time PCR*, entretanto, confirmaram a expressão diferencial deste gene de acordo com o tratamento empregado. Naquele trabalho, TNF pareceu inibir a expressão, enquanto que MEL pareceu estimular. Exceto pelos macrófagos, nossos resultados mostraram que TNF atuou estimulando a expressão de *Fabp4* e MEL não modificou sua expressão, mas comparações entre os estudos são limitadas, visto, naquele trabalho, avaliou-se amostras tumorais inteiras, o RNA de referência empregado foi diferente (*pool* de RNAs extraídos de linhagens de melanoma murino) e a expressão foi avaliada em um único tempo (3 horas).

FABP4 (ou aP2) é uma proteína expressa principalmente em adipócitos e macrófagos que atua transportando ligantes específicos (ácidos graxos, prostaglandinas, fatores de crescimento) do citosol para o receptor PPAR $\gamma$  no núcleo, facilitando a ligação dessas moléculas e aumentando a atividade transcricional daquele receptor. A atividade de PPAR $\gamma$  tem sido descrita nos processos de diferenciação adipocitária, modulação da atividade da insulina e função macrofágica, e sua ativação leva a inibição da proliferação e indução de apoptose em carcinomas (AYERS et al. 2007).

Há evidência também de que FABP4 interage com PTEN, havendo uma inibição de FABP4 por essa proteína. Sabe-se que PTEN atua também como fosfatase multifuncional de lipídios e proteínas e como inibidor da importante via de proliferação da via PI3K/AKT/MTOR. Um estudo de TSUDA et al. (2009) utilizando queratinócitos *PTEN-null* demonstrou uma elevação de 5 vezes na expressão de *Fabp4* nessas células, sugerindo que PTEN funciona como feedback negativo de FABP4 e conseqüentemente de PPAR $\gamma$ . PPAR $\gamma$ , por sua vez, é requerido no processo de diferenciação de glândulas sebáceas e estaria envolvido na hiperplasia patológica. Assim sendo, FABP4 teria papel no desenvolvimento de proliferação e surgimento dessas alterações e seria contrarregulado pela atividade de PTEN (TSUDA et al. 2009).

A expressão de FABP4 também foi descrita em células endoteliais. (ELMASRI et al. 2012) encontraram que células endoteliais (HUVEC), deficientes em FABP4, apresentaram aumento da susceptibilidade à apoptose, além de diminuição da migração e formação de capilares. Nesse estudo, descreveram que FABP4 modulou a atividade de importantes vias de sinalização, incluindo inibição

de P38, NOS e SCF (*stem cell factor*)/c-KIT. A via SCF/c-KIT parece ser a que está mais fortemente relacionada à atividade angiogênica induzida por FABP4, uma vez que em células deficientes em FABP4 observou-se diminuição de 85% dos mRNA de SCF (ligante de c-KIT) e aumento da expressão de c-KIT, e o tratamento destas células endoteliais com SCF exógeno foi capaz de recuperar a proliferação celular, e melhorar a sobrevivência, a morfogênese e o brotamento capilar de anéis de aorta (ELMASRI et al. 2012).

Este mesmo grupo descreveu o aumento da expressão do mRNA e da proteína FABP4 por outro ligante, o VEGFA, e verificou que o *knockdown* do receptor 2 de VEGF (VEGFR-2) acarretou inibição do efeito de VEGFA sobre a expressão de FABP4, o que não foi visto com o knockdown de VEGFR-1. Além disso, o *knockdown* de FABP4 promoveu redução de proliferação de células endoteliais tanto em condições basais, quanto após estímulo com VEGFA ou bFGF. Concluíram então que FABP4 é um alvo da via VEGF/VEGFR2 e um regulador positivo da proliferação de células endoteliais.

Como dito, FABP4 encontra-se expresso em macrófagos, onde participa na regulação da atividade inflamatória através das vias de NFkB e PPAR $\gamma$ . Nesse contexto, a ativação de PPAR $\gamma$  é tida como reguladora negativa da ativação de macrófagos durante a resposta inflamatória, conferindo um fenótipo associado com tolerância imunológica (ELMASRI et al. 2012).

Analisando os perfis de expressão obtidos na monocamada e procurando estabelecer relação com os achados de citotoxicidade, observamos que, em células de melanoma, o tratamento com TNF apresentou atividade citotóxica com inibição da proliferação e que proporcionou aumento da expressão de Fabp4 nessas células. Com

base nos relatos da literatura, sabemos que FABP4 favorece a ativação de PPAR $\gamma$  e esse por sua vez apresenta atividade antiproliferativa em várias neoplasias malignas. Hipotetizamos que o efeito antiproliferativo de TNF no melanoma deve-se, pelo menos em parte, ao aumento da expressão de FABP4, associado ao efeito direto de indução de apoptose pelo TNF (AYERS et al. 2007). Em células endoteliais, embora tenhamos observado atividade citotóxica de TNF, esse efeito não se deveu a inibição de proliferação. Nesse sentido, o efeito citotóxico registrado seria atribuído à citotoxicidade direta de TNF. Por outro lado, a hiperexpressão de Fabp4 nessas células, que, segundo evidências da literatura, teria um efeito angiogênico, poderia aumentar a susceptibilidade das células endoteliais ao efeito citotóxico de melfalano, podendo justificar o que foi observado nos tratamentos contendo MEL+TNF.

Nos macrófagos, observamos que o TNF atua inibindo a expressão de Fabp4. Nessas células, os ensaios não evidenciaram atividade citotóxica de TNF, que mantém o status proliferativo observado nos controles sem tratamento. Dados da literatura descrevem que moléculas pró-inflamatórias (TNF, IFN $\gamma$  e Toll-like Receptors, lipopolissacárides) favorecem o fenótipo classicamente ativado de macrófagos ou seja, pró-inflamatório e antitumoral (fenótipo M1). Por outro lado, moléculas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, dexametasona) modificam o fenótipo dos macrófagos provocando tolerância e estimulando a tumorigênese (fenótipo M2). Há evidência de que PPAR $\gamma$  atue como regulador negativo da ativação de macrófagos nesses processos, onde a ativação de PPAR $\gamma$  em macrófagos resulta na supressão da produção de mediadores pró-inflamatórios (SICA et al. 2008; WANG et al. 2012). Corroborando esses achados, um trabalho de SZANTO et al. (2010) descreveu que o tratamento de macrófagos e células dendríticas maduras com IFN $\gamma$ +TNF inibiu a

atividade de FABP4 em ambas as células e que IL4 promoveu forte expressão de FABP4 e conseqüentemente de PPAR $\gamma$ . Esse efeito foi também observado em macrófagos peritoneais (SZANTO et al. 2010). Comparando nossos resultados com a atividade de TNF descrita na literatura em macrófagos, seria possível que a diminuição de Fabp4 na linhagem IC-21, pelo tratamento com TNF, se traduza na menor atividade de PPAR $\gamma$ , com ativação clássica dessas células e preservando a sobrevivência celular, como o que foi observado nos ensaios de citotoxicidade.

Analisando os experimentos com meios condicionados com foco nos resultados de expressão dos genes Pard3 e Fabp4, observamos que o padrão de expressão inicialmente observado em Pard3 em meio suplementado com SBF10% pouco se modificou, mantendo-se a inibição da expressão do gene nos grupos de tratamento contendo melfalano, todavia a magnitude da inibição pareceu menor (ER entre 1 e 1,5) nas células de melanoma. Entretanto, para o gene Fabp4, constatamos alteração da cinética de expressão nos meios condicionados.

Nas células de melanoma cultivadas em meio condicionado por endotélio, o gene Fabp4 manteve o mesmo padrão de expressão observado com TNF no meio DMEM+SBF10%. Porém, quando utilizando meio condicionado por macrófagos, o TNF inibiu a expressão deste gene após 3 horas de tratamento. Interessantemente, conforme discutido em tópico anterior, esse padrão de inibição de Fabp4 pelo TNF só foi visto nos macrófagos cultivados em monocamada com meio suplementado com SBF10%. Por outro lado, nos macrófagos tratados com TNF no meio condicionado por células de melanoma, não foi evidenciada inibição da expressão de Fabp4, como o que ocorreu no meio suplementado com SBF10% apenas. Em células endoteliais, cultivadas em meio condicionado por B16F10 e por IC-21, o TNF

promoveu aumento da expressão de Fabp4, o que, em última análise, poderia se traduzir em estímulo pró-angiogênico exercido pelo melanoma e macrófagos.

Reunindo os achados descritos anteriormente, acreditamos que as células de melanoma são sensíveis a substâncias produzidas pelos macrófagos, com inibição da expressão de Fabp4, levando a menor ativação de PPAR $\gamma$ , o que se traduziria em estímulo de sobrevivência às células de melanoma. Um racional semelhante se aplicaria a interação entre o meio condicionado por melanoma e os macrófagos, onde os fatores produzidos pelo melanoma estimulariam a expressão de Fabp4, aumentando a atividade de PPAR $\gamma$ , o que, por sua vez, modificaria o fenótipo dos macrófagos para o de tolerância imune e pró-tumoral (fenótipo M2). Corroborando nossos achados, existe vasta evidência na literatura de que os macrófagos associados ao tumor promovem progressão tumoral, com maior proliferação, sobrevivência e invasividade, e, além disso, estímulo angiogênico e de supressão da atividade imune adaptativa (ALLAVENA e MANTOVANI 2012). JENSEN et al. (2009) avaliaram impacto prognóstico de macrófagos com fenótipo pró-tumoral M2, através de marcação imunohistoquímica de CD68 e CD163 em amostras de melanoma e da quantificação dos níveis séricos de sCD163 e sCD68 em pacientes com estágio clínico precoce (EC I e II), e descreveram que a presença de sCD163 foi fator prognóstico independente para pior sobrevida ( $p=0.01$ ) e casos que melanomas com denso infiltrado macrofágico CD68<sup>+</sup> também estiveram associados com pior sobrevida (HR 2,8  $p=0.02$ ). Estudos experimentais e em humanos confirmam que a produção de CCL2 se correlacionou com infiltrado tumoral macrofágico em câncer de mama, pâncreas e ovário e outras citocinas, como CCL5, CCL7, CCL8, CXCL12, VEGF, PDGF e M-CSF, também mostraram atrair macrófagos ao sítio tumoral. Com

relação aos fatores com potencial de promover a polarização dos macrófagos para o fenótipo M2 estão PGE2, TGF $\beta$ , IL-6 e IL-10, sendo que TGF $\beta$  e IL-10 são produzidos tanto pelos tumores quanto pelos próprios macrófagos (SICA et al. 2008; ALLAVENA e MANTOVANI 2012). Infelizmente, pelos motivos já mencionados nos experimentos de citotoxicidade, não quantificamos as citocinas presentes nos meios condicionados o que colaboraria para identificar as moléculas responsáveis pela modificação no perfil de expressão.

Inicialmente, quando nos propusemos a avaliar a expressão gênica nos esferóides, pretendíamos utilizar apenas 01 esferoide em cada grupo de tratamento a ser testado (controle, MEL, TNF e MEL+TNF). Todavia, o rendimento de RNA total de um esferoide único foi muito baixo e de má qualidade, o que nos forçou a utilizar um *pool* de 08 esferóides em cada grupo de tratamento e nos controles, para atingirmos um rendimento de RNA total que viabilizasse os ensaios de *real-time-PCR*. Acreditamos que, de certa forma, tal solução tenha sido responsável pelo maior grau de variação dos resultados de expressão verificados com os esferóides seja com uma, duas ou três linhagens, onde tivemos que realizar ao menos 03 experimentos de cinética para identificarmos um padrão reprodutível de expressão.

Avaliando o perfil de expressão nos cultivos tridimensionais, observamos que, nos esferóides compostos por células B16F10, por B16F10+MDMEC e pelas três linhagens de B16F10+MDMEC+IC-21, os genes *Arhgef6*, *ifi202b*, *Flt1* e *Imp3* tiveram expressão muito baixa ou inexistente. Apenas os genes *Pard3* e *Fabp4* apresentaram expressão relevante e foram analisados.

Nos cultivos tridimensionais, o gene *Pard3* manteve o padrão de resposta aos tratamentos semelhante à observada na cultura em monocamada, onde verificamos

inibição da expressão pelo melfalano. Mas a magnitude da inibição pareceu menor e só foi modulada mais tardiamente, com efeito máximo após 6 horas de exposição à droga, ao passo que em monocamada a inibição foi verificada mais precocemente, em 3 horas. A manutenção desse padrão foi observada tanto nos esferóides de B16F10, quanto nos B16F10+MDMEC e contendo as três linhagens. Acreditamos que o retardo na modulação do gene *Pard3* possa ser explicado tanto por características da estrutura tridimensional, quanto por características intrínsecas das células nestas condições de cultivo. A estrutura tridimensional ofereceria naturalmente uma barreira a difusão do quimioterápico através de camadas celulares mais profundas, ou reduziria a fração de células em crescimento e a proporção de células quiescentes, ou ainda diminuiria a sensibilidade a apoptose através de sinais de sobrevivência mediados célula-célula (KERBEL et al. 1996; HERRMANN et al. 2008).

Em nível de expressão gênica, GHOSH et al. (2005), avaliaram o perfil de expressão em células de melanoma NA8, pela técnica de *oligonucleotide microarray*, e identificaram que, nos cultivos 3D, 73 genes foram diferencialmente expressos, quando comparados aos cultivos 2D, principalmente com hiperexpressão dos genes que codificam CXCL1, 2 e 3, IL-8, CCL20 e angiopoietin-like 4, que são descritos com papel na progressão do melanoma e desenvolvimento de metástases. Em outra publicação, FRANZIA et al. (2004) avaliaram que os níveis de mRNA e proteicos do gene de reparo de DNA por *mismatch* PMS2 estavam diminuídos em esferóides de carcinoma mamário murino EMT-6 quando comparados com as monocamadas, conferindo maior resistência a drogas alquilantes de DNA como a cisplatina.

Para o gene *Fabp4*, os cultivos tridimensionais apresentaram perfis de expressão distintos, a depender das linhagens cultivadas. Nos esferóides compostos por melanoma e nos compostos por melanoma e células endoteliais, observamos aumento da expressão do gene no tratamento com TNF, ao longo do tempo de exposição. Estando, portanto, em consonância com os resultados de expressão observados em monocamada para o melanoma e endotélio no meio suplementado com SBF10%. Por outro lado, a cinética de expressão de *Fabp4* nos esferóides compostos pelas 3 linhagens (melanoma, endotélio e macrófago) demonstrou um perfil de inibição da expressão do gene entre 3 horas e 6 horas de tratamento com TNF que se perdeu após 12 horas. Interessantemente, um padrão semelhante foi observado apenas nos macrófagos tratados com TNF e, conforme discutido anteriormente, nos melanomas tratados sob meio condicionado pelos macrófagos. Com base nesses resultados, hipotetizamos que, na cocultura tridimensional, a interação entre o melanoma e os macrófagos determine inibição do referido gene durante o tratamento com TNF e que essa inibição seja atribuível ao papel de fatores e citocinas produzidas pelos macrófagos e interação desses com o melanoma. Achamos menos provável que esse achado, se deva exclusivamente uma mera sobreposição do perfil de expressão dos macrófagos, frente ao das linhagens de melanoma e endotélio, pois, morfologicamente, as coculturas tridimensionais, estabelecidas após 7 dias de cultivo, não apresentaram aparentemente um predomínio de macrófagos sobre as demais linhagens. Ademais, como dito, encontramos que as células de melanoma, quando cultivadas em meio condicionado por macrófago, apresentam diminuição da expressão de *Fabp4*. Assim sendo, no modelo de microambiente tumoral, os macrófagos poderiam atuar inibindo *Fabp4* nas células

tumorais e, conseqüentemente, diminuir a atividade de PPAR $\gamma$  e o efeito antiproliferativo desse receptor sobre a célula tumoral, conferindo então maior sobrevivência e resistência ao tratamento.

Avaliamos também a expressão das proteínas dos genes *Pard3* e *Fabp4* nas células em que a expressão gênica dos mesmos foi regulada, assim como procuramos descrever se o comportamento da expressão proteica segue a cinética observada nos genes correlatos pela metodologia de imunofluorescência. Verificamos expressão da proteína PAR3 nas linhagens de melanoma e no endotélio e que, como o descrito na expressão gênica, o tratamento com melfalano inibiu a expressão PAR3, representada por diminuição do sinal de fluorescência. A redução de fluorescência foi completa no melanoma tratado com melfalano em 6 horas e foi vista também no endotélio, com menor intensidade da fluorescência, embora a inibição não tenha sido total. Para a proteína FABP4 verificamos uma expressão basal com sinal de fluorescência no melanoma e nos macrófagos. Entretanto, a modificação da fluorescência foi menos óbvia após exposição ao tratamento com TNF. Embora, o TNF tenha aumentando a expressão gênica de *Fabp4* consideravelmente, em nível proteico promoveu apenas um discreto aumento nas células de melanoma após 12 horas de exposição. Nos macrófagos, vimos que TNF inibiu a expressão de *Fabp4*, no entanto houve pequena redução da expressão da proteína FABP4 nos macrófagos.

Por fim, uma vez constatada a expressão proteica de PAR3 e FABP4 em melanomas, propusemos avaliá-las como alvos terapêuticos utilizando moléculas agonistas ou inibidoras. Não encontramos moléculas que interagissem com PAR3 comercialmente disponíveis, mas sim um inibidor de FABP4, o bifenilazol-oxiacetato, que atua como potente inibidor de FABP4 em adipócitos. Ao

reproduzirmos os ensaios de citotoxicidade em células de melanoma utilizando esse inibidor, verificamos que, em 24 horas de exposição, quando comparadas com os controles sem tratamento, doses  $\leq 200\text{nM}$  aparentaram proporcionar estímulo à proliferação, representado pelo maior número de células viáveis, e que na dose 2 nM a proporção de células viáveis foi maior, atingindo significância estatística ( $p < 0,05$ ). Esses resultados são compatíveis com a atividade de FABP4 nas células neoplásicas, onde a expressão dessa proteína, ativando  $\text{PPAR}\gamma$ , inibe a proliferação celular. Assim sendo, a inibição de FABP4, com menor atividade de  $\text{PPAR}\gamma$ , estimularia a proliferação celular (MAKOWSKI et al. 2005; GILLILAN et al. 2007; SZANTO et al. 2010).

Curiosamente, a dose de 2000nM pareceu exercer efeito citotóxico, com menor número de células viáveis, embora sem significado estatístico em 24 horas. Descreve-se, que a ativação de FABP4/ $\text{PPAR}\gamma$ , além dos efeitos antiproliferativos nas células tumorais, exerce papel importante na atividade fisiológica celular, relacionando-se com os processos de adipogênese e homeostase da glicose (AYERS et al. 2007). Nesse contexto, acreditamos que a inibição de crescimento celular verificada com doses muito elevadas do inibidor de FABP4 poderia desencadear um desequilíbrio da homeostase celular, acarretando tal efeito.

Considerando os resultados obtidos, acreditamos que FABP4 e PAR3 são alvos promissores no tratamento do câncer. A realização de experimentos envolvendo a manipulação da atividade de FABP4 em células neoplásicas humanas, comprovando a capacidade de agonistas dessa proteína em produzir efeito anti-proliferativo tumoral, poderiam oferecer novos recursos terapêuticos ao tratamento do câncer. Mas ainda vemos como uma estratégia interessante a avaliação de

tratamentos envolvendo a associação de inibidores de FABP4 com drogas citotóxicas, visto que poderiam demonstrar efeito sinérgico entre eles, onde a inibição de FABP estimularia a proliferação de células tumorais e as tornariam mais susceptíveis aos efeitos de quimioterápicos que atuassem durante as fases de divisão celular.

Vimos também que o melfalano atua inibindo o gene *Pard3*, todavia esta é uma droga com um perfil de toxicidade desfavorável, tendo aplicabilidade clínica restrita à algumas neoplasias hematológicas e na perfusão isolada de membro. Sabendo-se que *PAR3* se relaciona com importantes vias do metabolismo, ligadas à polarização celular, formação de complexos juncionais e mecanismos de reparo de DNA, drogas que atuassem por inibir a atividade dessa proteína poderiam trazer efeitos importantes, bloqueando diversos processos de carcinogênese. Além disso, o sucesso dessas drogas, aliadas a um melhor perfil de toxicidade, ampliariam o arsenal de tratamento dos pacientes com câncer.

No campo da experimentação básica, grande parte dos resultados gerados em ensaios de avaliação do efeito citotóxico de drogas descritos atualmente na literatura científica utiliza apenas a célula neoplásica como modelo de análise. Nossos resultados demonstraram que a interação das células tumorais com as células endoteliais e macrófagos modificou substancialmente os padrões de citotoxicidade celular e de expressão gênica obtidos com os tratamentos propostos. Isto posto, a exclusão de células do microambiente tumoral dos ensaios de citotoxicidade, aos moldes do que é realizado atualmente, poderia resultar em conclusões não realísticas em relação ao efeito das drogas testadas *in vitro*. Acreditamos que isso responderia, em parte, pelo frequente insucesso observado nos experimentos *in vivo* com algumas

moléculas tidas inicialmente como promissoras nos experimentos *in vitro*. Nesse sentido, consideramos que a aplicação de modelos que procurem representar o microambiente tumoral torne-se mandatória, oferecendo assim resultados mais consistentes e aplicáveis à prática científica e clínica no campo da cancerologia.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados do nosso trabalho confirmam que as drogas melfalano e TNF exercem atividade antitumoral em linhagens de melanoma B16F10 e que parte desse efeito é potencializada ou minimizada pela interação da célula tumoral com os demais componentes do microambiente tumoral, aqui representados pelas células endoteliais e macrófagos.

Verificamos que os cultivos tridimensionais proporcionam um modelo adequado para experimentação no melanoma, podendo replicar parcialmente as interações celulares vistas no microambiente tumoral. Além disso, este modelo parece se associar com maior resistência ao efeito citotóxico e antiproliferativo de drogas, com papel potencial de fatores ligados à interação célula-célula, ou secretados, uma vez que os meios condicionados também promoveram modificações nas respostas citotóxicas e de expressão gênica, nesse processo.

Confirmamos que os genes *Pard3* e *Fabp4* sofrem regulação de expressão pelos tratamentos com TNF e melfalano e que o tumor, o endotélio e os macrófagos podem responder de maneira distinta a esses tratamentos, assim como, fatores ligados ao tipo de cultivo (monocadama e tridimensional) e ao meio utilizado (condicionado e suplementado com SBF10%) podem interferir diretamente na expressão dos mesmos. Acreditamos que as proteínas e vias metabólicas ligadas a esses genes oferecem alvos terapêuticos promissores no tratamento do câncer e que nossos resultados oferecem subsídios à aplicação dos mesmos em pesquisas futuras.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adachi Y, Hiramatsu S, Tokuda N, et al. Fatty acid-binding protein 4 (FABP4) and FABP5 modulate cytokine production in the mouse thymic epithelial cells. **Histochem Cell Biol** 2012; 138:397-406.

Allavena P, Mantovani A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. **Clin Exp Immunol** 2012; 167:195-205.

Ayers SD, Nedrow KL, Gillilan RE, Noy N. Continuous nucleocytoplasmic shuttling underlies transcriptional activation of PPARgamma by FABP4. **Biochemistry** 2007; 46:6744-52.

Barbour AP, Thomas J, Suffolk J, Beller E, Smithers BM. Isolated limb infusion for malignant melanoma: predictors of response and outcome. **Ann Surg Oncol** 2009; 16:3463-72.

Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, et al. Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. **J Clin Oncol** 2006; 24:4738-45.

Biron-Shental T, Schaiff WT, Ratajczak CK, Bildirici I, Nelson DM, Sadovsky Y. Hypoxia regulates the expression of fatty acid-binding proteins in primary term human trophoblasts. **Am J Obstet Gynecol** 2007; 197:516.e1-6.

Camacho LH, Antonia S, Sosman J, et al. Phase I/II trial of tremelimumab in patients with metastatic melanoma. **J Clin Oncol** 2009; 27:1075-81.

Carmeliet PL, Moons, Luttun A, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. **Nat Med** 2001; 7:575-83.

Cha ST, Talavera D, Demir E, Nath AK, Sierra-Honigmann MR. A method of isolation and culture of microvascular endothelial cells from mouse skin. **Microvasc Res** 2005; 70:198-204.

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. **N Engl J Med** 2011; 364:2507-16.

Chen P, Wang SJ, Wang HB, et al. The distribution of IGF2 and IMP3 in osteosarcoma and its relationship with angiogenesis. **J Mol Histol** 2012; 43:63-70.

Cornett WR, McCall LM, Petersen RP, et al. Randomized multicenter trial of hyperthermic isolated limb perfusion with melphalan alone compared with melphalan plus tumor necrosis factor: American College of Surgeons Oncology Group Trial Z0020. **J Clin Oncol** 2006; 24:4196-201.

da Silva EN Jr, de Deus CF, Cavalcanti BC, et al. 3-arylamino and 3-alkoxy-nor-beta-lapachone derivatives: synthesis and cytotoxicity against cancer cell lines. **J Med Chem** 2010; 53:504-8.

Deroose JP, Eggermont AM, van Geel AN, Verhoef C. Isolated limb perfusion for melanoma in-transit metastases: developments in recent years and the role of tumor necrosis factor alpha. **Curr Opin Oncol** 2011; 23:183-8.

Dong QG, Bernasconi S, Lostaglio S, et al. A general strategy for isolation of endothelial cells from murine tissues. Characterization of two endothelial cell lines from the murine lung and subcutaneous sponge implants. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 1997; 17:1599-604.

Ebnet K, Aurrand-Lions M, et al. The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and Jam-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. **J Cell Science** 2003; 116:3679-91.

Elmasri H, Ghelfi E, Yu CW, et al. Endothelial cell-fatty acid binding protein 4 promotes angiogenesis: role of stem cell factor/c-kit pathway. **Angiogenesis** 2012; 15:457-68.

Fang L, Wang Y, Du D, et al. Cell polarity protein Par3 complexes with DNA-PK via Ku70 and regulates DNA double-strand break repair. **Cell Res** 2007; 17:100-16.

Fecher LA, Cummings SD, Keefe MJ, Alani RM. Toward a molecular classification of melanoma. **J Clin Oncol** 2007; 25:1606-20.

Francia G, Man S, Teicher B, Grasso L, Kerbel RS. Gene expression analysis of tumor spheroids reveals a role for suppressed DNA mismatch repair in multicellular resistance to alkylating agents. **Mol Cell Biol** 2004; 24:6837-49.

Frongia C, Lorenzo C, Gianni F, Prevost GP, Ducommun B, Lobjois V. 3D imaging of the response to CDC25 inhibition in multicellular spheroids. **Cancer Biol Ther** 2009; 8:2230-36.

Gazzaniga S, Bravo AI, Guglielmotti A, et al. Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft. **J Invest Dermatol** 2007; 127:2031-41.

Gérard A, Mertens AE, van der Kammen RA, Collard JG. The Par polarity complex regulates Rap1- and chemokine-induced T cell polarization. **J Cell Biol** 2007; 176:863-75.

Ghosh S, Spagnoli GC, Martin I, et al. Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: a high density oligonucleotide array study. **J Cell Physiol** 2005; 204:522-31.

Gillilan RE, Ayers SD, Noy N. Structural basis for activation of fatty acid-binding protein 4. **J Mol Biol** 2007; 372:1246-60.

Gutman M, Sofer D, Lev-Chelouche D, Merimsky O, Klausner JM. Synergism of tumor necrosis factor-alpha and melphalan in systemic and regional administration: animal study. **Invasion Metastasis** 1997; 17:169-75.

Hayes AJ, Neuhaus SJ, Clark MA, Thomas JM. Isolated limb perfusion with melphalan and tumor necrosis factor alpha for advanced melanoma and soft-tissue sarcoma. **Ann Surg Oncol** 2007; 14:230-8.

Herrmann R, Fayad W, Schwarz S, Berndtsson M, Linder S. Screening for compounds that induce apoptosis of cancer cells grown as multicellular spheroids. **J Biomol Screen** 2008; 13:1-8.

Hersey P, Sosman J, O'Day S, et al. A randomized phase 2 study of etaracizumab, a monoclonal antibody against integrin alpha(v)beta(3), + or - dacarbazine in patients with stage IV metastatic melanoma. **Cancer** 2010; 116:1526-34.

Hida K, Hida Y, Shindoh M. Understanding tumor endothelial cell abnormalities to develop ideal anti-angiogenic therapies. **Cancer Sci** 2008; 99:459-66.

Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **N Engl J Med** 2010; 363:711-23.

Hong E, Jayachandran P, Brewster R. The polarity protein Pard3 is required for centrosome positioning during neurulation. **Dev Biol** 2010; 341:335-45.

Iden S, Rehder D, August B, et al. A distinct PAR complex associates physically with VE-cadherin in vertebrate endothelial cells. **EMBO Rep** 2006; 7:1239-46.

Ives NJ, Stowe RL, Lorigan P, Wheatley K. Chemotherapy compared with biochemotherapy for the treatment of metastatic melanoma: a meta-analysis of 18 trials involving 2,621 patients. **J Clin Oncol** 2007; 25:5426-34.

Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, et al. Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma. **J Clin Oncol** 2009; 27:3330-7.

Kabbarah O, Nogueira C, Feng B, et al. Integrative genome comparison of primary and metastatic melanomas." **PLoS One** 2010; 5:e10770.

Kerbel RS, St Croix B, Florenes VA, Rak J. Induction and reversal of cell adhesion-dependent multicellular drug resistance in solid breast tumors. **Hum Cell** 1996; 9:257-64.

Kirkwood JM, Tarhini AA, Panelli MC, et al. Next generation of immunotherapy for melanoma. **J Clin Oncol** 2008; 26:3445-55.

Kobayashi H, Man S, Graham CH, Kapitan SJ, Teicher BA, Kerbel RS. Acquired multicellular-mediated resistance to alkylating agents in cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1993; 90:3294-8.

Kobayashi S, Ito E, Honma R, et al. Dynamic regulation of gene expression by the Flt-1 kinase and Matrigel in endothelial tubulogenesis. **Genomics** 2004; 84:185-92.

Kohn M, Steinbach P, Hameister H, Kehrer-Sawatzki H. A comparative expression analysis of four MRX genes regulating intracellular signalling via small GTPases. **Eur J Hum Genet** 2004; 12:29-37.

Kroon HM, Moncrieff M, Kam PC, Thompson JF. Factors predictive of acute regional toxicity after isolated limb infusion with melphalan and actinomycin D in melanoma patients. **Ann Surg Oncol** 2009; 16:1184-92.

Lejeune FJ, Rüegg C. Recombinant human tumor necrosis factor: an efficient agent for cancer treatment. **Bull Cancer** 2006; 93:E90-100.

Li L, Xu H, Spaulding BO, et al. Expression of RNA-binding protein IMP3 (KOC) in benign urothelium and urothelial tumors. **Hum Pathol** 2008; 39:1205-11.

Lima VCC. **Análise do perfil de expressão gênica em melanomas cutâneos malignos murinos após tratamento sistêmico com o fator de necrose tumoral (TNF) associado ou não a melfalano (MEL)**. São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Liu RZ, Li X, Godbout R. A novel fatty acid-binding protein (FABP) gene resulting from tandem gene duplication in mammals: transcription in rat retina and testis. **Genomics** 2008; 92:436-45.

Lorigan P, Eisen T, Hauschild A. Systemic therapy for metastatic malignant melanoma--from deeply disappointing to bright future? **Exp Dermatol** 2008; 17:383-94.

Makowski L, Brittingham KC, Reynolds JM, Suttles J, Hotamisligil GS. The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and IkappaB kinase activities. **J Biol Chem** 2005; 280:12888-95.

Marrero B, Messina JL, Heller R. Generation of a tumor spheroid in a microgravity environment as a 3D model of melanoma. **In Vitro Cell Dev Biol Anim** 2009; 45:523-34.

McDermott DF, Sosman JA, Gonzalez R, et al. Double-blind randomized phase II study of the combination of sorafenib and dacarbazine in patients with advanced melanoma: a report from the 11715 Study Group. **J Clin Oncol** 2008; 26:2178-85.

Menendez D, Krysiak O, Inga A, Krysiak B, Resnick MA, Schönfelder G. A SNP in the flt-1 promoter integrates the VEGF system into the p53 transcriptional network. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2006; 103:1406-11.

Menon C, Ghartey A, Canter R, Feldman M, Fraker DL. Tumor necrosis factor-alpha damages tumor blood vessel integrity by targeting VE-cadherin. **Ann Surg** 2006; 244:781-91.

Mentrikoski MJ, Ma L, Pryor JG, et al. Diagnostic utility of IMP3 in segregating metastatic melanoma from benign nevi in lymph nodes. **Mod Pathol** 2009; 22:1582-7.

Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, et al. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. **J Clin Oncol** 2000; 18:158-66.

Min W, Ghosh S, Lengyel P. The interferon-inducible p202 protein as a modulator of transcription: inhibition of NF-kappa B, c-Fos, and c-Jun activities. **Mol Cell Biol** 1996; 16:359-68.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa/2012: incidência do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Mizuno K, Suzuki A, Hirose T, et al. Self-association of PAR-3-mediated by the conserved N-terminal domain contributes to the development of epithelial tight junctions. **J Biol Chem** 2003; 278:31240-50.

Mocellin S, Provenzano M, Rossi CR, et al. Induction of endothelial nitric oxide synthase expression by melanoma sensitizes endothelial cells to tumor necrosis factor-driven cytotoxicity. **Clin Cancer Res** 2004; 10:6879-86.

Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. **Cytokine Growth Factor Rev** 2005; 16:35-53.

Nagy A, Armatis P, Cai RZ, Szepeshazi K, Halmos G, Schally AV. Design, synthesis, and in vitro evaluation of cytotoxic analogs of bombesin-like peptides containing doxorubicin or its intensely potent derivative, 2-pyrrolinodoxorubicin. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997; 94:652-6.

Nashan D, Müller ML, Grabbe S, Wustlich S, Enk A. Systemic therapy of disseminated malignant melanoma: an evidence-based overview of the state-of-the-art in daily routine. **J Eur Acad Dermatol Venereol** 2007; 21:1305-18.

Nodé-Langlois R, Muller D, Boda B. Sequential implication of the mental retardation proteins ARHGEF6 and PAK3 in spine morphogenesis. **J Cell Sci** 2006; 119(Pt 23):4986-93.

Panchanathan R, Duan X, Arumugam M, Shen H, Liu H, Choubey D. Cell type and gender-dependent differential regulation of the p202 and Aim2 proteins: implications for the regulation of innate immune responses in SLE. **Mol Immunol** 2011; 49:273-80.

Pectasides D, Dafni U, Bafaloukos D, et al. Randomized phase III study of 1 month versus 1 year of adjuvant high-dose interferon alfa-2b in patients with resected high-risk melanoma. **J Clin Oncol** 2009; 27:939-44.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res** 2001; 29:e45.

Rosenberger G, Gal A, Kutsche K. AlphaPIX associates with calpain 4, the small subunit of calpain, and has a dual role in integrin-mediated cell spreading. **J Biol Chem** 2005; 280:6879-89.

Rossi CR, Russano F, Mocellin S, et al. TNF-based isolated limb perfusion followed by consolidation biotherapy with systemic low-dose interferon alpha 2b in patients with in-transit melanoma metastases: a pilot trial. **Ann Surg Oncol** 2008; 15:1218-23.

Rowinsky EK. Targeted induction of apoptosis in cancer management: the emerging role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor activating agents. **J Clin Oncol** 2005; 23:9394-407.

Ruggiero V, Latham K, Baglioni C. Cytostatic and cytotoxic activity of tumor necrosis factor on human cancer cells. **J Immunol** 1987; 138:2711-7.

[SEER] Surveillance, Epidemiology and End Results. **SEER Cancer Statistics Review 1975-2009 (Vintage 2009 Populations)**. Updated August 20, 2012. Available from: <URL:[http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2009\\_pops09/index.html](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/index.html)> [2012 agos 25]

Sanki A, Kam PC, Thompson JF. Long-term results of hyperthermic, isolated limb perfusion for melanoma: a reflection of tumor biology. **Ann Surg** 2007; 245:591-6.

Schwartzentruber DJ, Lawson DH, Richards JM, et al. gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. **N Engl J Med** 2011; 364:2119-27.

Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. **Cancer Lett** 2008; 267:204-15.

Singh N, Jani PD, Suthar T, Amin S, Ambati BK. Flt-1 intrareceptor induces the unfolded protein response, apoptotic factors, and regression of murine injury-induced corneal neovascularization. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2006; 47:4787-93.

Sondak VK, Smalley KS, Kudchadkar R, Gripon S, Kirkpatrick P. Ipilimumab. **Nat Rev Drug Discov** 2011; 10:411-2.

Stroka KM, Vaitkus JA, Aranda-Espinoza H. Endothelial cells undergo morphological, biomechanical, and dynamic changes in response to tumor necrosis factor- $\alpha$ . **Eur Biophys J** 2012; 41:939-47.

Szanto A, Balint BL, Nagy ZS, et al. STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPAR $\gamma$ -regulated gene expression in macrophages and dendritic cells. **Immunity** 2010; 33:699-712.

Szarvas T, Dorp FV, Niedworok C, et al. High insulin-like growth factor mRNA-binding protein 3 (IMP3) protein expression is associated with poor survival in muscle-invasive bladder cancer. **BJU Int** 2012; 110:E308-17.

Takenaka K, Katakura H, Chen F, et al. The ratio of membrane-bound form Flt-1 mRNA to VEGF mRNA correlates with tumor angiogenesis and prognosis in non-small cell lung cancer. **Cancer Lett** 2007; 246:34-40.

Trinh VA. Current management of metastatic melanoma. **Am J Health Syst Pharm** 2008; 65(Suppl 9):S3-8.

Tsuda M, Inoue-Narita T, Suzuki A, Itami S, Blumenberg M, Manabe M. Induction of gene encoding FABP4 in Pten-null keratinocytes. **FEBS Lett** 2009; 583:1319-22.

Walter O, Prasad M, Lu S, Quinlan RM, Edmiston KL, Khan A. IMP3 is a novel biomarker for triple negative invasive mammary carcinoma associated with a more aggressive phenotype. **Hum Pathol** 2009; 40:1528-33.

van Horssen R, Ten Hagen TL, Eggermont AM. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. **Oncologist** 2006; 11:397-408.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol** 2002; 3:RESEARCH0034.

Venetsanakos E, Mirza A, Fanton C, Romanov SR, Tlsty T, McMahon M. Induction of tubulogenesis in telomerase-immortalized human microvascular endothelial cells by glioblastoma cells. **Exp Cell Res** 2002; 273:21-33.

Wang T, Ge Y, Xiao M, et al. Melanoma-derived conditioned media efficiently induce the differentiation of monocytes to macrophages that display a highly invasive gene signature. **Pigment Cell Melanoma Res** 2012; 25:493-505.

Wang Y, Du D, Fang L, et al. Tyrosine phosphorylated Par3 regulates epithelial tight junction assembly promoted by EGFR signaling. **EMBO J** 2006; 25:5058-70.

Weber J. Overcoming immunologic tolerance to melanoma: targeting CTLA-4 with ipilimumab (MDX-010). **Oncologist** 2008; 13(Suppl 4):16-25.

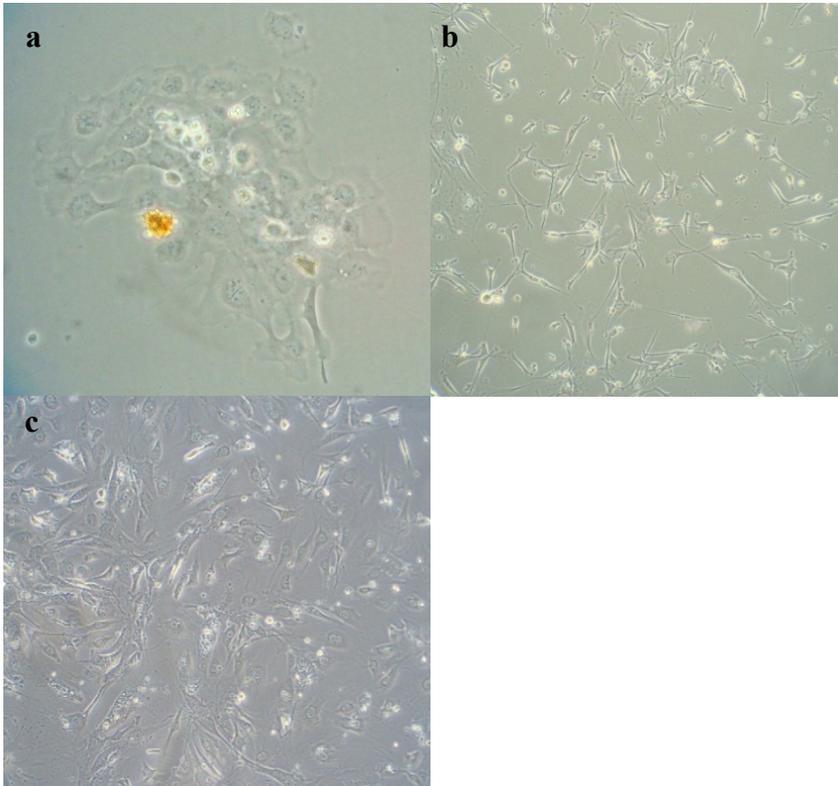
Wong C, Vosburgh E, Levine AJ, Cong L, Xu EY. Human neuroendocrine tumor cell lines as a three-dimensional model for the study of human neuroendocrine tumor therapy. **J Vis Exp** 2012; (66)e:4218.

Xin H, D'Souza S, Jørgensen TN, et al. Increased expression of Ifi202, an IFN-activatable gene, in B6.Nba2 lupus susceptible mice inhibits p53-mediated apoptosis. **J Immunol** 2006; 176:5863-70.

Yamamoto A, Kumakura S, Uchida M, Barrett JC, Tsutsui T. Immortalization of normal human embryonic fibroblasts by introduction of either the human papillomavirus type 16 E6 or E7 gene alone. **Int J Cancer** 2003; 106:301-9.

Zito CR, Kluger HM. Immunotherapy for metastatic melanoma. **J Cell Biochem** 2012; 113:725-34.

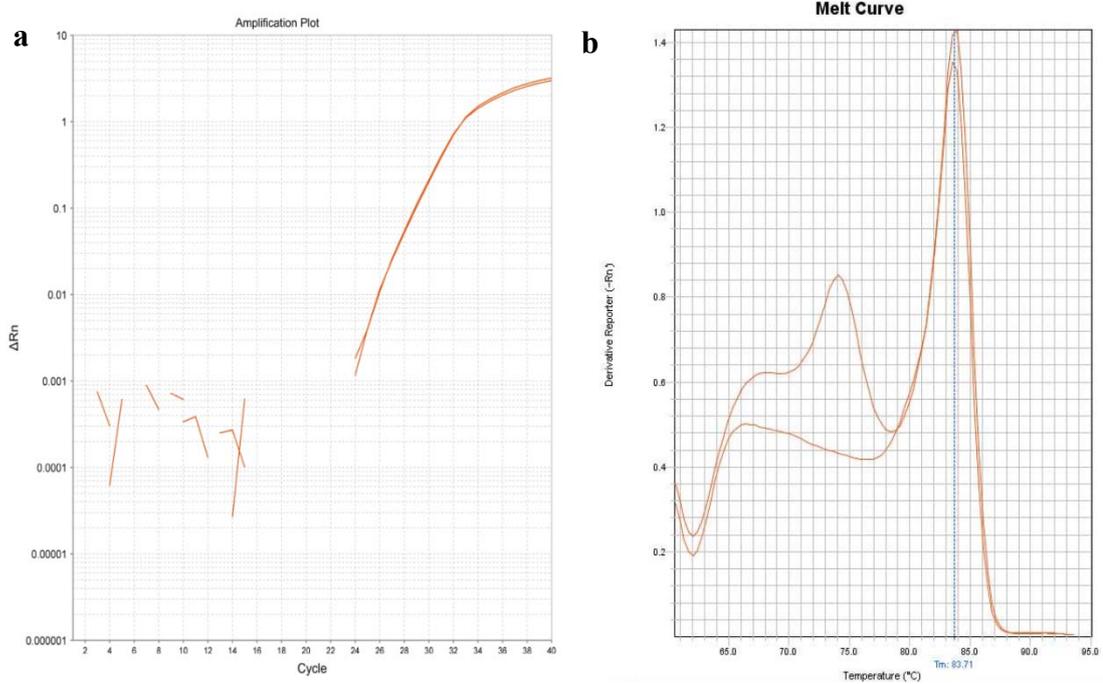
**Anexo 1** - Isolamento de células endoteliais derivadas de derme de camundongos C57BL/6



**Legenda:** Três camundongos C57BL/6 de 03 dias de vida sofreram eutanásia e foram retirados os escalpos para isolamento de células endoteliais (MDMEC – *murine dermal microvascular endothelial cells*). Após processamento da suspensão celular, utilizando-se o kit de separação imunomagnética (EasySep), as células endoteliais foram isoladas.

**Figura 1** - Em **a)** Células MDMEC primárias após 03 dias de incubação (objetiva 40x); **b)** Após 7 dias, demonstrando fenótipo fibroblástico (objetiva 40x); **c)** Em 10 dias, células mantendo bom aspecto, com 80% de confluência. (objetiva 40x).

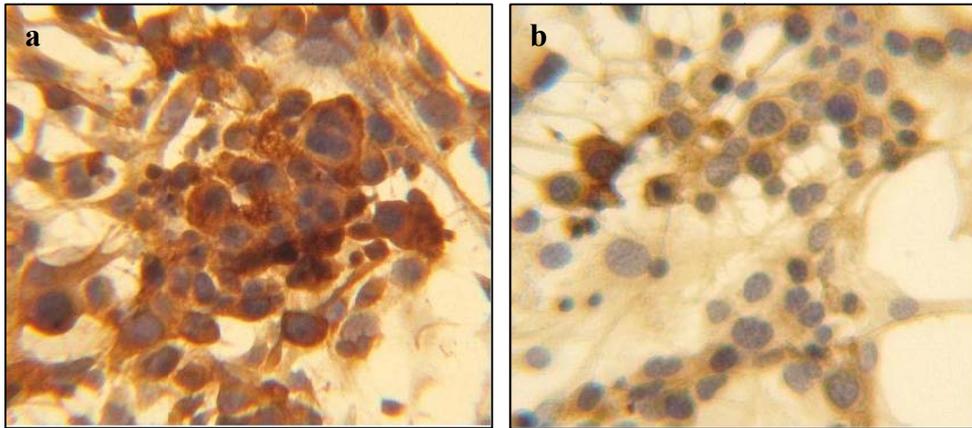
## Anexo 2 - Avaliação da expressão do gene *Nos3* por *real-time PCR*



**Legenda:** Células endoteliais de camundongo (MDMEC) foram cultivadas, em meio DMEM suplementado, em uma garrafa de cultura 150T e, ao atingirem confluência de 80%, procedida extração de RNA com RNeasy mini Kit® (Qiagen). Procedeu-se experimento de *real-time PCR* com a amostra em duplicata (total de 10ng de cDNA por reação).

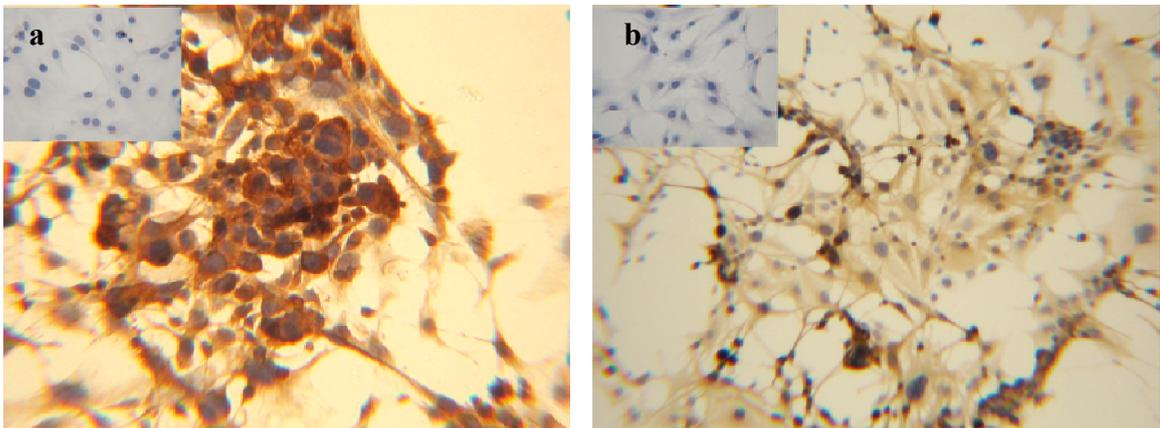
**Figura 2** - Em **a)** Curva de amplificação (*amplification plot*) onde se evidenciou a expressão do gene *Nos3*; Em **b)** *Melting curve* com características adequadas de dissociação.

**Anexo 3 - Avaliação da expressão imunohistoquímica de CD105 e fator de Von Willebrand em células endoteliais**



**Legenda:** Células endoteliais de camundongo foram plaqueadas em oito poços de uma lâmina LabTek® e cultivadas até confluência de 80%. Foi realizada fixação com acetona e formalina a 10% e realizada marcação imunohistoquímica para CD105 e fator de Von Willebrand.

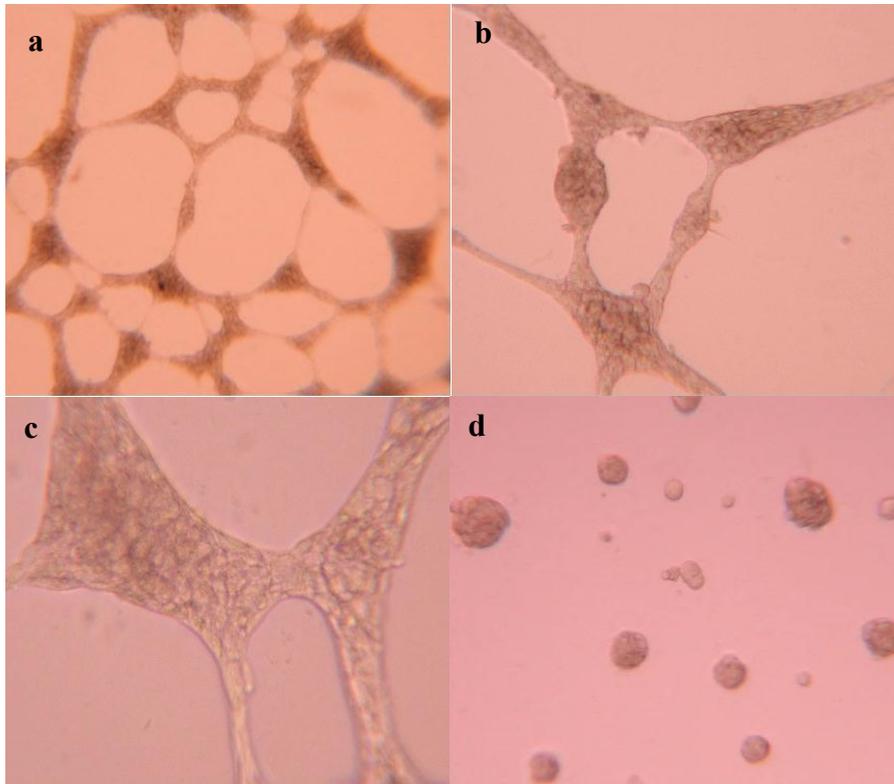
**Figura 3 -** Em **a)** agregado de células endoteliais exibindo forte marcação para o anticorpo do fator de Von Willebrand (objetiva 40x); em **b)** observamos grupamento de células endoteliais com marcação moderada do anticorpo CD105 (objetiva 40x).



**Legenda.** Células endoteliais imortalizadas de camundongo foram plaqueadas em oito poços de uma lâmina LabTek® e cultivadas até confluência de 80%. Foi realizada fixação com acetona e formalina a 10% e realizada marcação imunohistoquímica para CD105 e fator de Von Willebrand.

**Figura 4 -** Imunohistoquímica de células da 2<sup>o</sup> imortalização. **a)** Fator von Willenbrand (FvW) **b)** CD105 (Observa-se o reforço da marcação com padrão de membrana). Aumento de 40x. Os insertos mostram os controles negativos.

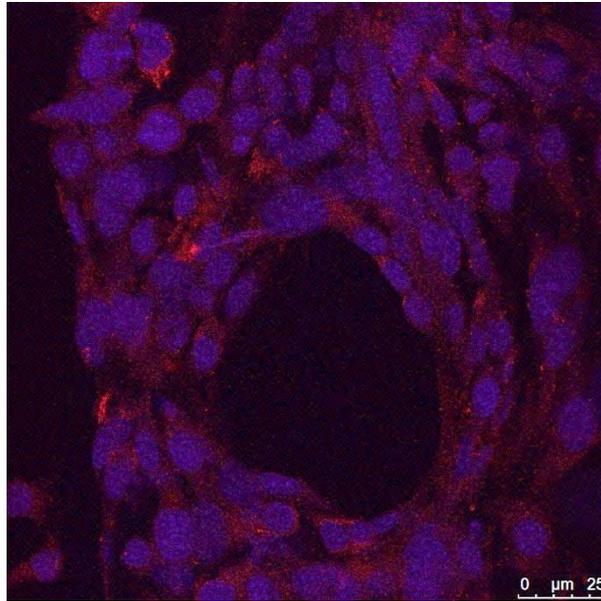
#### Anexo 4 - Ensaio de tubulogênese



**Legenda:** Células endoteliais MDMEC imortalizadas com proteína E7 de HPV16 foram ressuspendidas nas concentrações  $1,0 \times 10^5$  células,  $5,0 \times 10^4$  células e  $2,5 \times 10^4$  células em  $400 \mu\text{l}$  de meio DMEM suplementado e plaqueadas em placa de 48 poços, contendo Matrigel (BD)  $300 \mu\text{l/poço}$ , sendo plaqueados 4 poços por concentração e, posteriormente, colocadas na incubadora  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas.

**Figura 5** – Nas Figuras **A**, **B** e **C** demonstra-se a formação túbulos na concentração  $1,0 \times 10^5$  células após 24 horas. Em **A**) observa-se a formação de prolongamentos celulares caracterizando túbulos (objetiva 10x); em **B**) detalhe dos túbulos na objetiva 40x; em **C**) agregados celulares tubulares na objetiva de 100x. Em **D** demonstram-se a concentração de  $5,0 \times 10^4$  células, que não formou túbulos, apenas agregados celulares esparsos (objetiva 10x).

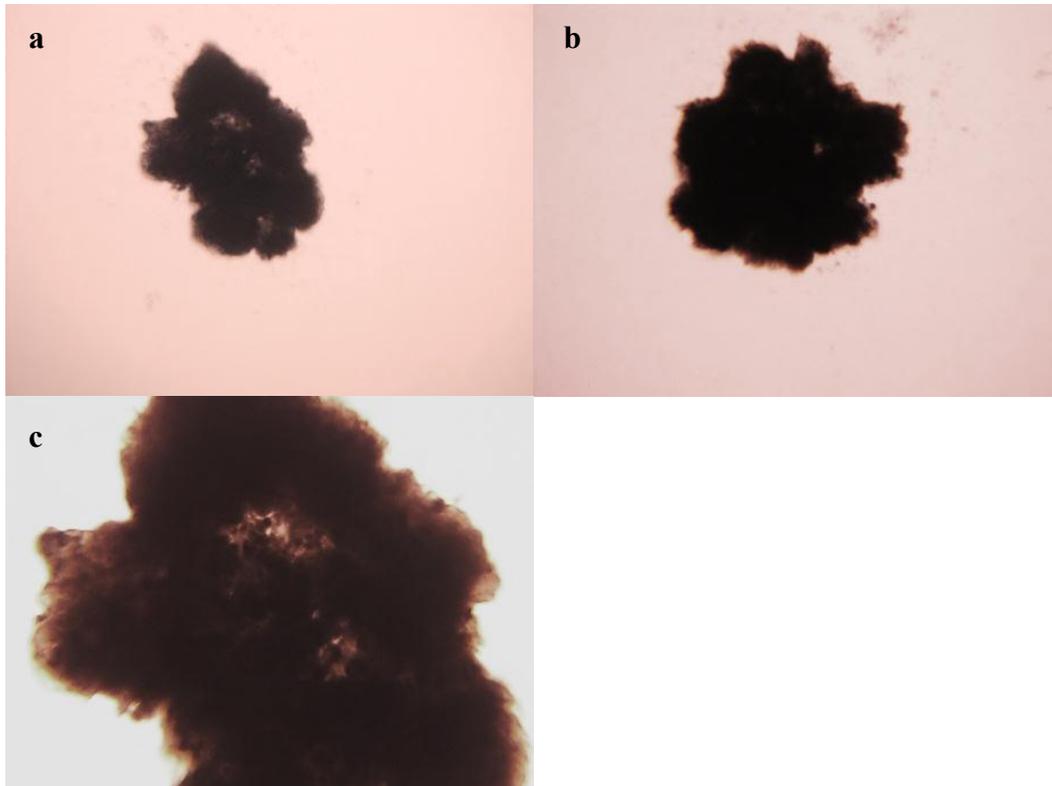
## Anexo 5 -Imunofluorescência de células endoteliais com anticorpo anti-CD31



**Legenda:** Células MDMEC foram cultivadas no total de  $3 \times 10^3$  células diluídas em 300 $\mu$ L de meio DMEM suplementado e esse total distribuído para cada poço de uma placa Nunc® de 04 poços, previamente preparada com laminulas de 15mm na base dos poços. Após 03 dias de incubação, as células aderiram às laminulas e atingiram 80% de confluência. Após fixação com paraformaldeído 4% e marcação com anticorpo anti-CD31-PE e com o marcador nuclear TO-PRO-3 foi realizada imunofluorescência em microscopia confocal.

**Figura 6** - Células MDMEC apresentando marcação positiva para o anticorpo anti-CD31-PE em vermelho e marcação nuclear com TO-PRO-3 em azul (aumento de 400x).

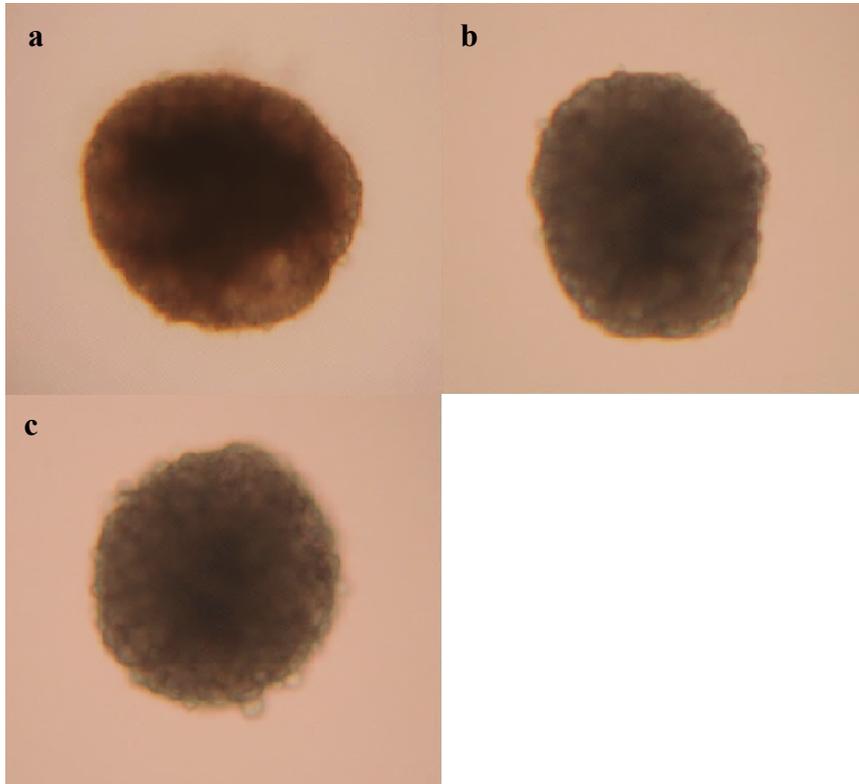
## Anexo 6 - Esferoides de células B16F10



**Legenda:** Foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato preparadas com 100 $\mu$ L de agarose LMP 1% por poço. Células B16F10 foram plaqueadas em cada poço, ressuspensas em 150 $\mu$ L de meio DMEM na concentração de  $3 \times 10^3$  células/poço e deixadas na incubadora CO<sub>2</sub> a 5% por 07 dias.

**Figura 7** – Representação do cultivo de células B16F10 com formação de esferóides coesos após 07 dias de incubação. Em **A** e **B** esferóides visualizados na objetiva de 10x em **C** esferoide na objetiva de 40x.

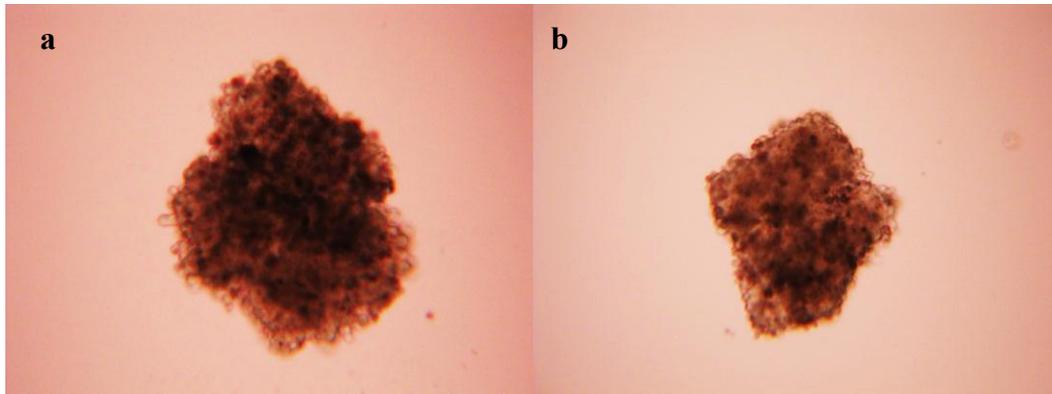
## Anexo 7 - Esferoides de células endoteliais



**Legenda:** Células endoteliais MDMEC imortalizadas foram distribuídas na concentração  $3,0 \times 10^3$  células por poço de uma placa micro NUNC® de 60 poços e colocadas em incubação por 3 dias.

**Figura 8** - Em **A**, **B** e **C**, representação em sequência de 03 poços contendo esferóides bem coesos de células endoteliais MDMEC imortalizadas (objetiva 40x).

## Anexo 8 - Esferoides mistos de células B16F10, MDMEC e IC-21



**Legenda:** Células das linhagens B16F10 (melanoma), MDMEC (células endotelial) e IC-21 (macrófago murinho), foram distribuídas nos aros da tampa de uma placa de 96 poços na concentração de  $3 \times 10^3$  células ressuspendidas em  $20 \mu\text{L}$  de meio DMEM por poço, obedecendo a proporcionalidade entre cada uma das linhagens.

**Figura 9** - Em **a)** evidencia-se a formação de esferoide único e bem coeso contendo as linhagens B16F10 e MDMEC (objetiva 10x); em **b)** esferoide composto pelas três linhagens estudadas: B16F10, MDMEC e IC-21 (objetiva 10x). Note-se a heterogeneidade das células que compõem os esferóides.

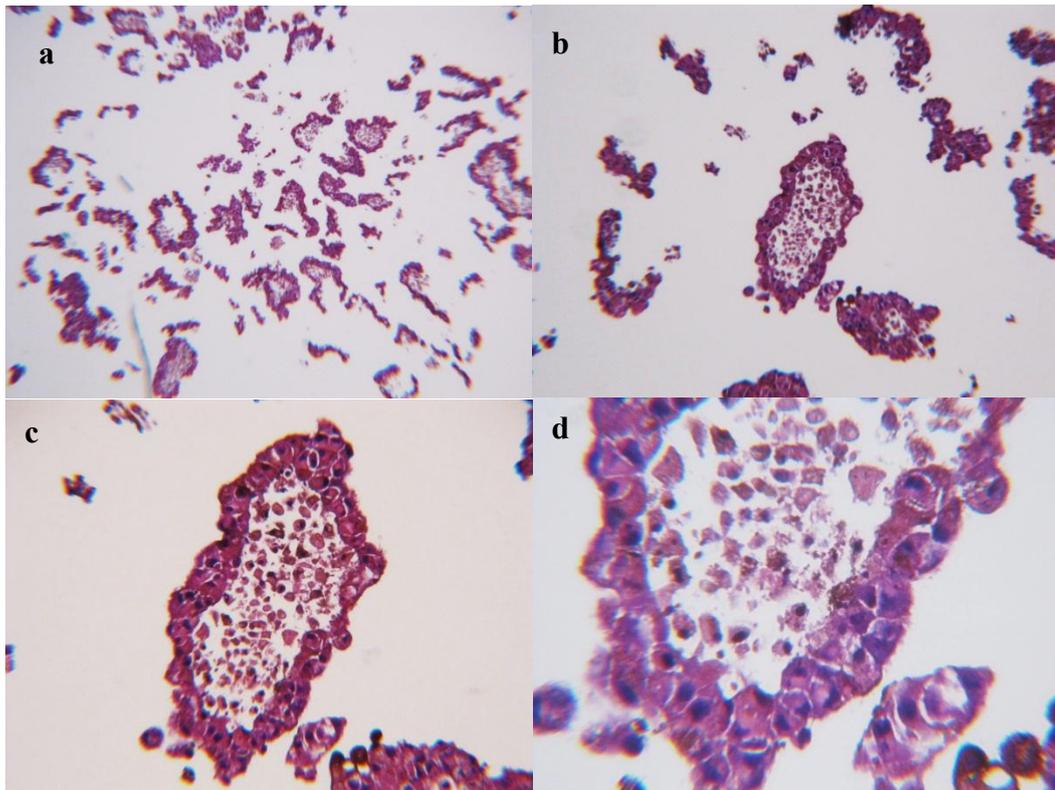
## **Anexo 9 - Avaliação morfo-histologica dos esferóides**

Após preparação das lâminas de HE, constatou-se que uma considerável proporção dos esferóides de B16F10 sofreu fragmentação durante o processo de fixação e preparo da coloração. Nos esferóides que não se fragmentaram observou-se que a cultura tridimensional da linhagem B16F10 compõe-se de duas regiões. Uma camada periférica formada por células de citoplasma basofílico e irregular e uma região central, correspondendo a um material de aspecto necrótico, formada por debris celulares. As estruturas apresentaram semelhança com que é observado nas amostras *in vivo* de tumores malignos, onde comumente encontramos uma região periférica formada por células viáveis e uma central predominantemente necrótica.

Ao contrário do que foi observado para os esferóides contendo apenas uma linhagem, poucos esferóides B16F10-MDMEC se fragmentaram durante a fixação, aparentando serem mais coesos. O mesmo se aplicou para os esferóides contendo três linhagens. Aos moldes do que foi visto para a linhagem B16F10, os esferóides B16F10+MDMEC eram compostos de duas regiões; uma periférica formada por camadas de células de citoplasma irregular e outra central de aspecto necrótico; mas, na camada periférica, duas populações de células foram observadas: uma com citoplasma basofílico e outra de citoplasma mais eosinofílico. Houve, também, a formação de estruturas semelhante à microvasos nas camadas de células periféricas de alguns esferóides, sugerindo, uma diferenciação das células endoteliais MDMEC em estruturas vasculares.

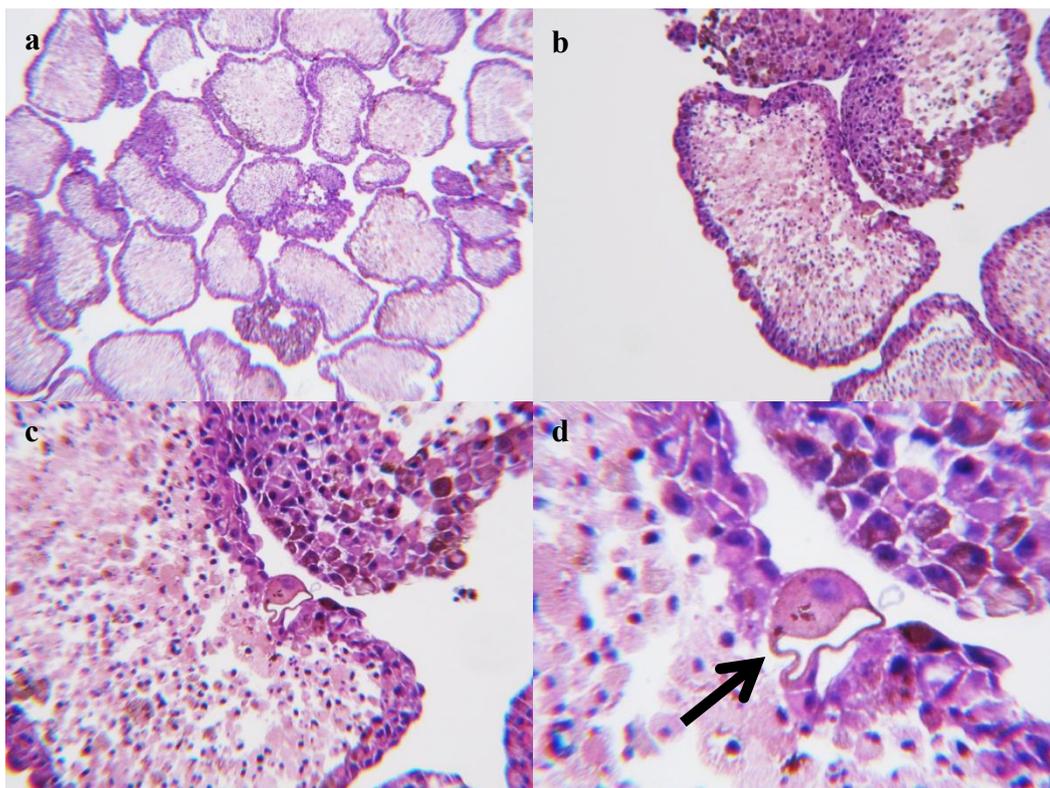
Analisando as características da cocultura tridimensional composta pelas 03 linhagens, os esferóides mantiveram-se coesos, sem ou com mínima fragmentação e também com a presença de duas regiões; uma periférica celular e outra central

necrótica. Quanto à característica das células viáveis periféricas, visualizou-se a presença de estruturas capilariformes em alguns dos esferóides obtidos, assim como a presença de células com prolongamentos citoplasmáticos intercelulares e repletos de melanina, sugerindo melanóforos (macrófagos).



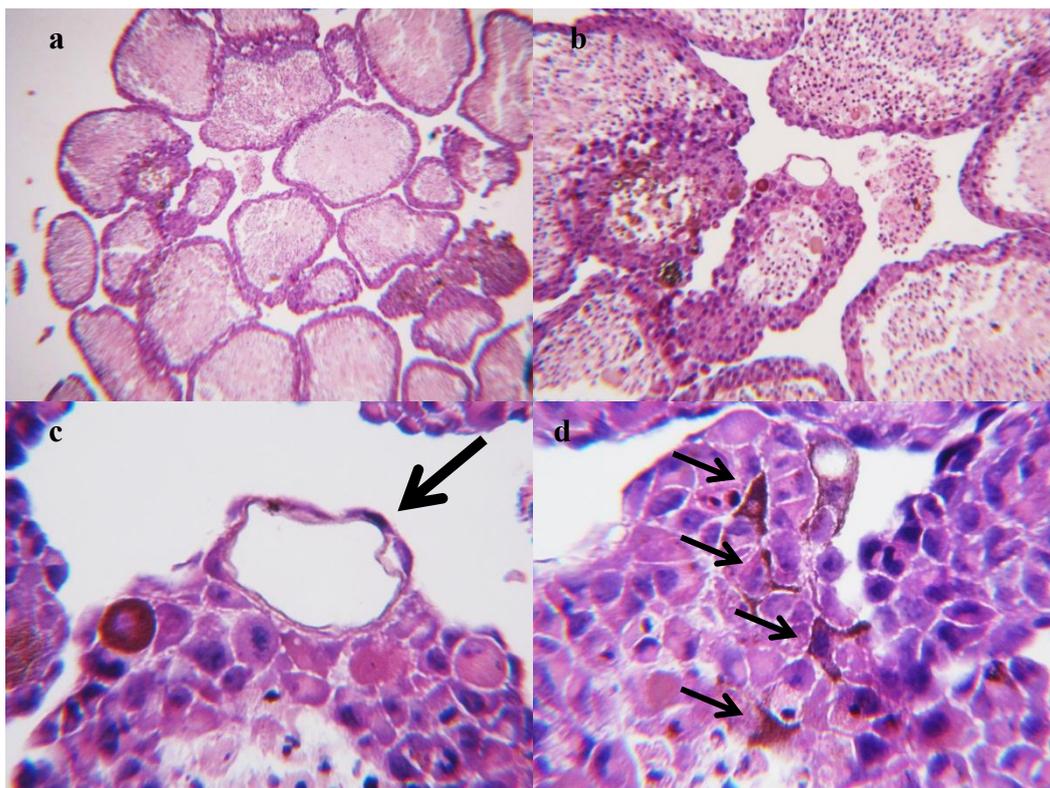
**Legenda:** Células B16F10 foram cultivadas em placas 96 poços preparadas com agarose LMP 1% para estabelecimento de esferóides (culturas tridimensionais). Foi realizada fixação dos esferóides B16F10 com PFA4%, parafinização e, posteriormente, preparação de lâminas de histoquímica coradas com hematoxilina e eosina.

**Figura 10** - Sequência de imagens demonstrando esferóides da linhagem B16F10. Em **a)** observamos um conjunto de esferóides, com fragmentação de alguns deles (objetiva 4x); em **b)** e **c)** esferoide intacto em meio a fragmentos de esferóides. Nota-se que a cultura tridimensional é composta por uma camada periférica de células com forma irregular e um centro de células dispersas, sugerindo necrose (objetiva 10x e 40x) e em **d)** detalhe do esferoide com melhor caracterização da camada periférica, formada por células agregadas de citoplasma irregular e com o centro necrótico, contendo debris celulares (objetiva 100x).



**Legenda:** Células B16F10 e MDMEC foram cultivadas em placas 96 poços preparadas com agarose LMP 1%, sendo plaqueadas pela metodologia da gota invertida num total de  $3 \times 10^3$  células por poço, para estabelecimento de esferóides (culturas tridimensionais), e colocadas em incubação em CO<sub>2</sub> a 5%. Após 07 dias de incubação, os esferóides formados foram transferidos para tubos eppendorf 1,7mL, seguindo-se as etapas de fixação com PFA4%, parafinização e posteriormente preparação de lâminas de histoquímica coradas com hematoxilina e eosina.

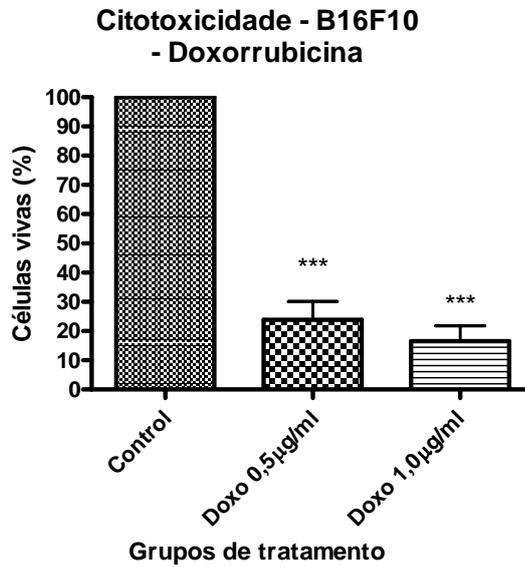
**Figura 11** - Em **a)** observam-se um conjunto de esferóides B16F10-MDMEC (objetiva 4x); em **b)** detalhe de um esferoide, evidenciando-se 02 zonas celulares; uma periférica celular e outra central, aparentemente necrótica (objetiva 10x); em **c)** esferoide em maior aumento com detalhamento da camada de células periféricas, revelando citoplasmas irregulares e basofílicos e uma região central composta por debris celulares e núcleos picnóticos compatível com necrose (objetiva 40x); e em **d)** detalhamento da camada periférica celular com evidencia de estrutura capilariforme composta por duas células com prolongamentos citoplasmáticos interligados e de morfologia distinta dos demais tipos celulares.



**Legenda:** Células de melanoma B16F10, células endoteliais (MDMEC) e macrófagos (IC-21) foram cultivadas em placas 96 poços preparadas com agarose LMP 1%, sendo plaqueadas pela metodologia da gota invertida num total de  $3 \times 10^3$  células por poço, para estabelecimento de esferóides (culturas tridimensionais), e colocadas em incubação em  $\text{CO}_2$  a 5%. Após 07 dias de incubação, os esferóides formados foram transferidos para tubos eppendorf 1,7mL, seguindo-se as etapas de fixação com PFA4%, parafinização e posteriormente preparação de lâminas de histoquímica coradas com hematoxilina e eosina.

**Figura 12** - Em **a)** observam-se um conjunto de esferóides B16F10-MDMEC-IC-21 (objetiva 4x); em **b)** detalhe de um grupo de esferóides, evidenciando-se 02 zonas celulares; uma periférica celular e outra central, aparentemente necrótica (objetiva 10x); em **c)** o detalhamento da camada de células periféricas, composta por células com citoplasmas irregulares e basofílicos e, na ponta da seta, estrutura capilariforme, formada por células de núcleo achatado e citoplasma delgado com prolongamentos intercelulares (objetiva 40x); e em **d)** grupo de setas demonstrando células com prolongamentos citoplasmáticos intercelulares, repletas de pigmento intracitoplasmático (melanina), sugerindo melanófagos (macrófagos).

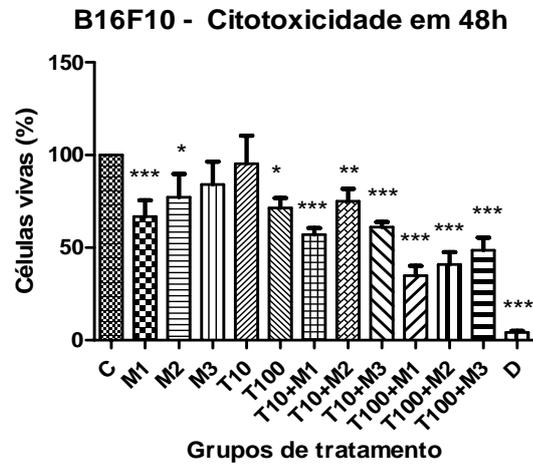
## Anexo 10 - Padronização da dose de doxorrubicina para os ensaios de citotoxicidade



**Legenda:** Foram utilizadas placas 96 poços fundo chato e plaqueadas células B16F10 na concentração  $3 \times 10^3$  células por poço. Após 06 horas, adicionou-se meio DMEM contendo doxorrubicina nas concentrações 0,5µg/mL e 1,0µg/mL e observou-se a atividade citotóxica pelo método do MTT após 24horas e 48 horas. C = grupo controle (B16F10) sem tratamento; Doxo 0,5 = doxorrubicina na concentração 0,5µg/mL; Doxo 1,0 = doxorrubicina na concentração 1,0µg/mL; \*\*\*= $p < 0,001$ . O gráfico representa o resultado de 03 ensaios. A porcentagem de células vivas foi estimada pela razão entre a absorbância obtida nas amostras dos grupos de tratamento e a absorbância das amostras controle.

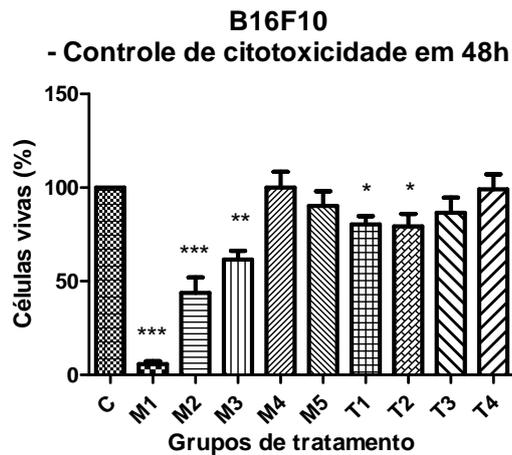
**Figura 13** – Representação gráfica da atividade citotóxica em ambas as concentrações de doxorrubicina, quando comparadas com o controle após 48 horas.

## Anexo 11 - Padronização das doses de melfalano e TNF-alpha



**Legenda:** Células B16F10 foram cultivadas numa placa 96 poços de fundo chato na concentração  $3,0 \times 10^3$  células/poço e em sextuplicata para cada grupo de tratamento. O gráfico representa o resultado de 3 ensaios. C = grupo controle; M1 = melfalano  $36,9 \mu\text{M}$ ; M2 = melfalano  $18,5 \mu\text{M}$ ; M3 = melfalano  $12,3 \mu\text{M}$ ; T10 = TNF-alpha  $10 \text{ng/mL}$ ; T100 = TNF-alpha  $100 \text{ng/mL}$ ; D = doxorubicina  $1,0 \mu\text{g/mL}$ ; \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ . Os tratamentos foram comparados com o grupo controle (sem tratamento). A percentagem de células vivas foi estimada pela razão entre a absorbância obtida nas amostras dos grupos de tratamento e a absorbância das amostras controle.

**Figura 14** - Observa-se atividade citotóxica importante e significativa com as doses M1, T100 e a combinação de ambas.



**Legenda:** Células B16F10 foram cultivadas numa placa 96 poços fundo chato na concentração  $3 \times 10^3$  células/poço e em sextuplicata para cada grupo de tratamento. O gráfico representa o resultado de 02 ensaios. A percentagem de células vivas foi estimada pela razão entre a absorbância obtida nas amostras dos grupos de tratamento e a absorbância das amostras controle. C = grupo controle; M1 = melfalano  $3690 \mu\text{M}$ ; M2 = melfalano  $369 \mu\text{M}$ ; M3 = melfalano  $36,9 \mu\text{M}$ ; M4 = melfalano  $3,69 \mu\text{M}$ ; M5 = melfalano  $0,369 \mu\text{M}$ ; T1 = TNF-alpha  $1000 \text{ng/mL}$ ; T2 = TNF-alpha  $100 \text{ng/mL}$ ; T3 = TNF-alpha  $10 \text{ng/mL}$ ; T4 = TNF-alpha  $01 \text{ng/mL}$ ; \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ .

**Figura 15** - Ensaio de citotoxicidade em células B16F10 com doses escalonadas de melfalano e TNF-alpha. Observa-se que apenas doses iguais ou superiores a melfalano  $36,9 \mu\text{M}$  e TNF-alpha  $100 \text{ng/mL}$  apresentam atividade citotóxica significativa.