

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA PENTRAXINA PTX3
NA TUMORIGÊNESE UTILIZANDO MODELOS
ANIMAIS GENETICAMENTE MODIFICADOS**

ANDRÉA CRISTINE MOTTA DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Luiz Fernando Lima Reis

São Paulo

2007



FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo**

Oliveira, Andréa Cristine Motta de

**Avaliação do papel da pentraxina PTX3 na tumorigênese utilizando
modelos animais geneticamente modificados** / Andréa Cristine Motta de Oliveira

-- São Paulo, 2007.

71p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Luiz Fernando Lima Reis

Descritores: 1. PENTRAXINA 2. PTX3. 3. CAMUNDONGOS
TRANSGÊNICOS. 4. ANIMAIS GENETICAMENTE MODIFICADOS. 5.
TUMORIGÊSE.

*Tentar e falhar é, pelo menos, aprender.
Não chegar a tentar é sofrer a inestimável
perda do que poderia ter sido.
(Geraldo Eustáquio)*

Tentar e falhar é, pelo menos, aprender.
Não chegar a tentar é sofrer a inestimável
perda do que poderia ter sido.
(Geraldo Eustáquio)

DEDICATÓRIA

A minha mãe, avó e tios, Adriana e Wlademir, pelo apoio e amor incondicionais, por serem meu eterno porto seguro e por terem apoiado meus sonhos.

Aos amigos de todas as horas, em especial ao Filipe, que sempre confiou na minha capacidade e me deu todo apoio e suporte quando precisei.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores **Luiz Fernando Lima Reis e Adriana Abalen Martins Dias**, pela oportunidade concedida e orientação durante todo o trabalho. Muito obrigada pela disponibilidade e paciência. Em especial ao **Dr. Luiz Fernando** por ter sido um excelente chefe, mas também por ter sido um amigo e muitas vezes exercer papel de “paizão”.

Ao Prof. Dr. **Ricardo Brentani**, Diretor do Hospital do Câncer A. C. Camargo, e a Prof. Dra. **Luisa Villa**, Diretora do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, pela excelente administração e oportunidade.

Ao Dr. **Gilles Landman** pelas explicações e por sua colaboração na verificação das análises histológicas e de imunocitoquímica feitas durante o projeto. Agradeço imensamente por toda a paciência e disponibilidade.

À Dra. **Karina Ribeiro** pela colaboração nas análises estatísticas presentes no trabalho, por sua disponibilidade e explicações.

Ao Prof. Dr. **Roger Chammas** não apenas pela cessão das células que foram utilizadas durante o projeto, mas também por seus ensinamentos como professor em algumas disciplinas e por sua disponibilidade para discutir sobre alguns pontos do projeto.

Ao **Dr. Alex Fiorini de Carvalho** por se mostrar sempre atencioso e solícito em todos os momentos em que fui pedir algum tipo de ajuda.

À **Graziela** por todos os ensinamentos técnicos dentro do laboratório, por toda a ajuda dispensada durante o andamento do projeto, mas também por ter sido, por várias vezes, uma “mãezona” nos momentos mais difíceis e por ter sido uma

amiga companheira e divertida em diversos momentos do meu mestrado. Até o que não sabíamos, juntas achávamos uma maneira sábia para solucionar o caso!

A **Regina Nomizo**, hoje não mais presente entre o quadro de funcionários, mas sempre presente em nossas mentes e corações, agradeço por ter sido grande professora sobre cultura de células e pela imensa paciência nas horas de desespero e de dúvidas.

À **Evânia** pela colaboração e amizade durante as horas e horas na sala de cultura, por seu excelente trabalho no gerenciamento da sala de cultura.

Ao **Vlademir** pelos momentos de debates e discussões, pelos ensinamentos transmitidos. Não posso deixar de agradecê-lo pela segunda chance dada a nossa amizade, que prezo muito.

Às companheiras de laboratório Mariana Moratto, Juliana Monte Real e Vivian (que não é mais aluna dessa instituição), pelo companheirismo, troca de experiências, pela ótima convivência e por terem escutado meus desabafos por tantas e tantas vezes.

Aos funcionários do biotério do Instituto Ludwig, **Wanderley, Oraci e Ederval**, pela colaboração constante durante esses dois anos. Por terem me ensinado com muita paciência o manejo com os animais (já que inicialmente a luta foi grande e tive que vencer um grande obstáculo, o medo!), por serem excelentes profissionais e por terem se tornado grandes amigos, confidentes e leais.

Ao **Dr. Raphael B. Parmigiani**, pelas dicas de como utilizar o Reference Manager.

Aos funcionários e amigos da Anatomia Patológica, **Gilmara, Yukie, Fernanda, Hugo e Ivan**, pelas horas agradáveis de trabalho que passamos juntos e pelas dicas ao trabalhar com análise histológica. Também ao Carlinhos e Severino



pela confecção das lâminas de histologia, e à Suely pela confecção das lâminas de imunocitoquímica e pelo aprendizado que tive sobre a técnica e outros detalhes, sem contar pela disponibilidade, atenção e amizade de todos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica, especialmente **Erico, Ana Paula, Ricardo, Valéria, Newton, Daniel e Murilo** por toda ajuda nas mais diversas situações, pelas dicas, pelos ensinamentos não só profissionais e técnicos como pessoais.

À **Ana Paula e Valéria** pela força, preocupação e amizade. Não tivemos muito tempo de contato, mas esse pouco tempo tenho certeza de que firmaram-se laços de amizades sinceros e duradouros.

À **Alainizinha** pela ajuda de TODAS as horas e por tornar o ambiente de trabalho sempre tão agradável, descontraído e cheio de “paquitagem”.

Às grandes amigas que fiz no LaBRI, **Nair, Bárbara, Letícia e Pagotto**, amigas para todas as horas e mais diversas programações. Amiga do peito, sempre prontas a ajudar, a estender a mão, emprestar um ombro amigo, brigar junto comigo pelo que é certo, brigar comigo quando estou errada, a rir muito e também a ensinar bastante, não só profissionalmente como lições de vida também. Cada uma de vocês, a seu modo, tiveram grande peso e grande importância nesse momento da minha vida e, estou certa de que esta amizade irá durar por longos anos.

Às novas amigas e companheiras de laboratório **Tati e Kátia**, pela amizade, por serem sempre solícitas, pelos almoços e momentos de distração fora do Lab.

À **Wal** amiga de discussões e aprendizados não apenas de cunho profissional. Seu apoio foi muito importante.

À **Patrícia Possik**, pela amizade e por ter me apresentado a ONG “O DNA vai à escola”, da qual faço parte praticamente desde que entrei no mestrado. O que me possibilitou ganhar conhecimentos em outras áreas da ciência.

À todos os integrantes do “O DNA vai à escola”.

À **Colo, Sarah, Mariana Santos, e Cham** pela contribuição indispensável a este e a outros trabalhos, pessoas sempre de alto-astrol colaborando para um ambiente de trabalho favorável e descontraído.

À **Lara** pelos conselhos e dicas das mais variadas, e principalmente pela leitura minuciosa desse trabalho e pela amizade.

Aos membros da **Banca de Qualificação** pelo acompanhamento, correções e sugestões.

Aos funcionários da **Zaiats & Zaiats**, pelo pronto socorro nos momentos de mais profunda ignorância sobre sistemas, formatações, problemas técnicos, etc.

Ao meu “filho” **Léo Maguetas Devai** pela amizade e apoio enquanto estive nessa instituição.

À todos os funcionários do **Instituto Ludwig, Hospital A. C. Camargo e Fundação Antônio Prudente**, não só pelo excelente trabalho mas também pela prazerosa convivência.

À **Ana Maria Kuninari e Luciana Pitombeira**, da secretaria da Pós-graduação, pela competência, paciência e atenção dispensadas aos alunos.

À **Suely Francisco** e aos demais funcionários da biblioteca da Fundação Antônio Prudente, pela atenção e boa vontade na organização e revisão desta

dissertação, bem como para atender aos vários pedidos de artigos durante esses mais de dois anos.

À **CAPES** pelo suporte financeiro.

À **Suzana** pela grande colaboração nas discussões sobre esse trabalho, sobre PTX3 e sobre imunologia, por sua receptividade e amizade dispensadas a mim.

Às amigas **Luciana, Cristina e Tati** pelo apoio inicial nessa empreitada.

Às amiga de moradia, que se tornaram além de amigas, uma espécie de família, **Karinne, Simone, Renata e a novata Luciana**, pela convivência agradável e pelo carinho e amizade durante esses anos que passamos juntas.

Aos meus grandes amigos **Renata, Lud, Danilo, Mari Kubo, Fabiana, Daniel, Caio e Branda**, pelo apoio sempre que precisei, por me jogarem pra cima dando ânimo e força, pelas conversas, amizade e carinho. Cada um, do seu jeito, fez com que cada resultado ruim fosse amenizado e rapidamente superado.

À **Família Bach** pelo apoio moral, psicológico, físico, espiritual e intelectual. Agradeço à todos pela hospitalidade, pelo carinho, atenção, preocupação, enfim por tudo que fizeram por mim no momento em que mais precisei. Num piscar de olhos tornara-se como uma segunda família, sempre de braços abertos. Ao André ainda pela confiança em meu trabalho e por apostar em mim profissionalmente, me apresentando novas oportunidades.

Ao **Filipe**, pelo seu carinho, dedicação, confiança e apoio que foram imprescindíveis para a superação de muitos dos obstáculos encontrados durante a trajetória desse trabalho. Muito obrigada por acreditar no meu sonho que, com sua ajuda, agora se torna realidade.

À minha família de Petrópoles, por terem compreendido minha ausência nas horas difíceis que passaram e por me apoiarem mesmo de longe.

À minha mãe **Marli**, avó **Alice**, bisavó **Izabel**, tios (**Wlademir e Adriana**) que me empurraram “ladeira acima”. Sempre! Obrigada pelo apoio financeiro e moral, pelos incentivos, pelo amor e amparo incondicionais durante cada um dos meus passos dados até aqui.

À **Deus** pelo amor, conforto e força.

RESUMO

Oliveira ACM. **Avaliação do papel da pentraxina PTX3 na tumorigênese utilizando modelos animais geneticamente modificados.** São Paulo; 2006. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

PTX3 é uma proteína da família das pentraxinas, produzida principalmente pelas células endoteliais, fibroblastos, macrófagos, monócitos e células dendríticas. Estudos *in vivo*, utilizando animais geneticamente modificados, mostraram que PTX3 tem papel preponderante na resposta inflamatória. A ação biológica de PTX3 envolve o reconhecimento de motivos comuns presentes em patógenos (PAMPs), ativação do complemento e estimulação da fagocitose pelos macrófagos. Além disso, estudos realizados pelo nosso grupo sugerem que PTX3 modula a expressão de várias citocinas e quimiocinas dentre elas TNF, IL-1 β , KC(CXCL1) e MCP-1 (CCL2). Este trabalho teve como objetivo analisar o impacto biológico da expressão de PTX3 no implante e desenvolvimento de tumores induzidos experimentalmente pela inoculação de células de melanoma murino em camundongos geneticamente modificados para PTX3. Para tanto, utilizamos camundongos transgênicos que apresentam em seu genoma cópias extras do gene que codifica para PTX3 ou ainda, camundongos mutantes, onde o gene PTX3 foi deletado por recombinação homologa. A linhagem celular de melanoma utilizada foi a B16-F10 e sua sub-linhagem B16-F10 NEX2. Nossos resultados mostraram que o implante e desenvolvimento dos tumores de induzidos experimentalmente parece ser mais lento no grupo de camundongos que têm expressão aumentada de PTX3. Isso pode indicar que a super-expressão da proteína PTX3 pode conferir uma proteção contra o crescimento de tumores. Os resultados dos parâmetros histológicos, analisados na tentativa de identificar os fatores biológicos que indicassem o mecanismo de ação de PTX3 no processo de progressão tumoral, mostraram que a diferença existente entre os animais que super-expressam PTX3 e seus respectivos controles acontece precocemente. Notamos diferença significativa entre os grupos após 48 horas do implante de células nos parâmetros área de necrose ($p=0,007$), porcentagem de

infiltrado inflamatório ($p=0,015$) e número de células tumorais ($p=0,007$). Assim, sugerimos que PTX3 pode funcionar como um mediador da resposta inata com papel importante na biologia dos tumores.

SUMMARY

Oliveira ACM. **[Evaluation of pentraxin PTX3's role on tumor genesis using genetically modified animal models]** São Paulo; 2006. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

PTX3 is a member of the pentraxin family of proteins, mainly produced by endothelial cells, dendritic cells, fibroblasts, macrophages and monocytes. In vivo studies, using genetically modified mice showed that PTX3 has a critical role on inflammatory response. Its biological activity involves the recognition of the pathogen-associated molecular pattern (PAMPs), activation of classical complement pathway and phagocytosis. Moreover, data from our group suggest that PTX3 modulates the expression of several cytokines and chemokines amongst them TNF, IL-1 β , KC (CXCL1) e MCP-1 (CCL2). The goal of this work was to analyze the impact of PTX3 expression on tumor implantation and tumor development upon injection of melanoma cells in mice genetically modified to overexpress as well as in PTX3 deficient mice. Our results suggest that tumor implantation and tumor development is diminished in mice with increased expression of PTX3. In PTX3tg mice, we observed increased tumor necrosis ($p=0,007$), percentage of infiltrated inflammatory ($p=0,015$) and number of tumor cells ($p=0,007$). Our data suggest that PTX3 overexpression might lead to a protection against the growth of melanoma tumors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Avaliação de contaminação por micoplasma das linhagens de melanoma	24
Figura 2	Imunohistoquímica das linhagens B16-F10 e B16-F1 utilizando os marcadores HMB45 e S100	26
Figura 3	Curva de crescimento dos tumores induzidos experimentalmente em animais WTTg2	34
Figura 4	Curva de crescimento dos tumores induzidos experimentalmente em animais Tg2	35
Figura 5	Curva de crescimento dos tumores induzidos experimentalmente em animais WTKO	36
Figura 6	Curva de crescimento dos tumores induzidos experimentalmente em animais Tg2 <i>versus</i> WTTg2	37
Figura 7	Gráficos de crescimento tumoral pontual	39
Figura 8	Gráfico demonstrando o “Take Rate” entre os grupos	40
Figura 9	Curva de crescimento dos tumores e sobrevida dos animais KO <i>versus</i> WTKO	41
Figura 10	Gráfico de área de necrose em tempos iniciais e tardios	44
Figura 11	Gráfico de área tumoral em tempos iniciais e tardios	45
Figura 12	Gráfico de número de células tumorais em tempos iniciais e tardios	45
Figura 13	Gráfico de infiltrados de células inflamatórias em tempos iniciais e tardios	46
Figura 14	Lâminas de H.E. de amostras de tumor em tempo inicial e tardio	46

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
BSA	do inglês Bovine Serum Albumine
CCL2	do inglês chemokine (C-C motif) ligand 2
cDNA	DNA complementar
CLP	do inglês Cecal Ligation and Puncture - Ligadura e Perfuração do Ceco
cm ²	centímetro quadrado
CO ₂	Gás Carbônico
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CRP	do inglês C-Reactive Protein – Proteína C Reativa
C-terminal	carboxi-terminal
CXCL1-3	do inglês chemokine (C-X-C motif) ligand 13
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DMEM	do inglês Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	do inglês <i>deoxynucleoside 5' triphosphato</i>
EDTA	do inglês ethylenediamine tetraacetate - ácido etilenodiaminotetracético
EPM/UNIFESP	Escola Paulista de Medicina / Universidade Federal de São Paulo
ETOH	etanol
FGF	do inglês Fibroblastic Growth Factor – Fator de crescimento de fibroblasto
FGFR	do inglês Fibroblastic Growth Factor Receptor – Receptor para o Fator de crescimento de fibroblasto
Fw	do inglês Foward
GAPDH	do inglês <i>glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase</i>
HCL	do inglês <i>chloridric acid</i> – ácido clorídrico
ICLAS	International Council for Laboratory Animal Science

IFN	Interferon
IGF-I	do inglês Insulin-like growth factor 1
IL	Interleucinas
ILPC	Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IR	Isquem ia e Reperusão
JNK	do inglês c-Jun N-terminal kinase
kDa	do inglês <i>kilodaltons</i> (medida de peso)
KO	camundongos nocautes
LDL	do inglês Low-Density Lipoprotein - Proteína de baixa densidade
LPS	do inglês lipopolysaccharide - Lipossacarídeo (componente da parede celular de bactérias Gram negativas)
MCP-1	do inglês monocyte chemotactic protein-1
Mef CW	fibroblastos provenientes de camundongos do tipo selvagem
MgCl₂	do inglês <i>magnesium chloride</i> – Cloreto de Magnésio
MICO	Micoplasma
MIP-2	do inglês macrophage-inflammatory protein-2
mM	do inglês <i>millimolar</i>
N₂	Nitrogênio
N2a	Neuro-2a - neuroblastoma murino
NaCl	do inglês sodium chloride – ácido clorídrico
Narp	do inglês Neuronal Activity Regulated Pentraxin – pentraxina regulada pela atividade neuronal
NF-IL-6	do inglês Nuclear factor IL-6
NF-κB	do inglês Nuclear Factor kappa B
ng	nanograma
NPI	do inglês Neuronal Pentraxin I – Pentraxina Neuronal I
NPII	do inglês Neuronal Pentraxin II – Pentraxina Neuronal II
N-terminal	amino-terminal
OmpA	do inglês Outer membrane protein A
ORF	do inglês Open Reading Frame – janela aberta de leitura

OSM	do inglês Oncostatin M
pb	pares de bases
PBS	solução tampão fosfato
PC	fosfocolina
PCR	do inglês Polymerase Chain Reaction - Reação em Cadeia da Polimerase
PDGF	do inglês Platelet-derived growth factor
PE	fosfoetanolamina
pH	do inglês hydrogen ionic potencial – potencial hidrogeniônico
PK	do inglês protein kinase
PTX3	Pentraxina 3
PTX3KO	Camundongos nocautes para PTX3
PTX3Tg	camundongos transgênicos para PTX3
q.s.p.	quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico
RNA_m	RNA mensageiro
rpm	do inglês rotation per minute – rotação por minuto
RPMI	do inglês Roswell Park Memorial Institute Media
Rv	do inglês Reverse
SAP	do inglês Serum Amyloid P Component – Componente soro amilóide P
SDS	lauril sulfato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
siRNA	do inglês short interference RNA – Pequeno RNA de interferência
TAM	do inglês Tumor-associated macrophage – Macrófagos associados ao tumor.
Tg2 ou PTX3Tg2	camundongos transgênicos contendo 2 cópias extras
Tg4 ou PTX3Tg4	camundongos transgênicos contendo 4 cópias extras
TGF	do inglês Transforming Growth Factor
TLR	do inglês Toll Like Receptors – Receptores do tipo Toll
TNF	do inglês Tumor Necrosis Factor – Fator de necrose tumoral

Tris	do inglês hydroxymethyl aminomethane-tris (hidroximetil) aminometano
TSG-14	do inglês TNF Stimulated Gene-14-Gene 14 estimulado por TNF
TSG-6	do inglês TNF Stimulated Gene-6-Gene 6 estimulado por NF
TSGs	do inglês TNF-Stimulated Genes-Genes estimulados por TNF
VEGF	do inglês Vascular Endothelial Growth Factor-Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
WT	do inglês Wild Tipe – tipo selvagem
µg	do inglês <i>microgram</i>
µl	do inglês <i>microliter</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Definição de PTX3	2
1.1.1	As pentraxinas curtas	3
1.1.2	As pentraxinas longas	4
1.1.2.1	Propriedades do gene e da proteína PTX3	5
1.1.2.2	Funções exercidas por PTX3	7
1.1.2.3	Interação PTX3 / FGF-2	10
1.2	Melanoma Cutâneo	11
1.2.1	Definição, estimativa, progressão e critérios de avaliação	11
1.2.2	Fatores de crescimento e citocinas em células melanocíticas	12
2	JUSTIFICATIVA	15
3	OBJETIVO	16
3.1	Geral	17
3.2	Específico	17
4	MATERIAL E MÉTODO	19
4.1	Camundongos	20
4.2	Células	21
4.3	Avaliação da contaminação por micoplasma nas linhagens celulares B16-F1 e B16-F10 e, caracterização das mesmas, utilizando marcadores imunohistoquímicos	22
4.4	Expansão e congelamento das linhagens celulares de melanoma murino	27
4.5	Determinação das curvas de crescimento tumoral dos camundongos	28
4.4	Análise Histológica	29
5	RESULTADOS	31
5.1	Padronização do número de células a serem injetadas nos camundongos e	

	confirmação da dose ideal para injeção	32
5.2	Curva de crescimento tumoral <i>versus</i> tempo dos animais Tg x WTTg	36
5.3	Curva de crescimento tumoral <i>versus</i> tempo e sobrevida dos animais KO x WTKO	40
5.4	Indução de tumor e coleta de material em tempos precoces e tardios após a injeção das células tumorais	42
5.5	Análises histológicas das lâminas de amostras de pele e tumor coletados	43
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÃO	58
8	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	60

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEFINIÇÃO DE PTX3

Com o objetivo de elucidar o mecanismo molecular de ação do TNF, LEE et al. (1990) isolaram genes induzidos por TNF através da hibridização de uma biblioteca de cDNAs originários de fibroblastos normais humanos. Dentre os diversos genes induzidos por TNF (TSGs) identificados, o gene *tsg-14* (tumor necrosis factor-stimulated gene 14) foi o mais frequentemente encontrado nessa sequência da biblioteca de cDNAs e sua função era desconhecida (LEE et al. 1990). Independentemente, BREVIARIO et al. (1992) isolaram o mesmo gene (exceto por uma metionina, na posição 202, no lugar de uma leucina) em células endoteliais de cordão umbilical humano estimuladas com IL-1 β (interleucina 1 β) e, nomearam-no de pentraxina 3 (*ptx3*) devido à homologia apresentada pela porção C-terminal da proteína codificada por este gene com as outras proteínas pertencentes à família das pentraxinas, a proteína C-reativa (CRP) e o componente soro amilóide P (SAP). Esta última denominação é a mais utilizada até os dias atuais (GARLANDA et al. 2005).

PTX3 é membro de uma superfamília de proteínas inflamatórias de fase aguda, as pentraxinas. As pentraxinas são proteínas conservadas, caracterizadas por uma organização estrutural baseada em cinco subunidades idênticas arranjadas não covalentemente em simetria pentamérica radial (EMSLEY et al. 1994). Outra característica própria dessa família é a presença de uma “assinatura da família das

pentraxinas” conservada, em seu domínio carboxi-terminal (HxCxS/TWxS, onde x pode representar qualquer aminoácido) (BAIROCH 1991).

Esta superfamília pode ser dividida em duas classes (subfamílias), divisão esta baseada no tamanho dos seus membros: a classe das pentraxinas curtas ou clássicas, cujo protótipo é a proteína C-reativa (CRP); e a classe das pentraxinas longas ou novas, cujo protótipo é a PTX3.

1.1.1 As pentraxinas curtas

As pentraxinas curtas, CRP e SAP, são proteínas inflamatórias de fase aguda em humanos e murinos, respectivamente, pesando 25-kDa (RUBIO et al. 1993), e produzidas por hepatócitos em resposta a mediadores inflamatórios, principalmente IL-6 (BAUMANN e GAUDIE 1994). Essas duas proteínas têm um mecanismo de ligação dependente de cálcio, interagindo com diversos ligantes como, fosfoetanolamina (PE), fosfocolina (PC) (SCHWALBE et al. 1992), DNA e cromatina (BUTLER et al. 1990), componentes do sistema complemento (ROBEY et al. 1984), complexos imunes, carboidratos, glicolípides (LOVELESS et al. 1992) e componentes de matriz extracelular (PEPYS e BUTLER 1987; BUTLER et al. 1990). Devido a essas propriedades, elas regulam a resistência natural contra microrganismos e clarificação de *debri* e componentes da matriz extracelular (PEPYS 1983). SAP liga-se também a várias bactérias (HIND et al. 1985; NOURSADEGHI et al. 2000), ao vírus influenza (ANDERSEN et al. 1997), a fibronectina, a proteína ligante C4b e a todas as formas de fibrilas amilóides (PEPYS e BUTLER 1987; BUTLER et al. 1990).

1.1.2 As pentraxinas longas

As pentraxinas longas apresentam em sua região C-terminal domínios homólogos aos encontrados nas pentraxinas curtas. Porém, as pentraxinas longas adquiriram, durante o processo evolutivo, novos domínios na região N-terminal resultantes, talvez, da fusão dessas novas extremidades às pentraxinas ancestrais (GOODMAN et al. 1996). Apesar da semelhança relatada acima entre as pentraxinas curtas e longas, essas últimas diferem quanto à organização gênica, localização cromossomal, fonte celular, estímulo indutor e reconhecimento de ligantes (MANTOVANI et al. 2003). Além de diferirem também, obviamente, quanto ao tamanho, que neste caso é em média de 40-50 kDa.

A primeira pentraxina longa descrita, foi a TSG-14 (LEE et al. 1990), posteriormente denominada de PTX3 (BREVIARIO et al. 1992), sendo então considerada o protótipo desta subfamília. Recentemente, outras pentraxinas longas foram descritas, como a XL-PXN1, isolada a partir de uma biblioteca de cDNA do fígado de *Xenopus laevis* (SEERY et al. 1993), a Apexin/p50, localizada no acrossomo de espermatozóides de porcos da índia (NOLAND et al. 1994; REID e LOBEL 1994) e é a que possui maior homologia com PTX3 (26%) (GOODMAN et al. 1996), a NPI, pentraxina neuronal do cérebro de rato (SCHLIMGEN et al. 1995), a NPII, pentraxina neuronal do cérebro humano (HSU e PERIN 1995) e a Narp, outra pentraxina neuronal do cérebro de rato (TSUI et al. 1996).

Várias funções têm sido atribuídas às pentraxinas neuronais, por exemplo, a NPI ao ligar-se a taipoxina tem papel na absorção sináptica. Além disso, NPI juntamente com Narp possuem uma atividade sinaptogênica (XU et al. 2003).

1.1.2.1 Propriedades do gene e da proteína PTX3

PTX3 é codificada por um gene de cópia única, formado por três éxons e dois íntrons, localizado no cromossomo 3 humano (q25), e o equivalente em murinos está localizado no cromossomo 3, banda (q24-28). A identidade entre a sequência de aminoácidos da proteína humana e murina é de 82%, e a porção C-terminal de PTX3 apresenta homologia de 57% de aminoácidos conservados em relação as pentraxinas clássicas (INTRONA et al. 1996). Os dois primeiros éxons codificam o peptídeo sinal e o domínio N-terminal da proteína, respectivamente, e o terceiro éxon detém o domínio de identidade das pentraxinas (C-terminal), exatamente como nos outros membros da família (BREVIARIO et al. 1992).

A sequência nucleotídica do cDNA de PTX3, revelou a existência de uma ORF que codifica para 381 aminoácidos (BREVIARIO et al. 1992; LEE et al. 1993), incluindo um peptídeo sinal de 17 aminoácidos.(GARLANDA et al. 2005). Sendo que a região C-terminal apresenta 203 aminoácidos e a porção N-terminal apresenta 178 aminoácidos ainda inéditos, ou seja, não descritos em nenhuma outra proteína. Análises da sequência humana indicaram a presença de um sítio de *N*-glicosilação na posição 220 da porção C-terminal, que confere o peso molecular de 45 kDa à glicoproteína secretada (GARLANDA et al. 2005).

O promotor de *ptx3* contém sítios para os fatores de transcrição Pu1, AP-1, NF- κ B, Sp1 e NF-IL-6. Foi demonstrado que NF- κ B é o fator de transcrição essencial para que haja indução por TNF e IL-1 β (ALTMAYER et al. 1995; BASILE et al. 1997). Entretanto estudos realizados por HAN et al. (2005), utilizando células epiteliais pulmonares, demonstraram outra via de regulação gênica para PTX3, que não fosse NF- κ B, responsável pela indução de TNF; pois quando este fator de

transcrição foi bloqueado através de seus inibidores, a indução por TNF não foi abolida. O estudo em questão utilizou-se, então, siRNA contra JNK1 ou JNK2 e observou uma regulação para PTX3 independente de NF- κ B porém dependente de JNK, que é uma via conhecida por regular a expressão de genes envolvidos em eventos relacionados ao estresse (HAN et al. 2005).

Diversos tipos celulares são capazes de produzirem PTX3 *in vitro* em resposta ao tratamento com TNF (LEE et al. 1990), IL-1 β (BREVIARIO et al. 1992), lipoarabinomananas (BREVIARIO et al. 1992 e VOURET-CRAVIARI et al. 1997a e b), LPS (lipopolissacarídeo) (VOURET-CRAVIARI et al. 1997a e b), LDL oxidado (KLOUCHE et al. 2004) e OmpA (CAMOZZI et al. 2005) e outros agonistas para diferentes membros da família “Toll Like Receptors” (TLR). Estas células incluem: células dendríticas mielóides (principal produtora de PTX3), células endoteliais, fagócitos mononucleares, células de músculo liso, adipócitos, fibroblastos, células sinoviais, condrócitos, miócitos normais, células do epitélio renal e alveolar, e células do cúmulus dos oócitos (BREVIARIO et al. 1992; LEE et al. 1994; INTRONA et al. 1996; POLENTARUTTI et al. 2000; PERI et al. 2000; GOODMAN et al. 2002; GARLANDA et al. 2002; VARANI et al. 2002; LATINI et al. 2004; NAUTA et al. 2005). Citocinas anti-inflamatórias ou citocinas associadas com a resposta do tipo Th 2 (IL-4, IL-13), não exercem efeitos sobre a produção de PTX3, e além disso, IL-6 se mostrou um indutor não muito eficaz desta proteína (ALLES et al. 1994). Contrariamente, IFN- γ e IL-10 têm efeitos divergentes na produção de PTX3. IFN- γ inibe a expressão e a produção de PTX3 em diferentes contextos celulares, por exemplo, em macrófagos e monócitos (GOODMAN et al. 1996, 2000; POLENTARUTTI et al. 1998), enquanto IL-10 possui um perfil de

indutor da expressão de PTX3 em células dendríticas e monócitos (PERRIER et al. 2004).

O primeiro ligante caracterizado para PTX3 é o C1q, componente de ativação da cascata do complemento da via inflamatória clássica (BOTTAZZI et al. 1997), e essa interação ocorre independentemente de cálcio. (NAUTA et al. 2003). Como CRP e SAP, PTX3 liga-se às células apoptóticas, inibindo seu reconhecimento pelas células dendríticas (ROVERE et al. 2000). Além disso, se liga a alguns patógenos como *Aspergillus fumigatus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhirium*, *Paracoccidioides brasilienses* e ao componente de parede celular, o zymosan (GARLANDA et al. 2002; DINIZ et al. 2004). TSG-6, uma proteína multifuncional geralmente associada à inflamação, liga-se também à proteína PTX3, e através dessa interação, PTX3 atua sobre a matriz extracelular rica em ácido hialurônico, que é essencial para a fertilidade das fêmeas (SALUSTRI et al. 2004). Mais recentemente, RUSNATI et al. (2004), demonstraram que PTX3 se liga especificamente ao fator de crescimento de fibroblasto-2 (FGF2), através da extensão N-terminal de PTX3 (CAMOZZI et al. 2005).

1.1.2.2 Funções exercidas por PTX3

Visando investigar a relevância de PTX3 na resposta inflamatória desencadeada *in vivo*, nosso grupo desenvolveu modelos animais geneticamente modificados que expressam cópias extras do gene em questão. Os transgenes inseridos no genoma dos animais contêm toda a sequência codificadora do gene e também a região regulatória que confere a indutibilidade por TNF e IL-1 β , na qual o sítio NF κ B é imprescindível (ALTMAYER et al. 1995; BASILE et al. 1997). Os

animais transgênicos para PTX3 (PTX3Tg) se mostraram mais resistentes à infecção bacteriana induzida experimentalmente pelo procedimento de ligadura e perfuração do ceco (CLP), bem como ao choque endotóxico em resposta à administração de altas doses de LPS (DIAS et al. 2001). Entretanto, quando submetidos à isquemia e reperfusão (IR) da artéria mesentérica superior, os animais PTX3Tg apresentaram uma taxa de sobrevivência menor do que a observada no grupo dos animais do tipo selvagem (WTs) (SOUZA et al. 2002). Neste caso, os camundongos geneticamente modificados, mostraram uma resposta inflamatória exacerbada que se refletia em um aumento exagerado da permeabilidade vascular, hemorragia e infiltrado neutrofílico no duodeno, íleo e pulmão. Nos animais PTX3Tg submetidos à IR, concentrações bem mais elevadas de TNF, IL-1 β , MIP-2/KC (CXCL1) e MCP-1 (CCL2) foram encontradas, em comparação com as presentes nos tecidos dos animais do tipo selvagem submetidos ao mesmo tratamento (SOUZA et al. 2002). Nossos estudos prévios também demonstraram que macrófagos peritoneais isolados dos animais PTX3Tg apresentam uma capacidade aumentada de fagocitose de partículas fúngicas, independentemente de opsonização, em relação à observada nos fagócitos provenientes dos animais WTs (DINIZ et al. 2004). Além disso, estes produziram maiores quantidades de óxido nítrico em resposta à estimulação por TNF e/ou LPS (DIAS et al. 2001). Este papel importante na resistência aos patógenos foi também mostrado por GARLANDA et al. (2002), utilizando animais nocaute para PTX3. Os trabalhos que utilizaram animais deficientes para o gene *ptx3*, apontaram a existência de uma função inédita e inesperada para esta proteína relacionada à fertilidade. As fêmeas nocaute homozigotas apresentam um fenótipo de infertilidade relacionado à desestabilização da interação da matriz extracelular que agrega as células do *cumulus*

aos oócitos no período periovulatório (VARANI et al. 2002; GARLANDA et al. 2005).

Como relatado anteriormente, PTX3 liga-se à conidia do fungo *A. fumigatus*, facilitando a internalização e morte desta, além da produção de MCP-1 (também conhecida como CCL-2) por fagócitos mononucleares. O nível de PTX3 plasmático foi encontrado aumentado em camundongos infectados com *A. fumigatus* e em pacientes neutropênicos com doenças hematopoiéticas e infecção sistêmica por esse tipo de fungo (GARLANDA et al. 2002). PTX3 também foi detectado no lavado broncoalveolar de camundongos e em humanos durante essa infecção. Esses resultados demonstraram que PTX3 atua como um receptor padrão de reconhecimento solúvel, o qual atua tanto na resistência aos patógenos oportunistas, em particular *A. fumigatus*, como também na fertilidade das fêmeas (MANTOVANI et al. 2003).

Altos níveis de PTX3 têm sido observados em diversas doenças infecciosas, incluindo sepsis, infecção por *A. fumigatus*, tuberculose e dengue (MULLER et al. 2001; GARLANDA et al. 2002; MAIRUHU 2005). Em algumas dessas doenças, o nível de PTX3 foi correlacionado com a atividade ou severidade da doença (GARLANDA et al. 2005).

Pentraxinas, incluindo SAP e PTX3, ligam-se às células apoptóticas e liberam componentes nucleares, regulando seu “clearance”, e bloqueia a ativação da autoimunidade (ROVERE et al. 2000). Desordens autoimunes como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose sistêmica e vasculite de pequenos vasos, foram investigadas quanto aos níveis de PTX3. Níveis elevados foram observados em artrite reumatóide e vasculite de pequenos vasos. Neste último caso,

os níveis de PTX3 estão correlacionados com a atividade da doença e a resposta a terapia (LUCHETTI et al. 2000; FAZZINI et al. 2001).

1.1.2.3 Interação PTX3/FGF-2

RUSNATI et al. (2004) demonstraram que PTX3 se liga especificamente ao fator de crescimento de fibroblasto-2 (FGF-2), através da extensão N-terminal de PTX3 (CAMOZZI et al. 2005). Esse fator de crescimento induz a proliferação celular, quimiotaxia, induz angiogênese *in vivo* e modula a neovascularização durante a cicatrização, inflamação, arteriosclerose e crescimento tumoral. A interação entre FGF-2 e PTX3, neutraliza a capacidade deste fator de crescimento de se ligar aos seus receptores, fato que resulta na inibição da sua atividade mitogênica *in vitro*, e angiogênica, *in vivo*, demonstrada pelos autores em modelo de membrana corioalantóide de ovo de galinha (RUSNATI et al. 2004). Os ensaios realizados sugerem que PTX3 possa inibir o mecanismo autócrino de estimulação por FGF-2 nas células endoteliais, levando à uma significativa inibição de migração celular, proliferação, morfogênese e crescimento tumoral. Os autores também relatam a ligação de PTX3, em afinidade bem mais baixa do que a observada para FGF-2, aos fatores FGF-8 e VEGF, mas não observou-se sua ligação com FGF-1 ou FGF-4. Além disso, foi relatado que PTX3 pode agir como um potente inibidor da estimulação exercida por FGF-2 sobre as células musculares lisas das artérias coronarianas, exercendo dessa forma, uma ação modulatória das funções destas células após uma lesão no vaso sanguíneo (LAZAR-MOLNAR et al. 2000).

Enquanto melanócitos normais não expressam FGF-2, quase todos os melanomas produzem esse fator em altos níveis durante a progressão tumoral (REID

et al. 1994; AL-ALOUSHI et al. 1996; HALABAN et al. 1988). Ao contrário de FGF-2, os receptores de membrana para esse fator, principalmente o FGFR-1, são expressos tanto em melanócitos normais quanto em células de melanoma. FGF-2 tem demonstrado ter papel como estimulante autócrino do crescimento, durante a progressão tumoral (WANG e BECKER 1997, YAYON et al. 1997). Entretanto, também têm sido postulados efeitos parácrinos na angiogênese e na formação do estroma (NESBIT et al. 1999).

1.2 MELANOMA CUTÂNEO

1.2.1 Definição, estimativa, progressão e critérios de avaliação

Melanomas são neoplasias malignas de melanócitos que figuram entre os cânceres humanos menos responsivos a diversos tratamentos. Diferentemente do que vem sendo observado com outros tumores, a incidência de melanoma tem crescido nas últimas décadas (HENDERSON et al. 1991). Segundo dados do INCA (www.inca.gov.br), o melanoma representa apenas 4% dos tipos de câncer de pele, porém é o mais grave, devido à sua alta possibilidade de metástase. Por isso, apesar de sua baixa incidência, apresenta elevada taxa de mortalidade. Para 2006, estão previstos 2.710 casos novos em homens e 3.050 casos novos em mulheres. O melanoma representa uma grupo de doenças definidos por critérios patológicos e clínicos, que sugerem uma sequência de passos distintos para sua progressão (MEIER 2003):

melanócitos → nevo → nevo displásico → melanoma primário em fase de crescimento radial sem competência para metastatizar → melanoma primário em fase de crescimento vertical competente para metastatizar → melanoma metastático

Fonte: MEIER (2003)

Histologicamente, a classificação do melanoma reflete a localização e / ou a profundidade do mesmo. Por exemplo, o melanoma *in situ*, caracterizado por um padrão de crescimento radial, está confinado primariamente à epiderme. Em contrapartida, a fase de crescimento vertical dos melanomas malignos denota uma transição para uma condição mais agressiva e maligna, a qual é caracterizada pela invasão tumoral ultrapassando a derme e podendo alcançar sítios distantes, levando à metástase. Embora o melanoma tenda a se propagar para sítios não viscerais como pele ou linfonodos, os sítios viscerais mais comumente envolvidos na metástase do melanoma são pulmão, fígado, cérebro, ossos e intestino delgado (CHIN et al. 1988)

Entre os vários fatores de avaliação, a espessura total do tumor é o melhor determinante independente para prognóstico de melanomas não-metastáticos. O sistema descrito por Breslow, o qual mensura a espessura tumoral do topo da camada nucleada da epiderme até a maior profundidade da invasão tumoral, (CHIN et al. 1998).

1.2.2 Fatores de crescimento e citocinas em células melanocíticas

A regulação autócrina de células tumorais envolvem a produção endógena de fatores de crescimento, os quais atuam na produção de receptores celulares específicos e estimulam a proliferação celular (LAZAR-MOLNAR et al. 2000).

Os fatores de crescimento produzidos pelas células de melanoma podem ter efeito parácrino sobre outras células do estroma circundante, enquanto células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos, monócitos, linfócitos e granulócitos, e estas células, por sua vez, produzem vários fatores de ativação, como IGF-I, PDGF e enzimas proteolíticas, ou inibitórios como IL-1, IL-6, OSM, TGF- β , IFNs e TNF. Esses fatores parácrinos aumentam o crescimento tumoral, angiogênese, adesão ou mobilidade, promovem a disseminação ou inibem o crescimento tumoral, ou causam diferenciação (LAZAR-MOLNAR et al. 2000).

Como relatado anteriormente, o FGF-2 é o fator de crescimento mais expresso pelas células de melanoma. O mecanismo pelo qual FGF-2 é expresso abundantemente pelas células de melanoma, pode ser explicado pela co-expressão do proto-oncogene c-MYC, o qual transativa o promotor de FGF-2 e estimula a expressão do seu RNAm e da sua proteína, resultando em um descontrolado crescimento (LAZAR-MOLNAR et al. 2000).

Fatores de crescimento como FGF-2 não atuam somente estimulando a proliferação de melanócitos. A persistente expressão de FGF-2 está associada ao recrutamento, à proliferação e migração de células endoteliais, o que favorece a invasão da massa tumoral por vasos neoformados (angiogênese) (DE CRISTAN et al. 1990). Mais ainda, FGF-2 é um potente modulador da migração de melanócitos e melanomas, favorecendo o processo de metástase. Assim, além de estar associado à formação de nevos, FGF-2 também está associado à progressão de melanomas em fase de crescimento radial e para melanomas em fase de crescimento vertical (NUGENT e IOZZO 2000).

Esse fator de crescimento é bem conhecido por suas propriedades angiogênicas e efeitos mitogênicos em vários tipos celulares. Além disso, FGF-2 ativa enzimas extracelulares, atribuindo uma capacidade invasiva às células de melanoma (LAZAR-MOLNAR et al. 2000).

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Com base em dados anteriores do nosso laboratório que evidenciaram a participação importante de PTX3 na modulação da resposta inflamatória observada *in vivo*; suportados por dados da literatura que documentam o importante papel de citocinas tais como TNF, IL-1 β , das quimiocinas CXCL1-3 (MIP-2/KC) e CCL2 (MCP-1), e de moléculas como o óxido nítrico no desenvolvimento e progressão tumoral todos estes mediadores se encontram elevados nos animais PTX3Tg (DIAS et al. 2001; SOUZA et al. 2002); baseados também na evidência do efeito anti-angiogênico da ligação de PTX3 ao FGF-2 (RUSNATI et al. 2004), resolvemos investigar a participação de PTX3 em processos tumorais utilizando modelos de implante de células tumorais *in vivo*.

O modelo escolhido neste estudo foi o do melanoma cutâneo. Para esta escolha consideramos o fato de que citocinas e quimiocinas como IL-8, IL-10, IL-1 e TNF, serem encontradas elevadas nos animais PTX3Tg (DIAS et al. 2001; SOUZA et al. 2002) e serem conhecidamente importantes no desenvolvimento deste tipo de neoplasia (LAZAR-MOLNAR et al. 2000). Além disso, este tipo de câncer pode ser implantado de forma experimental em camundongos pela injeção intravenosa ou subcutânea de células tumorais em animais susceptíveis. Este modelo experimental já está padronizado e bem estabelecido no nosso grupo, uma vez que tem sido largamente empregado em nossos estudos visando o conhecimento da biologia do melanoma e avaliação da resposta deste tipo de tumor ao tratamento com drogas alquilantes e TNF.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Analisar o papel biológico de PTX3 no desenvolvimento de tumores induzidos experimentalmente pela inoculação subcutânea de células de melanoma murino em camundongos geneticamente modificados para PTX3.

3.2 ESPECÍFICO

1. Estabelecer a curva de crescimento de tumores induzidos pela injeção subcutânea das linhagens de melanoma B16F-10 Nex2 em camundongos transgênicos (**Tg2**) e compará-la com a curva obtida de seus respectivos camundongos do tipo selvagem (**WTTg2**).
2. Estabelecer a curva de crescimento de tumores induzidos pela injeção subcutânea das linhagens de melanoma B16-F10 em camundongos nocaute para PTX3 (**PTX3KO ou KO**) os quais, não produzem a proteína codificada por este gene, e compará-la com a curva obtida de seus respectivos camundongos do tipo selvagem (**WTKO**).
3. Avaliar, através da análise histológica de cortes de pele no local da injeção das células tumorais (tempos de 24, 48 e 72 horas) ou dos tumores recolhidos dos animais (10 dias), a presença de áreas de necrose, área tumoral, porcentagem de infiltrado de células inflamatórias e o número de células tumorais.

MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 CAMUNDONGOS

Foram utilizados animais transgênicos para PTX3 gerados e caracterizados por DIAS et al. (2001). Estes animais foram gerados no background CD1 e carregam duas (PTX3Tg2 ou Tg2) ou quatro (PTX3Tg4 ou Tg4) cópias extras do transgene, sob controle do próprio promotor de PTX3. Foram usados nos ensaios, animais heterozigotos e, como controles, animais WT da linhagem CD1 (WTTg2).

Os animais deletados para PTX3 (PTX3KO ou KO) foram gerados e caracterizados por VARANI et al. (2002) e foram gentilmente cedidos pelo Dr. Martin Matzuk da Baylor College of Medicine (Houston, Texas). Em linhas gerais, os animais foram obtidos pela deleção, por recombinação homóloga, dos éxons 1 e 2 do gene *ptx3*. Os camundongos PTX3KO apresentam background genético misto de C57BL/6 e 129/SvEv e os animais WT (WTKO) usados como controle apresentam o mesmo background.

Foram utilizados camundongos machos, apresentando entre 6 a 10 semanas de idade, mantidos em biotério, em mini-isoladores e sob regime de 12 horas de luz, no biotério do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer e recebendo água acidificada e ração autoclavadas *ad libitum*.

Os animais foram sacrificados, pelo método de anestesia profunda com Halotano, em tempos determinados pelo experimento ou sempre que os tumores

induzidos apresentarem tamanho igual ou maior que 3cm² para evitar o sofrimento dos mesmos.

Todos os procedimentos empregados na manipulação dos camundongos seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) que segue as normas do *International Council for Laboratory Animal Science* (ICLAS).

4.2 CÉLULAS

Foram utilizadas três linhagens celulares de melanoma murino, B16-F1, células de melanoma murino metastático obtidas originalmente após uma passagem em pulmão (FIDLER 1973), B16-F10 Nex2, uma sub-linhagem derivada da B16-F10 e, a B16-F10, células de melanoma murino metastático obtidas originalmente após 10 passagens em pulmão (FIDLER 1973). A linhagem B16-F1 utilizada neste estudo era proveniente do banco de células do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (ILPC), a B16-F10 Nex2 foi cedida pela UNOEX - UNIFESP, e a linhagem B16-F10 foi gentilmente cedida pelo Dr. Roger Chammas, vindas do banco de células do laboratório de Oncologia da EPM/UNIFESP.

As células B16-F1 foram cultivadas em meio DMEM (Gibco) e as células B16-F10 e B16-F10 Nex2 em meio RPMI (Gibco), ambos os meios suplementados com 10% de soro bovino fetal e acrescidos de 40µg/ml de gentamicina, à 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂.

4.3 AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR MICOPLASMA NAS LINHAGENS CELULARES B16-F1 E B16-F10 E, CARACTERIZAÇÃO DAS MESMAS, UTILIZANDO MARCADORES IMUNOHISTOQUÍMICOS

Antes de preparar o estoque de células a serem utilizadas neste projeto, procedemos à avaliação das mesmas no que se refere à contaminação por micoplasma e também à expressão de marcadores de superfície característicos de células de melanoma.

A avaliação da presença ou não da contaminação por micoplasma foi feita pelo método de PCR duplex. O protocolo utilizado para esta técnica, foi adaptado em nosso laboratório a partir do sugerido pelo aluno de mestrado em andamento Clayton Fagundes Machado, o qual gentilmente nos cedeu os iniciadores utilizados na reação.

- GAPDH: Foward: 5' CTG CAC CAC CAA CTG CTTA 3'
Reverse: 5' CAT GAC GGC AGG TCA GGTC 3'
- MICO: Foward: 5'GGC TGG GTG AGT AAC ACG 3'
Reverse: 5'CGG ATA ACG CTT GCG ACC TATG 3'

O tamanho do amplicon usando o iniciador GAPDH é de 350pb e o empregando o iniciador para detecção de DNA de micoplasma 500pb.

Como controle positivo das reações foram usados DNAs extraídos de uma linhagem, contaminada por micoplasma, N2a (Neuro-2a, neuroblastoma murino).

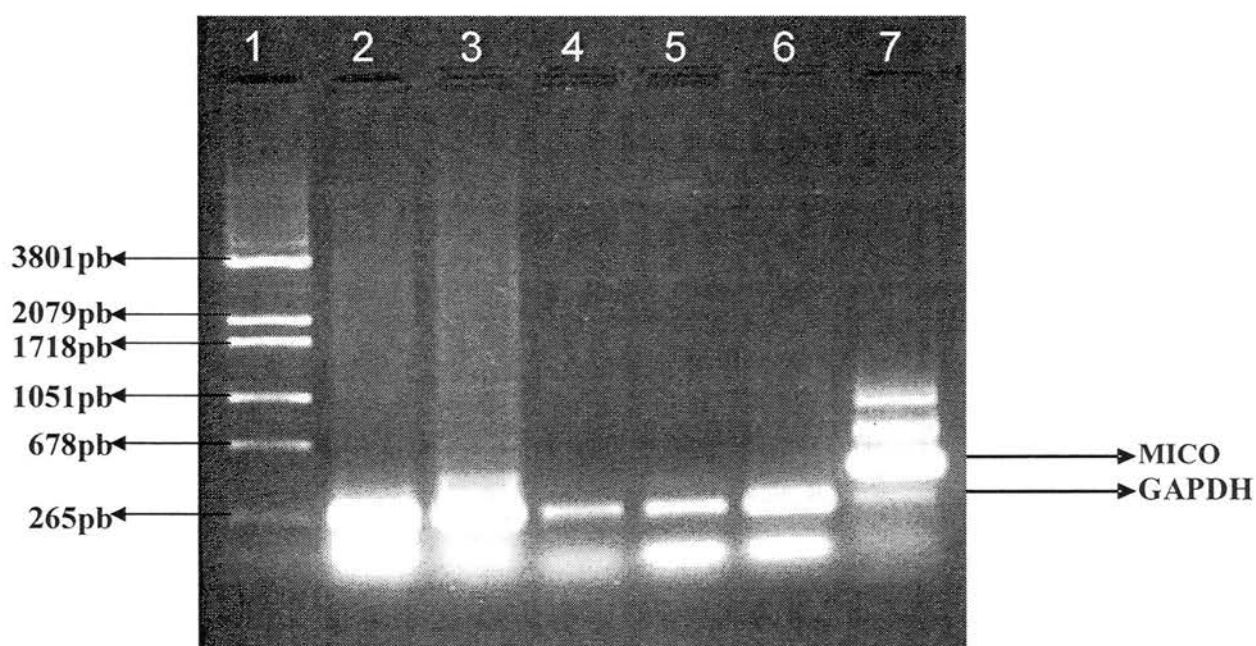
Como controle negativo foram usados DNAs da linhagem Mef CW (fibroblastos provenientes de camundongos do tipo selvagem), livre de contaminação. Estes controles nos foram gentilmente cedidos pela pesquisadora Regina Nomizo.

Foi descongelada uma alíquota contendo 1ml de cada linhagem na quantidade de 1×10^6 células (B16-F1 e B16-F10), em meio DMEM e RPMI respectivamente, e as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. Os sedimentos de células foram lavados duas vezes em PBS e, finalmente homogeneizados em 500µl de Solução de Lise (100mM Tris HCL pH 8,5; 5mM EDTA pH 7,5; 0,2% SDS; 200mM NaCl; 100mg/ml PK; água q.s.p.) e, levados ao Termomix por 3 horas à 1000 rpm, seguido de centrifugação por 5 minutos à 14.000 rpm. Foram acrescentados 500µl de Isopropanol seguido de centrifugação por 5 minutos a 8000 rpm; lavados com etanol (ETOH) 70% e novamente centrifugados por 5 minutos a 8000 rpm. Depois de secos, os DNAs foram ressuspensos em 30µl de água autoclavada.

Foi feito um “mix” para a PCR Duplex contendo, 1X PCR *buffer* 10X; 1,5mM $MgCl_2$ 25mM; 4% DMSO; 0,25mM dNTP 25mM; 0,4 pmol/ µl MICO Fw 5pmol/µl; 0,4 pmol/ µl MICO Rv 5pmol/µl; 0,4 pmol/ µl GAPDH Fw 5pmol/µl; 0,4 pmol/ µl GAPDH Rv 5pmol/µl; 0,125µl Taq Polimerase 5u/λ; água q.s.p. (feito dentro do fluxo). Foram colocados 25 µl do “mix” em cada eppendorf acrescidos de 2 µl da amostra. Os parâmetros da PCR foram: 1 ciclo de 5 minutos à 95°C; 29 ciclos de 1 minuto à 95°C, 1 minuto à 62°C, 1 minuto à 72°C por; 1 ciclo de 7 minutos à 72°C.

Foram aplicados 10 µl de cada produto amplificado, para serem fracionados eletroforéticamente em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, em um total de 6 amostras, sendo duas delas referentes aos controles (negativo e positivo).

Observamos, na amostra 7 (Figura 1), correspondente ao controle positivo, o aparecimento de duas bandas amplificadas, uma de aproximadamente 500pb e outra de aproximadamente 350pb, correspondentes respectivamente ao micoplasma e ao GAPDH. Já nas amostras de DNA extraídas das culturas, vemos a amplificação de apenas uma banda correspondente ao GAPDH. Mediante essas observações, concluímos que o resultado do teste de PCR para micoplasma foi negativo para as duas amostras de linhagens celulares testadas.



Legenda: Eletroforese em gel de agarose 1% dos DNAs extraídos dos cultivos das linhagens celulares (B16-F1 e B16-F10). Foi realizada uma PCR duplex empregando iniciadores para micoplasma e GAPDH, e como molde, DNAs extraídos de 1×10^6 células das linhagens B16-F1 e B16-F10. O produto dessa PCR foi fracionado eletroforéticamente em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. Canaleta 1: Pel 45 digerido com Hind III usado como marcador de tamanho. Canaletas 2 e 3: produto amplificado por PCR a partir do DNA extraído de B16-F1 e B16-F10, respectivamente. Canaletas 4 e 5: produto amplificado por PCR a partir do DNA extraído de B16-F1 e B16-F10, respectivamente, diluídos 1:10. Canaletas 6 e 7: produto amplificado por PCR a partir do DNA extraído de amostras correspondentes, respectivamente, aos controles negativo e positivo.

Figura 1 - Avaliação de contaminação por micoplasma das linhagens de melanoma.

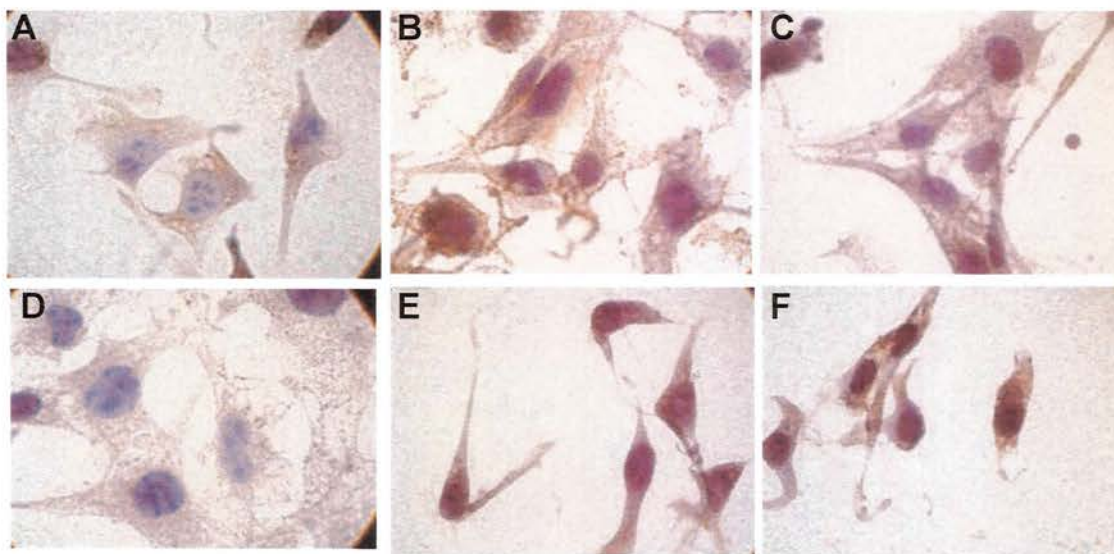
Para a caracterização das linhagens, foi descongelada uma alíquota contendo 1ml de cada linhagem celular na quantidade de 1×10^6 células e, cada uma foi expandida até que atingisse uma confluência entre 70 – 90% em uma garrafa grande (162 cm^2). As células foram tripsinizadas e ressuspensas em 10 ml de meio apropriado. Foram feitas diluições seriadas (1:10), para obter-se os números de 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 células. Em cada poço da placa “Lab Tek” foram colocados 0,4 ml de cada diluição (em duplicata). A placa permaneceu por 16 horas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 ; após esse período o meio foi aspirado e cada poço lavado duas vezes com PBS. As lâminas foram cobertas com PBS e submetidas à reação de imunocitoquímica utilizando os marcadores HMB45 e S100, com o auxílio de Suely Nonogaki. Entretanto, o emprego deste protocolo acarretou em grandes áreas de descolamento e perda das células.

O experimento foi, então, repetido com algumas alterações. Para tal, utilizou-se uma garrafa grande (162 cm^2) de cada linhagem celular. Os mesmos passos foram seguidos, com exceção da ressuspensão dos sedimentos, que foi feita em 5 ml de meio e, dessa vez, antes de plaquear as células as lâminas foram incubadas com SFB por 30 minutos em estufa, nas mesmas condições descritas acima (por sugestão da pesquisadora Dra. Ana Lepique). As células foram plaqueadas na quantidade de 10^5 células, por poço, em uma placa Lab Tek de oito poços. O restante do procedimento seguiu como descrito anteriormente.

Foi realizada a reação de imunocitoquímica com os marcadores específicos para melanoma, S100 (anticorpo policlonal) e o clone HMB45, ambos fabricados pela DAKO A/S. O marcador S100, em tecido epitelial, marca melanócitos e células de Langerhan. Sua marcação é tanto citoplasmática quanto nuclear. O HMB45 é um

marcador específico para melanossomo. O fabricante recomenda fazer sempre um painel para S100 em paralelo com o HMB45, pois um resultado negativo para HMB45 não descarta a possibilidade de um melanoma, como é o caso dos melanomas desmoplásticos. Os controles negativos ficaram apenas sob tratamento com BSA (Sigma).

Como pode ser observado na Figura 2, as células apresentam um forte padrão de coloração para os marcadores S100 e HMB45, demonstrando que as linhagens celulares que serão utilizadas durante o projeto são de origem melanocítica.



Legenda: As células B16-F1 (painéis A, B e C) e B16-F10 (painéis D, E e F) foram cultivadas na densidade 10^5 por 16 horas em placas Lab Tek de 8 poços. Após esse período as células foram lavadas, fixadas e, a imunohistoquímica foi realizada com os marcadores específicos para melanoma, HMB45 (painéis B e E) e S100 (C e F). Os painéis A e D são controles com BSA. Visualização no aumento de 1000X.

Figura 2 – Imunohistoquímica das linhagens B16-F10 e B16-F1 utilizando os marcadores HMB45 e S100.

4.4 EXPANSÃO E CONGELAMENTO DAS LINHAGENS CELULARES DE MELANOMA MURINO

Uma vez verificada a integridade das linhagens celulares B16-F1 e B16-F10, prosseguiu-se na preparação de um estoque congelado na mesma passagem para ser usado em todo o projeto.

A linhagem celular B16-F1 foi cultivada em meio DMEM (D10), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de L-glutamina. Já a linhagem B16-F10 foi cultivada em meio RPMI (R10) suplementado com 10% de SFB. As células permaneceram, durante sua cultura, em estufa à 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, até atingirem uma confluência de 80 a 90%. Neste momento o meio das células era substituído por um novo e, três horas após essa troca as culturas eram submetidas ao congelamento nos respectivos meios de cultura acrescidos de 40% SFB e 10% DMSO. Os criotubos contendo as células foram estocados à -70°C por 16 horas e posteriormente transferidos para o nitrogênio líquido (N₂). Foram estocados 51 criotubos contendo 1x10⁶ células B16-F1 e 15 contendo 2x10⁶ células. Para a linhagem B16-F10 foram armazenados 39 criotubos contendo 1x10⁶ células e, 07 contendo 2x10⁶.-

Antes de cada procedimento experimental onde se utilizaram as linhagens celulares acima relatadas, foi seguido o seguinte padrão de descongelamento e expansão; as células foram descongeladas no seu respectivo meio de cultura em garrafa pequena (25 cm² de área) e cultivadas até atingirem uma confluência entre 70 – 90%; passaram para uma garrafa média (75 cm² de área) e, depois para 2 garrafas grandes (162 cm² de área). Ao final, quando atingiram 70 a 90% de confluência, o

meio foi retirado, as células lavadas abundantemente com PBS e tripsinizadas, utilizando tripsina 0,02%, durante 1 ou 2 minutos; sendo imediatamente ressuspensas em seu respectivo meio. Para avaliação do número de células e da viabilidade celular, as células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando-se o método de exclusão pelo azul de Trypan. Só foram utilizadas nos experimentos as preparações que apresentarem mais de 90% de viabilidade.

4.5 DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO TUMORAL DOS CAMUNDONGOS

Os camundongos tiveram os flancos previamente depilados com a ajuda de um depilador elétrico e tesoura, e as células, em número indicado de acordo com cada experimento, foram injetadas com agulha de 27,5G em volume de 0,2ml no flanco direito. Em cada dois dias os dois maiores diâmetros do tumor foram medidos e a área calculada. Os animais foram sacrificados quando o tumor atingir medida de aproximadamente 3cm² para minimizar o sofrimento.

Para análise de sobrevida dos animais foi utilizado o teste de Log-Rank e para a comparação entre as curvas a análise foi feita através do teste de Kruskal-Wallis. Para todos os testes foi estabelecido um erro $\alpha=5\%$, isto é, os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p<0,05$. Estas análises foram conduzidas com o auxílio da Dra Karina Ribeiro do departamento de Registro Hospitalar do Hospital do Câncer AC Camargo (RHC).

4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A pele ou tumor presentes na área de inoculação das células tumorais foram removidos, com os animais já sacrificados pelo método de anestesia profunda, em diferentes tempos após a inoculação. Os tumores ou peles que foram empregados na análise histopatológica, foram imediatamente colocados, para fixação, em formol tamponado. Após processamento, emblocamento em parafina e coloração com hematoxilina-eosina, foram analisados com a supervisão do patologista Dr. Gilles Landman, Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer AC Camargo. Avaliaram-se os seguintes parâmetros: porcentagem de infiltrado inflamatório, número de células tumorais, extensão de áreas necróticas e da área tumoral. A confecção das lâminas foi realizada por Carlos Ferreira Nascimento e Severino S. Ferreira, funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo.

A verificação de infiltrado inflamatório presente em cada lâmina foi realizada com o auxílio de uma lente com graticulo; cuja grade é numerada de 0 a 100. A estratégia utilizada foi contar os infiltrados inflamatórios presentes sobre a intersecção das retas, contando-se até 10 campos por lâmina. A partir disso, obteve-se a média dos valores, em porcentagem, dos campos registrados de cada lâmina. Para a contagem do número de vasos foi utilizada uma lente com graticulo em linhas, contando-se apenas os vasos presentes sob as retas, foram verificados até 10 campos por lâmina.

No processo de análise fotomicrográficas, foram fotografados até dez campos representativos de cada lâmina (uma lâmina por tumor / pele). Para isso utilizou-se

equipamentos como o fotomicroscópio Zeiss Axioskop 40, munido de câmera digital Sony Cyber-Shot (3.3 mega pixels), acoplado ao computador Pentium III Fujitsu, portador software AxioVision versão 3.1 (Zeiss) para análise das imagens. Os dados registrados foram os referentes área de necrose. Em seguida calculou-se as médias dos valores dos campos registrados de cada lâmina.

Já para a análise do parâmetro área tumoral, foram fotografadas a área tumoral total de cada lâmina, num aumento de 1,25x, e escala de 680 x 512, com o auxílio de microscópio Olympus IX70 acoplado a uma câmera Olympus DP70 e através dos programas DPC Controller e DP Mannager da Olympus Optical. Para análise dessas imagens foi utilizado o programa Image-Pro Plus versão 4.5.1.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS A SEREM INJETADAS NOS CAMUNDONGOS E CONFIRMAÇÃO DA DOSE IDEAL PARA INJEÇÃO

Para indução experimental do melanoma nos camundongos, as células de cada linhagem foram injetadas no flanco traseiro direito dos animais, previamente depilados com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e um depilador manual. As quantidades de células escolhidas para teste foram 1×10^6 , 1×10^5 , 5×10^5 e 5×10^4 . Os camundongos foram contidos fisicamente e com cuidado, pela base da cauda e pela pele da nuca contra a grade da tampa de uma gaiola. Em cada animal foi injetada a quantidade de células estipulada, num volume total de 200 μ l em PBS, subcutâneamente no flanco direito, utilizando seringa de 1ml e agulha de 27,5G. Foram utilizados 05 animais para cada experimento com quantidades de células diferentes.

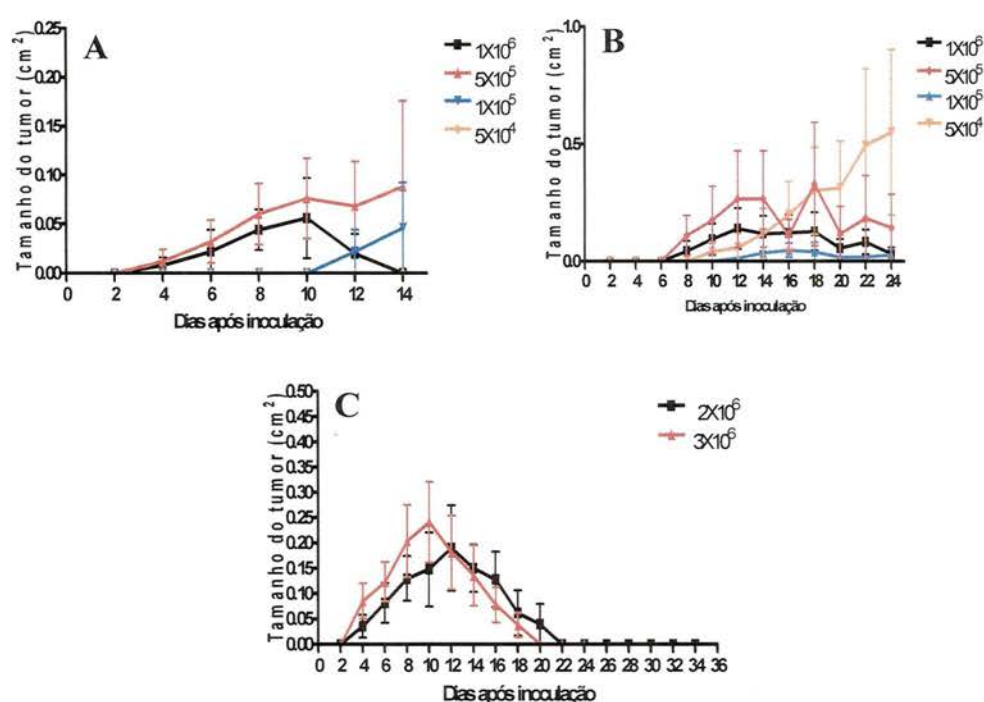
O crescimento tumoral foi monitorado a cada dois dias, utilizando-se um paquímetro de precisão (Mitutoyo, Brasil), para medir os dois maiores diâmetros do tumor e a área foi calculada. Os animais foram sacrificados quando os tumores atingiram tamanho igual ou superior a 3cm^2 . Os dados foram utilizados na construção de curvas de crescimento tumoral *versus* tempo de crescimento tumoral utilizando o software GraphPad Prism4. Assim, pudemos analisar quais as duas melhores quantidades de células que foram confirmadas em novo experimento, com

as quantidades de células escolhidas. A quantidade ideal de célula a ser escolhida deveria formar tumor em praticamente 100% dos animais em menor tempo.

A inoculação das células de melanoma nos animais WTTg2, nas diferentes quantidades celulares empregadas, levou ao desenvolvimento de tumores medindo no máximo $0,5 \text{ cm}^2$, em alguns animais, mas a partir, de paroximadamente, dia 10 após inoculação, esses animais iniciavam um quadro de regressão tumoral até que o nódulo sumisse completamente (Figura 3). Testou-se, então, a eficiência de uma quantidade maior de células, 2×10^6 e 3×10^6 células/animal ($n = 05$ para cada experimento), mas o resultado observado foi semelhante ao das outras doses aplicadas, como mostra a figura 3C. Alguns desses animais, enquanto restavam um pequeno nódulo ou apenas a presença de mancha na pele, foram sacrificados pelo método de anestesia profunda e autopsiados (Figuras 3 A e B). A análise histológica da região de inoculação, obtida desses animais, mostrou a presença de macrófagos contendo melanina em seu interior e total ausência de células tumorais de melanoma viáveis.

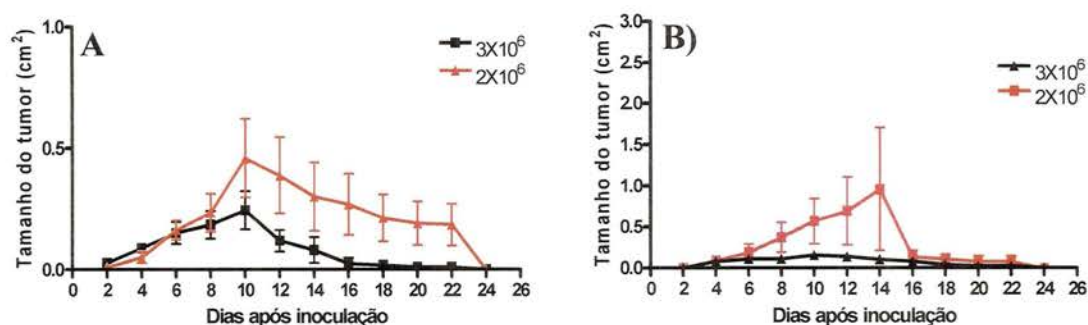
Os dados obtidos a partir dos experimentos com a linhagem de camundongos CD1 (WTTg2) indicavam que esses camundongos eram resistentes ao desenvolvimento de tumores decorrentes da inoculação das linhagens celulares de melanoma usadas. Uma vez que, tanto as células B16-F1 como a B16-F10, são linhagens de melanoma murino originadas espontaneamente em camundongos C57BL/6J, elas não são singenéticas à linhagem de camundongos CD1, portanto, a incapacidade de originarem tumores nesta outra linhagem de camundongos é compreensível. Entretanto, ainda na tentativa de avaliar se a expressão aumentada de PTX3, nos animais Tg2, poderia alterar a resposta obtida na linhagem CD1, foram

feitos experimentos inoculando-se as quantidades de 2×10^6 e 3×10^6 células tumorais/animal ($n = 05$ para cada experimento), tanto para B16-F1 quanto para B16-F10. Como pode ser observado na Figura 4, o resultado obtido nos animais Tg2 foi semelhante aos obtidos com os animais do tipo selvagem, apesar de observarmos em alguns animais Tg2 tumores de $0,5 \text{ cm}^2$ em média, metade do tamanho observado nos animais WTTg2.



Legenda: Os gráficos representam a média e o desvio padrão do crescimento e regressão dos tumores experimentalmente induzidos pela inoculação subcutânea das células de melanoma murino B16-F1 (painel A) e B16-F10 (painéis B e C) nas diferentes quantidades de células 1×10^6 , 5×10^5 , 1×10^5 , 5×10^4 (painéis A e B) e 2×10^6 e 3×10^6 (painel C) em animais WTTg2. A quantidade de animais utilizadas em cada experimento foi igual a 05. As medidas foram tomadas a cada dois dias com auxílio de um paquímetro manual.

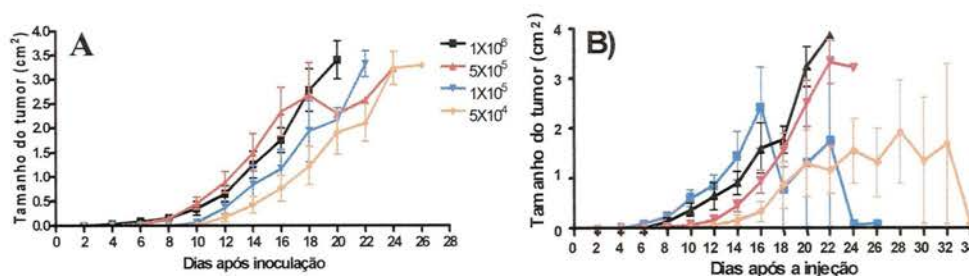
Figura 3 - Curva de crescimento dos tumores induzidos experimentalmente em animais WTTg2.



Legenda: Os gráficos representam a média e o desvio padrão do crescimento e regressão dos tumores experimentalmente induzidos pela inoculação subcutânea das células de melanoma murino B16-F1 (painel A) e B16-F10 (painel B) nas diferentes quantidades de células 2×10^6 e 3×10^6 em animais Tg2 (n=05). As medidas foram tomadas a cada dois dias com auxílio de um paquímetro manual.

Figura 4 - Curva de crescimento dos tumores induzidos experimentalmente em animais Tg2.

Na Figura 5 são mostradas as curvas de crescimento de tumores experimentalmente induzidos pela inoculação de células B16-F10 e B16-F1 em camundongos WTKO. Todas as doses foram capazes de induzir tumor nesses animais, porém a dose 1×10^6 células/animal (n=10) obedeceu melhor aos critérios estabelecidos. Nesta dose, todos os animais apresentaram tumor no 8º dia pós-inoculação, enquanto na dose de 5×10^5 células/animal (n=10), todos os animais apresentaram tumor no 10º dia.



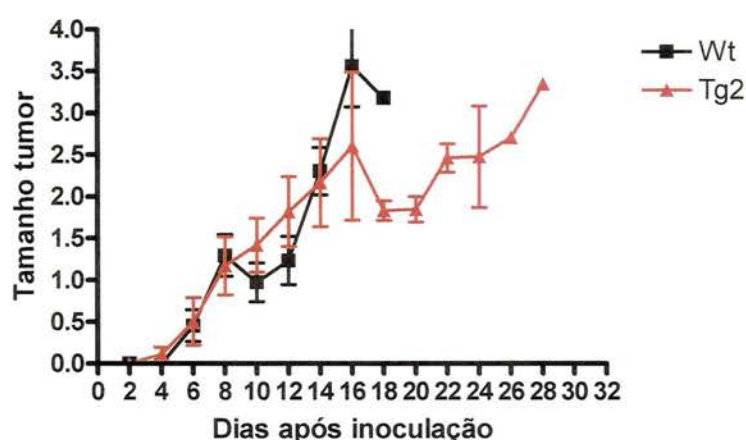
Legenda: Os gráficos representam a média e o desvio padrão do crescimento de tumores experimentalmente induzidos pela inoculação subcutânea das células de melanoma murino B16-F1 (painel A) e B16-F10 (painel B) nas diferentes quantidades de células; 1×10^6 , 5×10^5 , 1×10^5 e 5×10^4 , em animais WTKO. Nas quantidades de células 1×10^6 , 5×10^5 foram utilizados 10 animais para cada experimento, e nas demais quantidades foram utilizados 05 animais em cada experimento. O crescimento do tumor foi monitorado a cada dois dias até que o mesmo atingisse aproximadamente 3 cm^2 , quando, então os animais eram sacrificados. As medidas foram tomadas a cada dois dias com auxílio de um paquímetro manual.

Figura 5 - Curva de crescimento dos tumores induzidos experimentalmente em animais WTKO.

5.2 CURVA DE CRESCIMENTO TUMORAL *VERSUS* TEMPO DOS ANIMAIS TG X WTTG

Visto que a linhagem celular, B16-F10, utilizada nos experimentos não induziu tumores nos animais de *background* CD1, resolveu-se utilizar uma outra linhagem celular existente no laboratório, denominada B16-F10 Nex2, que já havia sido avaliada, caracterizada, padronizada e utilizada em outro projeto do mesmo grupo, mostrando-se capaz de induzir tumor nos animais da linhagem CD1. A partir desse momento, os experimentos com essa nova linhagem celular, foram realizados em parceria com a Dra Elaine G. Rodrigues, do Departamento de Disciplina Biologia Celular – UNIFESP.

Em um primeiro momento, para construção da curva de crescimento tumoral, foram inoculadas 1×10^6 células da linhagem B16-F10 Nex2 em 05 camundongos Tg2 e, em 05 camundongos WTTg2 (Figura 6). O protocolo seguido foi o mesmo que os anteriores. Apesar de que quando observamos o gráfico, ele nos sugerira a existência de uma diferença entre os grupos; a análise estatística, de acordo com os parâmetros anteriormente descritos para indução tumoral, demonstrou não haver diferença estatística relevante entre os grupos; o que nos levou a supor que a quantidade de células utilizadas era muito alta.

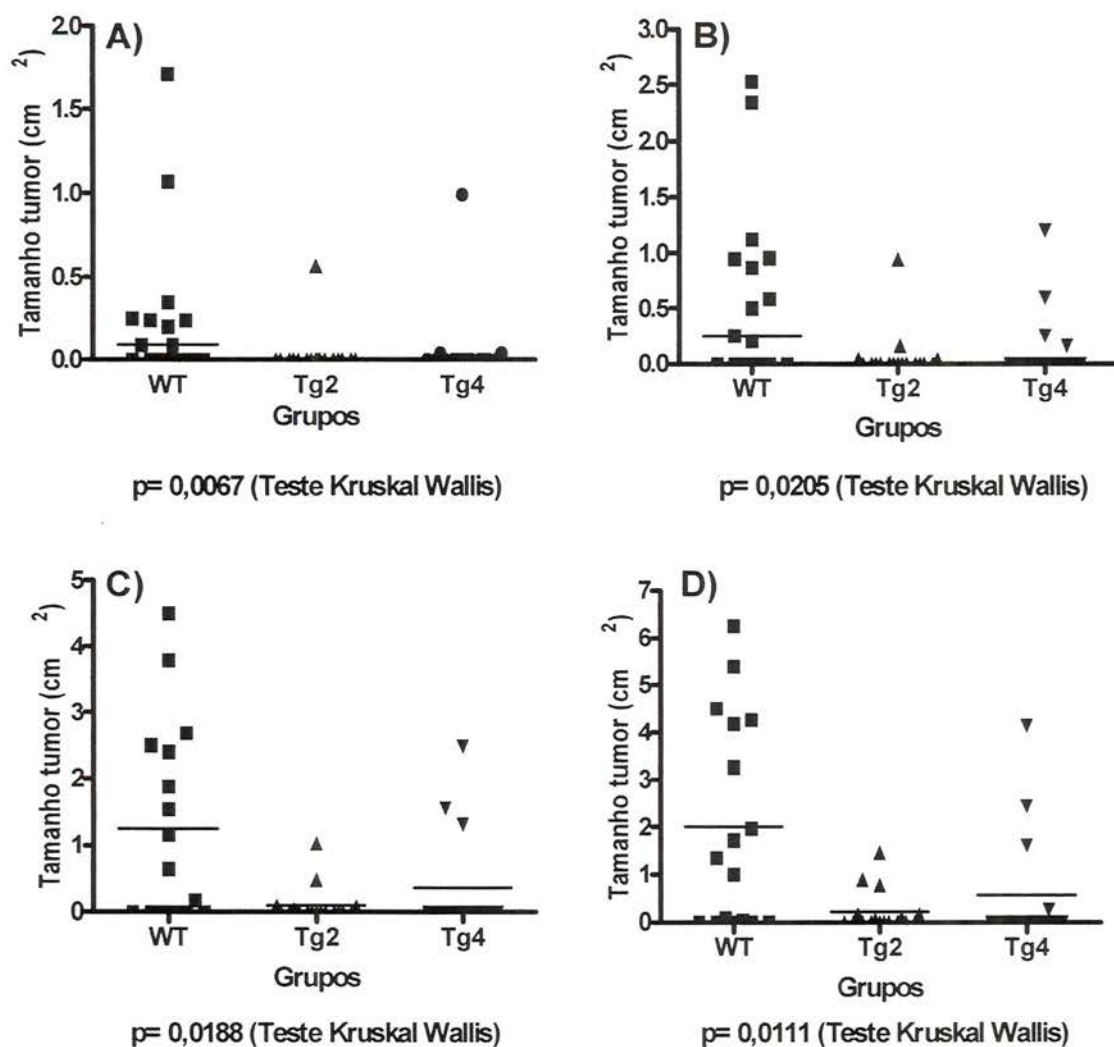


Legenda: O gráfico representa a média e o desvio padrão do crescimento dos tumores experimentalmente induzidos pela inoculação subcutânea das células de melanoma murino B16-F10 Nex2 nas quantidades de 1×10^6 células em animais Tg2 e seus respectivos animais controles (n=05/grupo). O crescimento do tumor foi monitorado a cada dois dias até que o mesmo atingisse aproximadamente 3 cm^2 , quando, então os animais eram sacrificados. As medidas foram tomadas a cada dois dias com auxílio de um paquímetro manual.

Figura 6 - Curva de crescimento dos tumores induzidos experimentalmente em animais Tg2 *versus* WTTg2.

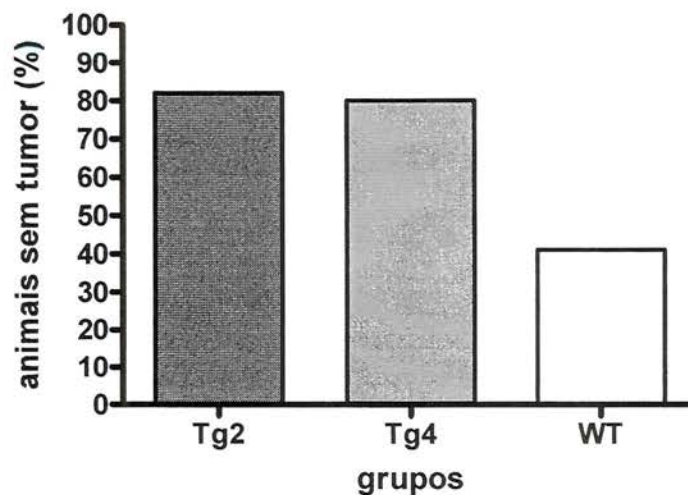
Diante desse resultado, no experimento subsequente utilizaram-se 17 animais Tg2, 15 animais Tg4 (contendo quatro cópias extras para o gene PTX3) e, 17 animais

WTTg. Inoculou-se a quantidade de 5×10^5 células/animal, e os mesmos foram monitorados em dias pontuais (18°, 22°, 25°, 29° e 31°). Com o auxílio do paquímetro de precisão, mediu-se os dois maiores diâmetros do tumor e, com isso obteve-se a área tumoral. Os animais foram sacrificados quando os tumores atingiram tamanho aproximado a 3cm^2 . Foi construído um gráfico, onde podemos notar que os animais WTTg atingiram a medida máxima mais rapidamente do que os animais transgênicos. Os dados coletados em cada dia foram analisados estatisticamente, através do teste de comparações múltiplas de Tukey HSD, que demonstrou diferença significativa entre alguns grupos analisados nos dias específicos (Figura 7). Através do teste Kruskal Wallis verificamos uma diferença estatisticamente relevante entre os três grupos nos dias 22 ($p = 0,007$), 25 ($p = 0,02$), 29 ($p = 0,019$) e 31 ($p = 0,011$). No dia 18 nenhum dos animais apresentavam tumor. Com base nesse mesmo experimento, foi feita uma análise para verificar o “Take Rate” (Figura 8) desses animais, ou seja, a quantidade de animais que não apresentaram tumor até o final do experimento, o resultado mostrou que cerca de 80% dos animais transgênicos (Tg2 e Tg4) não apresentaram tumor, contra 41% dos animais WTs ($p = 0,017$ – teste de Q-quadrado).



Legenda: Os gráficos representam o crescimento tumoral em dias aleatórios, 18°, 22° (gráfico A), 25° (gráfico B), 29° (gráfico C) e 31° (gráfico D), dos animais Tg2 (n=17), Tg4 (n=15) e WTTg (n=17) após inoculação de 5×10^5 células. O crescimento do tumor foi monitorado a cada dois dias até que o mesmo atingisse aproximadamente 3cm^2 , quando, então os animais eram sacrificados. As medidas foram tomadas a cada dois dias com auxílio de um paquímetro manual. O teste de “Kruskal-Wallis” revelou diferença estatisticamente relevante entre o grupo WT *versus* Tg2 nos dias 22°, 25°, 29° e 31°, e entre o grupo WT *versus* Tg4 as diferenças estatísticas foram notadas apenas nos dias 29° e 31°.

Figura 7 - Gráficos de crescimento tumoral pontual.



Legenda: O gráfico representa o “Take Rate”, ou seja, a quantidade de animais que não apresentaram tumor até o final do experimento. Os dados dessa análise foram retirados do experimento de dias pontuais, representado pela figura acima. (p valor de 0,017 – teste Q-quadrado).

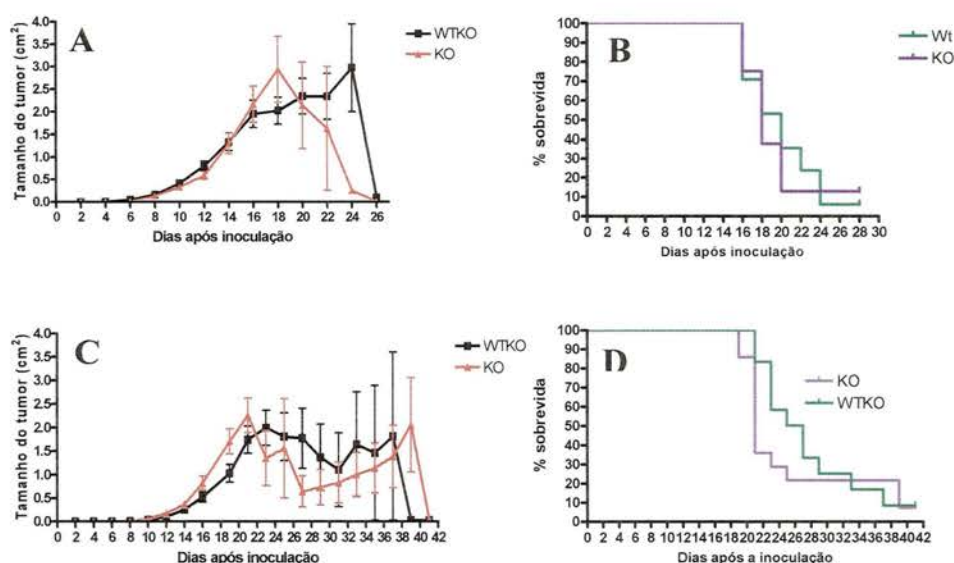
Figura 8 - Gráfico demonstrando o “Take Rate” entre os grupos.

5.3 CURVA DE CRESCIMENTO TUMORAL *VERSUS* TEMPO E SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS KO X WTKO

Para a realização da curva de crescimento tumoral foram utilizados 08 camundongos KO e 17 camundongos WTKO. Nesses animais foram inoculadas 1×10^6 células da linhagem B16-F10 por animal, seguindo o mesmo protocolo de inoculação mencionado anteriormente. O crescimento tumoral foi monitorado a cada dois dias, medindo-se os dois maiores diâmetros do tumor e a área foi calculada. Os animais foram sacrificados quando os tumores atingiram tamanho aproximado a 3cm^2 .

Os dados foram utilizados na construção da curva de crescimento tumoral *versus* tempo utilizando o software GraphPad Prism4, como mostra a figura 9. Esses dados foram analisados estatisticamente com o auxílio da Dra Karina Ribeiro do departamento de Registro Hospitalar do Hospital do Câncer AC Camargo, e

demonstraram não haver diferença estatística relevante entre os grupos. A análise da curva de sobrevida desses animais demonstrou não ter diferença estatística relevante. Esse resultado revelou que, possivelmente, a quantidade de células injetadas tenha sido muito alta, podendo mascarar as possíveis diferenças entre os grupos. A partir disso, resolvemos utilizar uma quantidade menor de células, 1×10^5 células/animal. Para tal, foram utilizados 14 camundongos KO e 15 camundongos WTKO. As análises da curva de crescimento tumoral *versus* tempo. E as curvas de sobrevida desses animais, não demonstraram diferença estatística relevante.



Legenda: Os gráficos A e C representam a média e o desvio padrão do crescimento dos tumores experimentalmente induzidos pela inoculação subcutânea das células de melanoma murino B16-F10 nas diferentes quantidades de células (A- 1×10^6 e C- 1×10^5) em animais KO e WTKO. O crescimento do tumor foi monitorado a cada dois dias até que o mesmo atingisse aproximadamente 3 cm^2 , quando, então os animais eram sacrificados. As medidas foram tomadas a cada dois dias com auxílio de um paquímetro manual. Os gráficos B e D representam as curvas de sobrevida referente às doses descritas para os gráficos A e C, respectivamente.

Figura 9 - Curva de crescimento dos tumores e sobrevida dos animais KO *versus* WTKO.

5.4 INDUÇÃO DE TUMOR E COLETA DE MATERIAL EM TEMPOS PRECOCES E TARDIOS APÓS A INJEÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS

Os animais Tg2 e seus respectivos WTs foram inoculados com 1×10^6 células da linhagem B16-F10 Nex2, enquanto os animais KO e seus respectivos WTs receberam a mesma quantidade de células da linhagem de melanoma B16-F10, utilizando o método de inoculação já descrito anteriormente. Essa quantidade de células foi escolhida porque foi preciso coletar amostras de tecido em 24 horas, um tempo muito precoce, portanto era mais certeza de que com 1×10^6 as células já estivessem em processo de implantação do que se usássemos a quantidade menor, de 5×10^5 , que foi a que demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados.

Para cada linhagem de camundongos, foram utilizados cinco animais para cada tempo de sacrifício, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 10 dias, totalizando quarenta animais. Em cada tempo, foram coletados soro e amostras de pele ou tumor, estas últimas foram coletadas para a realização de lâminas para análise histológica. Logo após a coleta as amostras foram fixadas em formol tamponado. Após processamento, emblocamento em parafina e coloração com hematoxilina-eosina, foram preparados cortes histológicos para análise.

5.5 ANÁLISES HISTOLÓGICAS DAS LÂMINAS DE AMOSTRAS DE PELE E TUMOR COLETADOS

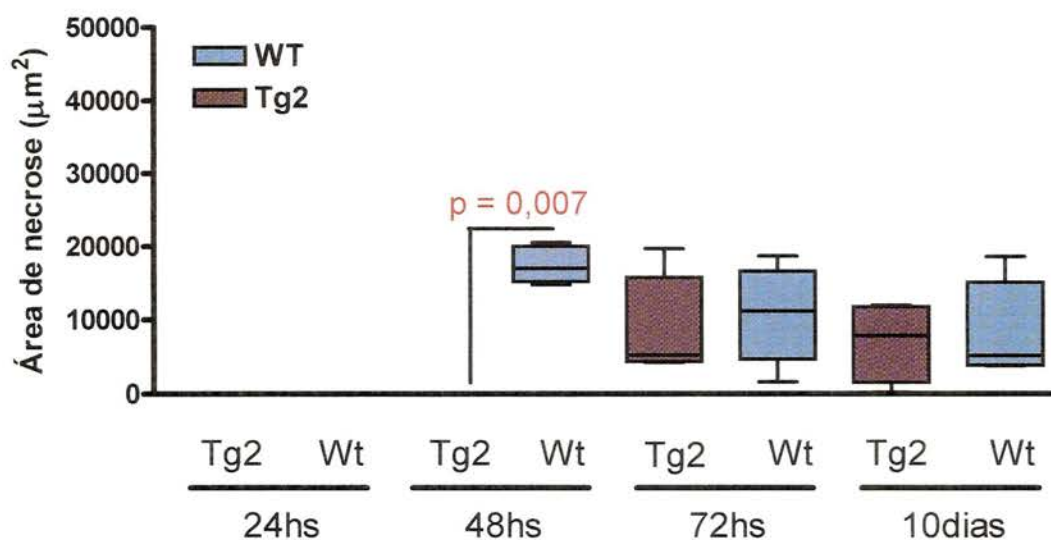
Essas análises foram feitas com a supervisão do patologista Dr. Gilles Landman, Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer AC Camargo.

Para analisar os parâmetros área de necrose (Figura 10) e número de células tumorais (Figura 12), foram fotografados até dez campos representativos de cada lâmina, num aumento de 400x e, as imagens foram analisadas através do software AxioVision versão 3.1, e foi calculada a média por lâmina, para cada um dos parâmetros. A verificação da porcentagem de infiltrados inflamatórios (Figura 13) presentes em cada lâmina, foi realizada com uso de lente com graticulo (grade numerada de 0 a 100), num aumento de 1000x; onde foram contadas as células inflamatórias presentes sobre a intersecção das retas. Foram contados até 10 campos por lâmina. Foi calculada a média dos valores, em porcentagem, dos campos registrados de cada lâmina.

Já para a análise do parâmetro área tumoral (Figura 11), foram fotografadas a área tumoral (Figura 14) total de cada lâmina, num aumento de 1,25x escala de 680 x 512, através dos programas DPC Controller e DP Mannager da Olympus Optical. Para mensurar essas áreas foi utilizado o programa Image-Pro Plus versão 4.5.1.

Os dados referentes à área tumoral, número de células tumorais, média da área de necrose, e média da porcentagem de infiltrados inflamatórios por lâmina, foram utilizados para a construção dos gráficos representados pelas Figuras 10-13

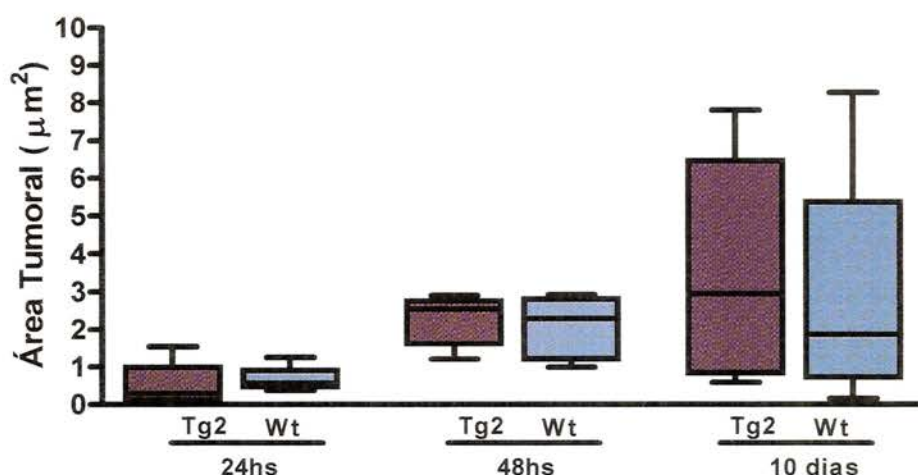
feitos através do software GraphPad Prism 4. O teste estatístico utilizado foi o Mann-Whitney.



Legenda: O gráfico representam a média e o desvio padrão da área de necrose das lâminas histológicas confeccionadas a partir de amostras de pele ou tumor experimentalmente induzidos pela inoculação subcutânea das células de melanoma murino B16-F10 Nex2 na quantidade de 1×10^6 células em animais Tg2 e WTTg2. A análise foi feita com a utilização do programa AxioVision versão 3.1, e a análise estatística foi feita pelo teste de Mann-Whitney.

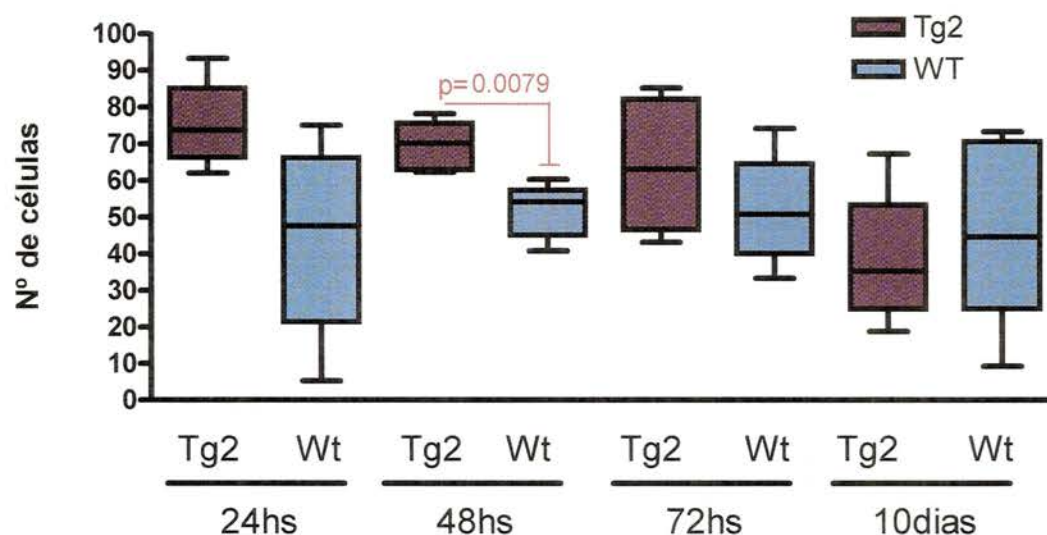
Figura 10 - Gráfico de área de necrose em tempos iniciais e tardios.

De acordo com os resultados demonstrados pelos gráficos das figuras 10, 11, 12 e 13, referentes ao grupos Tg2 e WTTg2 nota-se uma diferença estatisticamente significativa somente em 48 horas nos parâmetros infiltrado inflamatório ($p = 0,015$), área de necrose ($p = 0,007$) e número de células tumorais ($p = 0,007$).



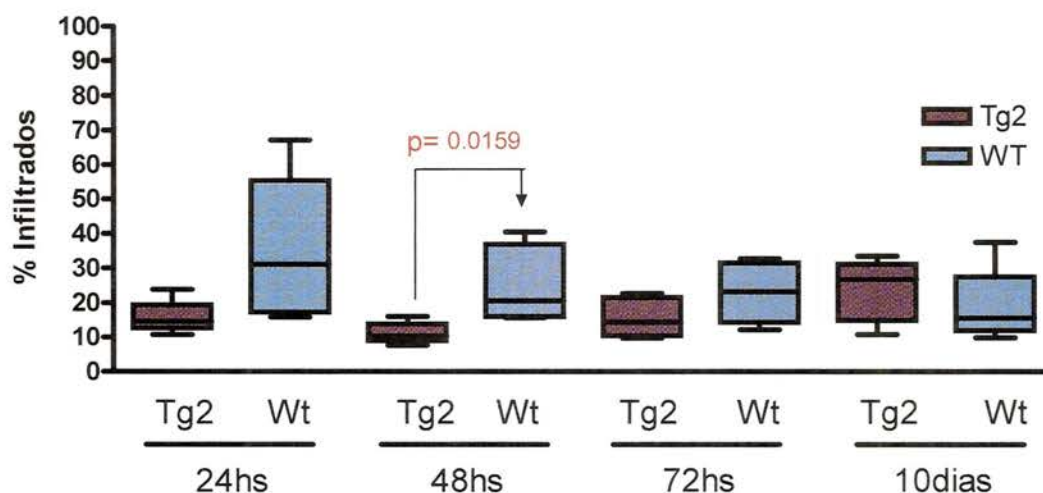
Legenda: O gráfico representam a média e o desvio padrão da área tumoral das lâminas histológicas confeccionadas a partir de amostras de pele ou tumor experimentalmente induzidos pela inoculação subcutânea das células de melanoma murino B16-F10 Nex2 na quantidade de 1×10^6 células em animais Tg2 e WTTg2. A análise foi feita com a utilização do programa Image-Pro Plus versão 4.5.1, e a análise estatística foi feita pelo teste de Mann-Whitney.

Figura 11 - Gráfico de área tumoral em tempos iniciais e tardios.



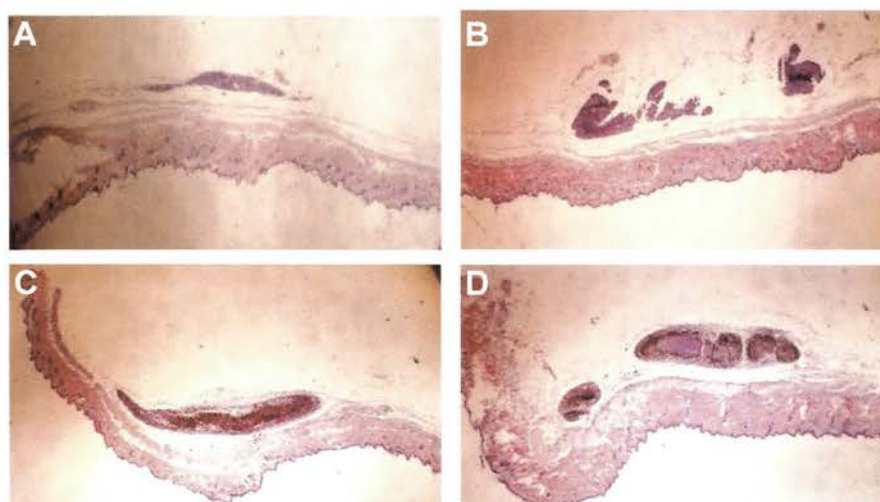
Legenda: O gráfico representa a média e o desvio padrão do número de células presentes nas lâminas histológicas confeccionadas a partir de amostras de pele ou tumor experimentalmente induzidos pela inoculação subcutânea das células de melanoma murino B16-F10 Nex2 na quantidade de 1×10^6 células em animais Tg2 e WTTg2. A contagem foi feita com a utilização do programa Image-Pro Plus versão 4.5.1. A análise estatística foi feita pelo teste de Mann-Whitney.

Figura 12 - Gráfico de número de células em tempos iniciais e tardios.



Legenda: O gráfico representa a média e o desvio padrão da porcentagem de infiltrados inflamatórios presentes nas lâminas histológicas confeccionadas a partir de amostras de pele ou tumor experimentalmente induzidos pela inoculação subcutânea das células de melanoma murino B16-F10 Nex2 na quantidade de 1×10^6 células em animais Tg2 e WTTg2. A contagem foi feita com a utilização de uma lente com graticulo, contando-se até 10 campos de cada lâmina. A análise estatística foi feita pelo teste de Mann-Whitney.

Figura 13 - Gráfico de infiltrados inflamatórios em tempos iniciais e tardios.



Legenda: As fotos representam lâminas confeccionadas a partir de amostras de pele ou tumor experimentalmente induzidos pela inoculação subcutânea das células de melanoma murino B16-F10 Nex2 na quantidade de 1×10^6 células em animais Tg2 (A e C) e WTTg2 (B e D), em tempo inicial de 24 horas (A e B) e tardio de 10 dias (C e D). Verificamos a área total de tumor presente em cada lâmina.

Figura 14 - Lâminas de H.E. de amostras de tumor em tempo inicial e tardio.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Para o desenvolvimento do presente trabalho utilizamos duas linhagens de melanoma murino, B16-F1 e B16-F10. Por não apresentarem diferenças no que diz respeito ao desenvolvimento tumoral, em nenhuma das linhagens de camundongos, escolhemos continuar apenas com a linhagem B16-F10. A partir disso, realizamos experimentos com intuito de padronizar a quantidade ideal de células a ser utilizada para os experimentos de crescimento tumoral. Estipulamos um critério de escolha (como relatado anteriormente no item 4.3), segundo o qual, a quantidade de células seria de 1×10^6 para a linhagem B16-F10 nos camundongos do tipo selvagem. Contudo, ao realizarmos a inoculação da referida quantidade de células nos animais WTTg2, os resultados revelaram que esses camundongos eram resistentes ao desenvolvimento dos tumores decorrentes da inoculação das linhagens celulares de melanoma usadas. Uma vez que, tanto as células B16-F1 como a B16-F10, são linhagens de melanoma murino originadas espontâneamente em camundongos C57BL/6J (*inbred*), elas não são singenéticas à linhagem CD1 (*outbred*, originados a partir de camundongos *Swiss*), demonstrando assim, incapacidade de originarem tumores que progridam nesta outra linhagem de camundongos. Camundongos utilizados como modelo tumoral, podem apresentar regressões espontâneas ou falha na progressão do tumor, sugerindo uma incompatibilidade tumor-hospedeiro, que acaba dificultando o uso de camundongos dessa linhagem como modelo tumoral (CORBETT et al. 2002). É sabido que a incompatibilidade tecido-hospedeiro pode ser explicada pela diferença alélica de MHC entre raças diferentes de camundongos

(ABBAS et al. 2003). Os camundongos C57BL/6J apresentam MHC H-2b, e os CD1 possuem MHC diferente, já que são originados dos camundongos *Swiss* e, estes possuem MHC H-2k, o que pode ter contribuído para que ocorra uma incompatibilidade tumor-hospedeiro. Prévios estudos realizados em nosso laboratório revelaram que uma outra linhagem de melanoma murino denominada pelo laboratório como B16-F10 Nex2 se mostrava capaz de induzir tumor nesse grupo de animais (background CD1). Linhagens celulares que são mantidas em cultura por longo período, submetidas a muitas passagens, podem apresentar perda ou ganho da expressão de algumas moléculas (LANGDON 2004), tornando-as mais ou menos agressivas quando utilizadas em experimentos *in vivo*. Por esses motivos essa sub-linhagem, Nex2, pode conseguir driblar a incompatibilidade tumor-hospedeiro, desenvolvendo-se em camundongos CD1. Resolvemos, então, utilizar essa linhagem em nosso projeto, solucionando assim a problemática de implantação de tumores nos camundongos do grupo dos transgênicos.

Estipuladas as linhagens celulares ideais para cada grupo, B16-F10 para os camundongos do grupo dos nocautes e B16-F10 Nex2 para os camundongos do grupo dos transgênicos, ambos na concentração de 1×10^6 por animal inoculados no tecido subcutâneo, demos seguimento aos experimentos.

Os resultados obtidos na comparação do crescimento tumoral dos animais Tg2 em comparação com seus respectivos selvagens (WTTg), demonstraram que na quantidade de células estipuladas, 1×10^6 , não observamos diferenças estatisticamente significativas no crescimento dos tumores.

Diante desses resultados, decidimos observar se ao diminuir a quantidade de células inoculadas nesses mesmos grupos de animais, essa diferença estatística de

crescimento tumoral entre os grupos poderia ser observada. Testamos, então, a quantidade de 5×10^5 células, cuja diferença estatística entre os grupos demonstrou significância no experimento de dias pontuais. No dia 22º os animais WTTg2 apresentaram uma média de área tumoral de $0,24 \text{ cm}^2$ enquanto os Tg2 apresentaram uma média de aproximadamente $0,03 \text{ cm}^2$ ($p = 0,007$), no dia 25º os animais WTTg2 apresentaram uma média de área tumoral de $0,60 \text{ cm}^2$ enquanto os Tg2 apresentaram uma média de aproximadamente $0,07 \text{ cm}^2$ ($p = 0,02$), no dia 29º os animais WTTg2 apresentaram uma média de área tumoral de $1,25 \text{ cm}^2$ enquanto os Tg2 apresentaram uma média de aproximadamente $0,10 \text{ cm}^2$ ($p = 0,019$) e no dia 31º os animais WTTg2 apresentaram uma média de área tumoral de $2,0 \text{ cm}^2$ enquanto os Tg2 apresentaram uma média de aproximadamente $0,20 \text{ cm}^2$ ($p = 0,011$). No dia 18 nenhum dos animais apresentavam tumor. Além disso, os animais WTTg apresentou um maior “Take Rate”, ou seja, maior número de animais que apresentaram tumor (59%), contra aproximadamente 20% dos animais transgênicos (Tg2 e Tg4) com tumor ($p = 0,017$). Analisando os resultados do experimento de dias pontuais em conjunto, podemos sugerir que os animais que possuem uma super-expressão de PTX3, apresentam não só um crescimento tumoral mais retardado, mas também uma maior dificuldade de implantação desse tumor.

Para o entendimento dos possíveis mecanismos envolvidos na implantação, crescimento e progressão tumoral realizamos a análise histológica dos tumores provenientes de inoculação de 1×10^6 células B16-F10 nos animais WTTg e Tg2. Ao analisarmos as lâminas quanto a **área tumoral**, não verificamos existência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos em nenhum dos tempo analisados (24 e 48 horas, e 10 dias), sendo que em 10 dias os animais Tg2

apresentaram uma área tumoral um pouco maior em relação aos seus controles. A inexistência de diferença entre os grupos pode ser explicada pelo fato dos tempos analisados serem muito precoces, afinal só conseguimos ver tumor mensurável a partir do 4º dia após inoculação de 1×10^6 células e só detectamos diferença estatística significativa a partir do 22º dia após inoculação de 5×10^5 células. Com relação ao **infiltrado de células inflamatórias** na massa tumoral evidencia-se diferença significativa apenas no tempo de 48 horas, com menor quantidade de células nos animais Tg2 do que nos WTTg ($p = 0,015$). Porém, os resultados obtidos nos outros tempos sugerem que enquanto nos animais WTTg o perfil de células infiltrantes diminui com o tempo, no grupo Tg2 ocorre o inverso, ou seja, o aumento do infiltrado inflamatório durante os mesmos períodos observados. Tumores sólidos freqüentemente apresentam células inflamatórias infiltrantes (MANTOVANI et al. 1992). Desta maneira, níveis elevados de leucócitos infiltrantes dentro de tumores primários são sinais de bom prognóstico (MASSI et al. 1999). Em contrapartida, a presença dessas células têm sido correlacionado com a produção de citocinas e fatores de crescimento, que podem promover um favorável microambiente para a progressão neoplásica (ROLLINS 1997; NAGTEGAAL et al. 2001; LIN et al. 2001; POLLARD 2004). É consenso na literatura que o processo inflamatório crônico propicia o desenvolvimento de tumores, pois em meados do século XIX, Rudolf Virchow pela primeira vez hipotetizou que a origem de neoplasias ocorreria em sítios de inflamação crônica, baseado na observação que alguns agentes irritantes, juntamente com injúria tecidual e conseqüente inflamação, aumentava a proliferação celular (COUSSENS e WERB 2002). Além disso, alguns estudos mostram que um processo inflamatório agudo pode favorecer a progressão tumoral de melanoma, a

partir de uma injeção de um elevado número de células apoptóticas em conjunto com uma pequena quantidade de células tumorais (CORREA et al. 2005). Isso corrobora os resultados encontrados, pois a porcentagem de células infiltrantes nos camundongos WTTgs é mais intenso nas primeiras horas, revelando um processo de inflamação aguda que diminui com o tempo. A presença de células do sistema imune, principalmente fagócitos como neutrófilos, macrófagos e em alguns casos eosinófilos, suporta a observação da inflamação. Neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o sítio de inflamação aguda, atuando na fagocitose de células mortas ou agentes infecciosos presentes na região (COUSSENS e WERB 2002). Além disso, secretam moléculas que favorecem o aumento e/ou a manutenção do processo inflamatório. No processo de iniciação e promoção da carcinogênese, o papel dessas células continua incerto, embora elas estejam presentes em pequeno número em alguns tumores, podendo tanto favorecer a resposta do hospedeiro ao tumor, como favorecer o crescimento e a progressão tumoral, por exemplo, produzindo uma fonte abundante de fatores angiogênicos, como IL-8, VEGF e metaloproteínases (CORREA et al. 2005). Monócitos, que se diferenciam em macrófagos dentro dos tecidos, são as próximas células a migrar para o sítio de injúria, guiados por moléculas quimioatraentes, fagocitando células mortas, agentes infecciosos e quando ativados, produzem são a principal fonte de citocinas e fatores de crescimento (COUSSENS e WERB 2002). A presença de macrófagos associados ao tumor (TAMs) está relacionada com um duplo papel na progressão tumoral, pois pode atuar eliminando células neoplásicas, quando ativadas por interferon e IL-12, podem também produzir potentes fatores angiogênicos, citocinas e proteases que favorecem a progressão do tumor (COUSSENS e WERB 2002) mas o aumento do número

dessas células está também relacionado com um pior prognóstico em alguns tumores (SICA et al. 2006). A ativação dessas células para esse perfil acontece pela fagocitose de células em apoptose e pela presença certas de moléculas, como por exemplo TGF β . Dentre os fatores de crescimento produzidos pelos TAMs temos o FGFs e EGF que promovem o aumento do número de células, a angiogênese, a capacidade invasiva e metastática das células tumorais. Além disso, é evidenciado um acúmulo dessas células em áreas de hipóxia e produção de diversas moléculas promovendo a angiogênese (LEWIS e MURDOCK 2005). Diante desses aspectos, a menor concentração do infiltrado inflamatório nos animais Tg2 nas primeiras horas após a inoculação pode, diferentemente dos animais do tipo selvagem, não proporcionar a produção de moléculas e a “limpeza” desse microambiente, dificultando a progressão tumoral. De acordo com Dias 2001, no plasma dos animais Tg2 (7.16 ng/ml) existe um nível basal maior da citocina imunoregutadora IL-10 em comparação com os seus controles (0.18 ng/ml). IL-10 é uma importante citocina imunoregulatória produzida por diversos tipos celulares. Sua principal função biológica é limitar e ajudar na resolução do processo inflamatório e também da regulação da diferenciação e diferenciação de várias células do sistema imune (ASADULLAH et al. 2003). Essa citocina atua de forma indireta no sistema imune, inibindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8 GM-CSF e TNF) pelas células T helper, monócitos/macrófagos e células polimorfonucleadas (ZHENG et al. 1996). A inibição da secreção de IL-8 resulta na diminuição da quimioatração de leucócitos para o ambiente tumoral onde existe um processo inflamatório. Além disso, a produção de PTX3 nos animais Tg2 fica prejudicada pelo fato dessa citocina inibir a secreção de IL-10 e TNF, que são responsáveis pelo estímulo que leva a

produção de PTX3. Os resultados mostram que durante os tempos analisados, o crescente aumento do infiltrado inflamatório no ambiente tumoral pode estar relacionado a uma possível mudança no perfil de citocinas, com o aumento de citocinas pró-inflamatórias, favorecendo uma maior quimioatração bem como a produção de PTX3.

Na análise das curvas de crescimento tumoral para o grupo de camundongos deficientes para o gene PTX3 e seus respectivos controles, observamos não haver diferença estatística quanto ao crescimento tumoral. Isso pode ser explicado pelo fato de que 1×10^6 é uma grande quantidade de células inoculadas, dificultando a obtenção de uma possível diferença entre esses grupos. Diante disso, utilizou-se uma nova concentração de células, 1×10^5 , na tentativa de encontrar diferença no crescimento tumoral entre os grupos de animais. Porém, mesmo com essa nova estratégia, os resultados demonstraram que independentemente da quantidade de células utilizada, não foi observada diferença no crescimento tumoral entre esses animais, sugerindo que a expressão basal ou a falta de expressão da proteína PTX3 não causa impacto biológico significativo que influencie o crescimento tumoral do melanoma. A análise histológica da quantidade de células infiltrantes na massa tumoral nos tempos de 24, 48, 72 horas e 10 dias, bem como a quantidade de vasos encontrados (dado não apresentado), na mesma região e nos mesmos tempos, mostra que não ocorre diferença entre os grupos, fato que corrobora com os resultados de crescimento tumoral.

A expressão de PTX3 está relacionada ao desenvolvimento de um processo inflamatório, pois o aumento dessa molécula evidencia o aumento da inflamação. Ela é produzida localmente em sítios inflamatórios sob o controle de sinais pró-

inflamatórios. As principais células produtoras dessa proteína são as células endoteliais ou fibroblastos, e células de linhagens monocíticas (ALLES et al. 1994; GOODMAN et al. 1996). Outro aspecto relatado à uma possível função do PTX3 é sua ligação a células em apoptose, favorecendo o reconhecimento e a eliminação dessas células mortas pelos fagócitos (ROVERE et al. 2000). Um processo intenso de inflamação pode promover a indução de apoptose em uma grande quantidade de células, pois estipula-se que a apoptose não gera inflamação, em parte, devido à produção de citocinas supressoras, como por exemplo IL-10 e TGF- β , por células fagocíticas (OGASAWARA et al. 1993; HEASMAN et al. 2003). Contudo, células apoptóticas podem promover uma resposta inflamatória dependendo de como a apoptose foi iniciada, em quais tipos celulares está ocorrendo e da presença ou não de co-fatores (FREIRE-DE-LIMA et al. 2000; RESTIFO 2001; MISAWA et al. 2001; LORIMORE et al. 2001). A existência de um intenso processo de apoptose em um órgão fisiologicamente não preparado para esse evento, pode falhar na eliminação das células apoptóticas com conseqüente necrose, e início de uma resposta inflamatória (OGASAWARA et al. 1993; HEASMAN et al. 2003). De acordo com os resultados obtidos, nos animais WTTg2 a presença de necrose é maior do que nos animais transgênicos ($p=0,007$), especialmente em 48 horas. Esses dados sugerem que a expressão aumentada de PTX3 pode favorecer o reconhecimento e a eliminação de muitas células mortas, tanto tumorais como infiltrantes, pelo fato da PTX3 atuar como opsonina (DINIZ et al. 2004). Como discutido anteriormente, a menor porcentagem de infiltrado inflamatório e uma menor produção de PTX3 nos animais Tg2, pela ação da IL-10, nos tempos iniciais juntamente com a evolução

gradativa do processo inflamatório, sugere uma relação com os dados observados nas áreas de necrose no ambiente tumoral.

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos a partir de outros pré-existentes, tendo um papel importante em diversas condições fisiológicas e patológicas (incluindo o desenvolvimento embrionário, a cicatrização, a inflamação e o crescimento tumoral) (CARMELIET e JAIN 2000). Numerosos indutores angiogênicos foram identificados incluindo os membros da família do VEGF, angiopoetinas, TGF- α e TGF- β , PDGF, TNF, interleucinas, quimiocinas e membros da família do FGF (PRESTA et al. 2005). O FGF-2 é o mais importante fator de crescimento autócrino em melanoma (NORRBY 2000). Estudos mostram que a interação de PTX3 com FGF-2, em células endoteliais, inibe a proliferação celular, bem como a angiogênese em membrana cório alantóide embrionária (RUSNATI et al. 2004). Os resultados obtidos na contagem dos vasos, marcados com anti-CD34 (dados não apresentados) existentes no tumor, não apresentaram diferença estatisticamente significativa tanto entre o grupo dos animais Tg2 *versus* WTTg2, quanto no grupo dos animais KO *versus* WTKO. Apesar da elevada concentração sérica de PTX3 nos animais WTTg2 nas primeiras horas após a inoculação das células tumorais, o processo de angiogênese não foi alterado pela interação PTX3 / FGF-2, com desenvolvimento progressivo do tumor. Nos animais Tg2 o aumento progressivo de PTX3 sérico também não alterou o processo de angiogênese. A análise imunohistoquímica para FGF-2 não mostrou diferença na expressão desse fator de crescimento entre os grupos Tg2 *versus* WTTg2 em amostras de tumores coletados 10 dias após a inoculação das células tumorais. Uma possível explicação para a não diferença encontrada é que ao invés do PTX3 agir somente na inibição da

ação do FGF-2 sobre a célula tumoral, esta molécula estaria favorecendo o processo inflamatório e promovendo a eliminação das células em apoptose, como já discutido acima. Além disso, como mencionado acima, outras moléculas tem função angiogênicas e podem ter sido produzidas em substituição ao FGF-2.

Os resultados obtidos na contagem de células tumorais revelaram que em 24 horas a quantidade de células de melanoma era maior nos animais Tg2, especulando-se que esse fato é devido a existência de uma menor quantidade de células infiltrantes. Nos animais WTTg, onde a presença de células inflamatórias foi maior, notamos haver uma menor quantidade de células tumorais. Em 48 ($p= 0,007$) e 72 horas observa-se um aumento do número de células tumorais com diminuição do infiltrado inflamatório nos animais WTTg. Já nos animais Tg2 em 48 e 72 horas, graças ao aumento do infiltrado inflamatório no microambiente tumoral, o número de células tumorais diminui. Isso mostra que, possivelmente, exista uma correlação inversa entre a presença do infiltrado inflamatório e número de células tumorais nas áreas analisadas.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- As linhagens de melanoma B16F-10 Nex2 em camundongos transgênicos e seus respectivos controles, promoveram menor crescimento tumoral e uma maior dificuldade de implantação desse tumor nos camundongos transgênicos.
- Os resultados observados nos camundongos nocautes e seus respectivos controles, sugerem que a expressão basal ou a falta de PTX3 não causa impacto biológico significativo que influencie no crescimento de tumores de melanoma.
- Notamos uma menor concentração de células inflamatórias nos animais transgênicos em 24, 48 e 72 horas após a inoculação das células de melanoma, e maior concentração dessas células nos animais transgênicos.
- Os animais WTTg2 apresentaram maior área de necrose em comparação com os Tg2, especialmente em 48 horas, sugerindo que a expressão aumentada de PTX3 pode favorecer o reconhecimento e a eliminação de células em processo de morte, tanto as tumorais quanto as inflamatórias, devido essa proteína atuar como opsonina.
- Notamos um aumento do número de células tumorais em 48 e 72 horas nos animais WTTg2. Ao analisarmos esse dado em conjunto com a análise de infiltrado inflamatório, notamos a existência de uma correlação inversa entre a presença de células inflamatórias e o número de células tumorais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. **Cellular and molecular immunology**. 5th ed. Philadelphia: W B Saunders; 2003. Transplante of immunology; p.363-82.

Al-Alousi S, Barnhill R, Blessing K, Barksdale S. The prognostic significance of basic fibroblast growth factor in cutaneous malignant melanoma. **J Cutan Pathol** 1996; 23:506-10.

Alles VV, Bottazzi B, Peri G, Golay J, Introna M, Mantovani A. Inducible expression of ptx3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. **Blood** 1994; 84: 3483-93.

Altmeyer A, Klampfer L, Goodman AR, Vilcek J. Promoter structure and transcriptional activation of the murine TSG-14 gene encoding a tumor-necrosis-factor interleukin-1-inducible pentraxin protein. **J Biol Chem** 1995; 270:25584-90.

Andersen O, Vilsgaard Ravn K, Juul Sorensen I, Jonson G, Holm Nielsen E, Svehag SE. Serum amyloid P component binds to influenza A virus haemagglutinin and inhibits the virus infection in vitro. **Scand J Immunol** 1997; 46:331-7.

Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy-review of a new approach. **Pharmacol Rev** 2003; 55:241-69

Bairoch A. PROSITE: a dictionary of sites and patterns in proteins. **Nucl Acids Res** 1991; 19:2241-5

Basile A, Sica A, d'Aniello E, et al. Characterization of the promoter for the human long pentraxin PTX3 - Role of NF-kappa B in tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta regulation. **J Biol Chem** 1997; 272:8172-8.

Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. **Immunol Today** 1994; 15:74-80.

Bottazzi B, Vouret-Craviari V, Bastone A, et al. Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3 - Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. **J Biol Chem** 1997; 272:32817-23.

Breviario F, d'Aniello EM, Golay J, et al. Interleukin-1-inducible genes in endothelial-cells - cloning of a new gene related to c-reactive protein and serum amyloid-p component. **J Biol Chem** 1992; 267:22190-7

Butler PJ, Tennent GA, Pepys MB. Pentraxin-chromatin interactions: serum amyloid P component specifically displaces H1-type histones and solubilizes native long chromatin. **J Exp Med** 1990; 172:13-8

Camozzi M, Zacchigna S, Rusnati M, et al. Pentraxin 3 inhibits fibroblast growth factor 2-dependent activation of smooth muscle cells in vitro and neointima formation in vivo. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2005; 25:1837-42.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature** 2000; 407:249-57.

Chin L, Merlino G, DePinho RA. Malignant Melanoma, modern black plague and genetic black box. **Genes Dev** 1998; 12:3467-81.

Corbett TH, Polin L, Roberts BJ, et al. **Tumor models in cancer research**. New Jersey: Humana Press; 2002. Transplantable syngeneic rodent tumors; p.44.

Correa M, Machado J Jr, Carneiro CR, et al. Transient inflammatory response induced by apoptotic cells is an important mediator of melanoma cell engraftment and growth. **Int J Cancer** 2005; 114:356-63.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. **Nature** 2002; 420:860-7.

De Cristan G, Morbidelli L, Alessandri G, Ziche M, Cappa AP, Gullino PM. Synergism between gangliosides and basic fibroblastic growth factor in favouring survival. Growth, and motility of capillary endothelium. **J Cell Physiol** 1990; 144:505-10.

Dias AA, Goodman AR, Dos Santos JL, et al. TSG-14 transgenic mice have improved survival to endotoxemia and to CLP-induced sepsis. **J Leukoc Biol** 2001; 69:928-36

Diniz SN, Nomizo R, Cisalpino OS, et al. PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. **J Leukoc Biol** 2004; 75:649-56.

Emsley J, White HE, O'Hara BP, et al. Structure of pentameric human serum amyloid-p component. **Nature** 1994; 367:338-45.

Fazzini F, Peri G, Doni A, et al. PTX3 in small-vessel vasculitides: an independent indicator of disease activity produced at sites of inflammation. **Arthritis Rheum** 2001; 44:2841-50.

Fidler I. Selection of successive tumour lines for metastasis. **Natl New Biol** 1973; 242:148-9.

Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MB, et al. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature** 2000; 403:199-203.

Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, et al. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. **Nature** 2002; 420:182-6.

Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. **Annu Rev Immunol** 2005; 23:337-66.

Goodman AR, Cardozo T, Abagyan R, Altmeyer A, Wisniewski HG, Vilcek J. Long pentraxins: an emerging group of proteins with diverse functions. **Cytokine Growth Factor Rev** 1996; 7:191-202

Goodman AR, Levy DE, Reis, LFL, Vilcek J. Differential regulation of TSG-14 expression in murine fibroblasts and peritoneal macrophages. **J Leukoc Biol** 2000; 67:387-95.

Halaban R, Kwon BS, Ghosh S, Delli Bovi P, Baird A. bFGF as an autocrine growth factor for human melanomas. **Oncogene Res** 1988; 3:177-86.

Han B, Mura M, Andrade CF, et al. TNFalpha-induced long pentraxin PTX3 expression in human lung epithelial cells via JNK. **J Immunol** 2005; 175:8303-11.

Heasman SJ, Giles KM, Ward C, Rossi AG, Haslett C, Dransfield I. Glucocorticoid-mediated regulation of granulocyte apoptosis and macrophage phagocytosis of apoptotic cells: implications for the resolution of inflammation. **J Endocrinol** 2003; 178:29-36.

Henderson RA, Ross RK, Pike MC. Toward the primary prevention of cancer. **Science** 1991; 254: 1131-8.

Hind CR, Collins PM, Baltz ML, Pepys MB. Human serum amyloid P component, a circulating lectin with specificity for the cyclic 4,6-pyruvate acetal of galactose. Interactions with various bacteria. **Biochem J** 1985; 225:107-11.

Hsu YC, Perin MS. Human neuronal pentraxin II (NPTX2): conservation, genomic structure, and chromosomal localization. **Genomics** 1995; 28:220-7.

Introna M, Alles VV, Castellano M, et al. Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. **Blood** 1996; 87:1862-72.

Klouché M, Peri G, Knabbe C, et al. Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells. **Atherosclerosis** 2004; 175:221-8.

Langdon PS. **Cancer cell culture: methods and protocols**. Edinburgh: Humana Press; 2004. Basic principles of cancer cell culture; p.3-16.

Latini R, Maggioni AP, Peri G, et al. Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. **Circulation** 2004; 110:2349-54.

Lazar-Molnar E, Hegyesi H, Toth, S, Falus A. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. **Cytokine** 2000; 12:547-54.

Lee TH, Lee GW, Ziff EB, Vilcek J. Isolation and characterization of 8 tumor necrosis factor-induced gene-sequences from human fibroblasts. **Mol Cell Biol** 1990; 10:1982-8.

Lee GW, Lee TH, Vilcek J. TSG-14, a tumor necrosis factor- and IL-1-inducible protein, is a novel member of the pentraxin family of acute phase proteins. **J Immunol** 1993; 150:1804-12.

Lee GW, Goodman AR, Lee TH, Vilcek J. Relationship of Tsg-14 protein to the pentraxin family of major acute-phase proteins. **J Immunol** 1994; 153:3700-7.

Lewis C, Murdoch C. Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies. **Am J Pathol** 2005; 167:627-35.

Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. **J Exp Med** 2001; 193:727-40.

Lorimore SA, Coates PJ, Scobie GE, Milne G, Wright EG. Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects? **Oncogene** 2001; 20:7085-95.

Loveless RW, Floyd-O'Sullivan G, Raynes JG, Yuen CT, Feizi T. Human serum amyloid P is a multispecific adhesive protein whose ligands include 6-phosphorylated mannose and the 3-sulphated saccharides galactose, N-acetylgalactosamine and glucuronic acid. **EMBO J** 1992; 11:813-9.

Luchetti MM, Piccinini G, Mantovani A, et al. Expression and production of the long pentraxin PTX3 in rheumatoid arthritis (RA). **Clin Exp Immunol** 2000; 119:196-202.

Mairuhu AT, Peri G, Setiati TE, et al. Elevated plasma levels of the long pentraxin, pentraxin 3, in severe dengue virus infections. **J Med Virol** 2005; 76:547-52.

Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. **Immunol Today** 1992; 13:265-70.

Mantovani A, Garlanda C, Bottazzi B. Pentraxin 3, a non-redundant soluble pattern recognition receptor involved in innate immunity. **Vaccine** 2003; 21 Suppl 2:S43-7

Massi D, Franchi A, Borgognoni L, Reali UM, Santucci M. Thin cutaneous malignant melanomas (< or =1.5 mm): identification of risk factors indicative of progression. **Cancer** 1999; 85:1067-76.

Meier F, Caroli U, Satyamoorthy K, et al. Fibroblast growth factor-2 but not Mel-CAM and/or beta3 integrin promotes progression of melanocytes to melanoma. **Exp Dermatol** 2003; 12:296-306.

Misawa R, Kawagishi C, Watanabe N, Kobayashi Y. Infiltration of neutrophils following injection of apoptotic cells into the peritoneal cavity. **Apoptosis** 2001; 6:411-7.

Muller B, Peri G, Doni A, et al. Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients. **Crit Care Med** 2001; 29:1404-7.

Nagtegaal ID, Marijnen CA, Kranenbarg EK, et al. Local and distant recurrences in rectal cancer patients are predicted by the nonspecific immune response; specific immune response has only a systemic effect--a histopathological and immunohistochemical study. **BMC Cancer** 2001; 1:7.

Nauta AJ, Bottazzi B, Mantovani A, et al. Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. **Eur J Immunol** 2003; 33:465-73.

Nauta AJ, de Haij S, Bottazzi B, et al. Human renal epithelial cells produce the long pentraxin PTX3. **Kidney Int** 2005; 67:543-5.

Nesbit M, Nesbit HK, Bennett J, et al. Basic fibroblast growth factor induces a transformed phenotype in normal human melanocytes. **Oncogene** 1999; 18:6469-76.

Noland TD, Friday BB, Maulit MT, Gerton GL. The sperm acrosomal matrix contains a novel member of the pentaxin family of calcium-dependent binding proteins. **J Biol Chem** 1994; 269:32607-14

Norrby K. Constitutively synthesized nitric oxide is a physiological negative regulator of mammalian angiogenesis mediated by basic fibroblast growth factor. **Int J Exp Pathol** 2000; 81:423-7.

Noursadeghi M, Bickerstaff MC, Gallimore JR, Herbert J, Cohen J, Pepys MB. Role of serum amyloid P component in bacterial infection: protection of the host or protection of the pathogen. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2000; 97:14584-9

Nugent MA, Iozzo RV. Fibroblast growth factor-2. **Int J Biochem Cell Biol** 2000; 32:115-20.

Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. **Nature** 1993; 364:806-9.

Pepys MB. C-reactive protein: the role of an ancient protein in modern rheumatology. **Clin Exp Rheumatol** 1983; 1:3-7.

Pepys MB, Butler PJ. Serum amyloid P component is the major calcium-dependent specific DNA binding protein of the serum. **Biochem Biophys Res Commun** 1987; 148:308-13

Peri G, Introna M, Corradi D, et al. PTX3, a prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. **Circulation** 2000; 102:636-41.

Perrier P, Martinez FO, Locati M, et al. Distinct transcriptional programs activated by interleukin-10 with or without lipopolysaccharide in dendritic cells: induction of the B cell-activating chemokine, CXC chemokine ligand 13. **J Immunol** 2004; 172:7031-42.

Polentarutti N, Picardi G, Basile A, et al. Interferon-gamma inhibits expression of the long pentraxin PTX3 in human monocytes. **Eur J Immunol** 1998; 28:496-501

Polentarutti N, Bottazzi B, Di Santo E, et al. Inducible expression of the long pentraxin PTX3 in the central nervous system. **J Neuroimmunol** 2000; 106:87-94.

Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:71-8.

Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. **Cytokine Growth Factor Rev** 2005; 16:159-78.

Reid MS, Blobel CP. Apexin, an acrosomal pentaxin. **J Biol Chem** 1994; 269:32615-20.

Restifo NP. Building better vaccines: how apoptotic cell death can induce inflammation and activate innate and adaptive immunity. **Curr Opin Immunol** 2000; 12:597-603.

Robey FA, Jones KD, Tanaka T, Liu TY. Binding of C-reactive protein to chromatin and nucleosome core particles: a possible physiological role of C-reactive protein. **J Biol Chem** 1984; 259:7311-6.

Rollins BJ. Chemokines. **Blood** 1997; 90:909-28.

Rovere P, Peri G, Fazzini F, et al. The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells. **Blood** 2000; 96:4300-6.

Rubio N, Shapard PM, Ritz M, Zahedi K, Whitehead AS. Structure, expression, and evolution of guinea pig serum amyloid P component and C-reactive protein. **J Biochem** 1993; 844:113-277.

Rusnati M, Camozzi M, Moroni E, et al. Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. **Blood** 2004; 104:92-9.

Salustri A, Garlanda C, Hirsch E, et al. PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. **Development** 2004; 131:1577-86.

Schlimgen AK, Helms JA, Vogel H, Perin MS. Neuronal pentraxin, a secreted protein with homology to acute phase proteins of the immune system. **Neuron**. 1995; 14:519-26.

Schwalbe RA, Dahlback B, Coe JE, Nelsestuen GL. Pentraxin family of proteins interact specifically with phosphorylcholine and/or phosphorylethanolamine. **Biochemistry** 1992; 31:4907-15.

Seery LT, Schoenberg DR, Barbaux S, Sharp PM, Whitehead AS. Identification of a novel member of the pentraxin family in *Xenopus laevis*. **Proc Biol Sci** 1993; 253:263-70.

Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. **Eur J Cancer** 2006; 42:717-27.

Souza DG, Soares AC, Pinho V, et al. Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. **Am J Pathol** 2002; 160:1755-65.

Tsui CC, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Barnes C, Worley PF. Narp, a novel member of the pentraxin family, promotes neurite outgrowth and is dynamically regulated by neuronal activity. **J Neurosci** 1996; 16:2463-78.

Varani S, Elvin JA, Yan C, et al. Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility. **Mol Endocrinol** 2002; 16:1154-67.

Vouret-Craviari V, Matteucci C, Peri G, Poli G, Introna M, Mantovani A. Expression of a long pentraxin, PTX3, by monocytes exposed to the mycobacterial cell wall component lipoarabinomannan. **Infect Immun** 1997a; 65:1345-50.

Vouret-Craviari V, Cenzuales S, Poli G, Mantovani A. Expression of monocyte chemotactic protein-3 in human monocytes exposed to the mycobacterial cell wall component lipoarabinomannan. **Cytokine** 1997b; 9:992-8.

Xu D, Hopf C, Reddy R, et al. Narp and NP1 form heterocomplexes that function in developmental and activity-dependent synaptic plasticity. **Neuron** 2003; 39:513-28.

Wang Y, Becker D. Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth. **Nat Med** 1997; 3:887-93.

Yayon A, Ma YS, Safran M, Klagsbrun M, Halaban R. Suppression of autocrine cell proliferation and tumorigenesis of human melanoma cells and fibroblast growth factor transformed fibroblasts by a kinase-deficient FGF receptor 1: evidence for the involvement of Src-family kinases. **Oncogene** 1997; 14:2999-3009.

Zheng LM, Ojcius DM, Garaud F, et al. Interleukin-10 inhibits tumor metastasis through an NK cell-dependent mechanism. **J Exp Med** 1996; 184:579-84.