

# **ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE LESÕES MELANOCÍTICAS**

**NAIR HIDEKO MUTO**

**Tese de Doutorado apresentada à Fundação  
Antônio Prudente para a obtenção do Grau de  
Doutor em Ciências**

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas**

**Co-orientador: Dr. Luiz Fernando Lima Reis**

**São Paulo**

**2007**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Muto, Nair Hideko

**Análise do perfil de expressão gênica de lesões melanocíticas /**

Nair Hideko Muto -- São Paulo, 2007.

162p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Roger Chammas

Descritores: 1. MELANOMA MALÍGNO/genética. 2. NEVO  
MELANOCÍTICO. 3. EXPRESSÃO GÊNICA. 4. DNA MICROARRAY.

## DEDICATÓRIA

*À Deus e à minha família, por tornarem minhas conquistas possíveis;*

*À tia Kazuko e ao meu primo Haruo (ambos in memoriam)*

*pelo carinho, alegria e apoio.*

## AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos lembrando que este projeto multidisciplinar foi possível graças à colaboração de todos os profissionais e técnicos envolvidos, além obviamente dos pacientes que concordaram em ceder sua lesão, matéria-prima fundamental para nossa pesquisa. Aqui se incluem os amigos que gentilmente se prontificaram a doar seus nevos, Letícia, Newton, Dra Vilma e Maria Cristina. Gostaria de expressar minha gratidão a todos que foram tão importantes durante a execução deste trabalho, e me desculpar caso tenha me esquecido de alguém.

Ao Dr Luiz Fernando Lima Reis, pela oportunidade, orientação, confiança, incentivo e amizade... pelo apoio nos meus momentos de fraqueza... Por chefiar o Laboratório de Genômica Funcional (LABRI) do Instituto Ludwig com competência, fazendo ciência de qualidade. Por ser um exemplo de pesquisador e pessoa.

Ao Dr Roger Chammas, pela oportunidade, pelos valiosos ensinamentos, discussões e excelentes aulas que ministra.

Ao Dr Alex Fiorini de Carvalho, pela colaboração essencial neste trabalho... Pelas sugestões, ensinamentos, amizade, paciência... Pela forma generosa que faz pesquisa.

A todos os membros (antigos e atuais) do LABRI e do LEA: Adriana, Alex, Aline, Ana Helena, Anna Coló, Andréa, Barbara, Bia, Bianca, Chamberlein, Eduardo Abrantes, Emerson, Gisele, Graziela, Isabela, Juliana, Kátia, Lara, Letícia, Luciana, Mariana Santos, Mariana Morato, Ozires, Patrícia, Regina, Sarah, Susana, Tatiana, Vivian, Vladmir e Waleska, pela amizade, companheirismo e pelo excelente convívio. Por serem uma EQUIPE, e por tornarem o meu dia-dia harmonioso e divertido...

À Adriana Abalen, pela amizade e carinho... pela ajuda e preocupação.

À Aline Pacífico, pela alegria, entusiasmo, competência, carinho (de amiga e de mãe!!) Pelos INFINITOS favores prestados...

Ao Rafael Pacífico Rodrigues, pela contribuição nesse trabalho.

À Graziela, pela disponibilidade e boa vontade em ajudar em todas as etapas do Southern blot.

À Mariana Morato e Jú pela agradável companhia, especialmente nas interações experimentais sempre tão bem sucedidas.

À Mariana Santos, Chamberlein e Dr Alex, pelo biochip de qualidade que produzem, e por todos os favores do dia-a-dia.

À Sarah, pelo carinho que me recebeu no Labri, e por me ensinar a amplificar RNA.

À Vivian, pela amizade e confiança...

À Waleska, pelo carinho, cumplicidade e colaboração neste projeto... Por tudo que aprendemos juntas, pela empolgação, discussões, idas ao IME, enfim pela parceria indispensável.

À Ana, Andréa, Bá, Bianca, Coló, Lara, Lele, Paty e Taty pela amizade, e por todos os nossos eventos sociais, culturais e gastronômicos (incluindo nossos almoços na antiga copa)... momentos impagáveis!!!

À Ana Helena, pelos almoços e jantares comunitários, viagens, idas ao centro cultural e demais programas-bolsista... por todas as conversas, desabafos, amizades adquiridas (Gus, Du, Dê) e por tornar qualquer evento uma diversão!!

À Barbara, pela amizade de tantos anos... Pelo incentivo durante e pós-mestrado que foi fundamental para definir minha vinda ao Instituto Ludwig... pela confiança, conversas, por tudo que compartilhamos durante o período em que moramos juntas...

À Letícia, pela amizade e alto astral que trouxe ao lab.. Pela generosidade e disponibilidade em ajudar a todos em qualquer momento.. por se fazer presente em momentos importantes dentro e fora do laboratório.

À Regininha, pelo apoio e amizade incondicional, por todas as sugestões, por me ensinar tantas coisas...

Aos amigos do LGEA: Aderbal, Elen, Louise, Maria Cristina, Nádia, Reimar e Thiago, pelos inúmeros momentos de descontração, dentro e fora

do Instituto. À Jane, pela alegria contagiante, pelo companherismo nas viagens, idas ao parque e por todos os sushis que fizemos.

À Evânia, pela amizade, generosidade e paciência em ensinar tudo sobre cultura de células...

A todos do Laboratório de Virologia, em especial ao Dr Enrique Boccardo, pela colaboração no isolamento dos queratinócitos e nos RAFTs... pelas brincadeiras no corredor (aqui se excluem os momentos que me deixou de “castigo” em cima do freezer). E à Ana Paula Lepique por me salvar nesses momentos.

À Miyuki, Carlinhos e Severino pela confecção das lâminas HE das lesões, e das lâminas para imuno-histoquímica.

À Suely Nonogaki, pela paciência, competência e cuidado nas reações de imuno-histoquímica. Pelas sugestões, envolvimento, e por ceder generosamente o protocolo do Naftol.

Ao Departamento de Oncologia Cutânea do Hospital AC Camargo, em nome do Dr Rogério Izar Neves, pela colaboração que viabilizou o desenvolvimento deste projeto. À todos do centro cirúrgico ambulatorial, pela coleta das amostras.

Ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo, em especial ao Dr Giles Landman, pelas semi-microdissecções das amostras, disponibilidade e carinho. À Dra Renata Coudry pela dissecção a laser, e ao Ivan, pela disponibilidade e eficiência nas imunoss.

Ao Laboratório de Bio-informática do Hospital do Câncer AC Camargo, coordenado pela Dra Helena Brentani, pelas análises computacionais, principalmente Luiz Paulo e Diogo.

Aos membros do IME, na pessoa do Dr Eduardo Jordão Neves. Em especial ao Gustavo e Lucas, pelo esforço e comprometimento com o trabalho, por entenderem tão bem a biologia (mesmo sendo matemáticos), e por “abraçarem” a causa comigo...

Ao Dr José A Morgado Dias por gentilmente ceder os anticorpos de Claudinas.

À todos os pesquisadores (em especial Dra Vilma) e alunos do Instituto Ludwig, pelas sugestões e conversas de corredor. Aos funcionários, que dão o suporte necessário e eficiente para a execução dos trabalhos.

À equipe de Informática do Instituto Ludwig, em especial ao Marcelo por resolver meus desentendimentos com o computador.

Aos membros da banca de qualificação: Dra Anamaria Camargo, Dr André Vettore e Dra Mariângela Marques, pelo acompanhamento durante todo o desenvolvimento deste trabalho e pelas valiosas sugestões.

A todos os professores da Pós Graduação, por tudo que ensinaram.

À Pós-Graduação da Fundação Antonio Prudente, por todo auxílio prestado, especialmente Ana Maria e Luciana.

Às funcionárias da Biblioteca da Fundação Antonio Prudente, sempre solícitas... em especial à Suely, pelo auxílio na formatação da tese.

À direção do Instituto Ludwig (Dra Luisa Villa) e do Hospital AC Camargo (Dr Ricardo Brentani) pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao CNPq e CEPID/FAPESP, pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador do mestrado, Dr Luiz Roberto Nunes e ao Dr Marco A Krieger, por tudo que me ensinaram... por terem me ajudado a dar o primeiro passo na pesquisa...

À Eliane e Valentina (companheiras das aulas de Bio Mol), pela amizade, interação e pelo suprimento contínuo de balinhas durante as aulas.

Ao "time": Anderson (chupa-cabras), Fábio (Japão), Henrique (Ravi) e Lelê, pelas idas ao Morumbi, pelos lanches de pernil pós-jogo, pelos eventos no IPT, pelas jurupingas e cervejas compartilhadas... e aos igualmente tricolores Barbara, Coló, Fe, Vitor e Ricardo.

Aos meus grandes amigos da faculdade e mestrado: Priscila, Néreston, Giane, Paulo e Clau Madella... que mesmo longe me apóiam... pessoas mais que especiais, amigos para vida inteira...

À família Kuroki: Nando, Bia, Vitor, mammys, pappys e Dí.. pela companhia, amor e conforto em tantos momentos... por tudo que representam... por serem parte integrante e indispensável na minha vida.

Ao Sérgio, por tudo que faz pela minha irmã e por toda família.. por todas as caronas e todos os favores... por estar sempre disponível.. desculpe se às vezes abuso...

Aos familiares, que me deram suporte durante todo o desenvolvimento deste trabalho, pela preocupação, envolvimento e palavras de conforto... em especial ao tio Michiyuki, tia Wakako, tio Tsutomu, tio Paulo, tia Kana, tia To, Hugo.

Ao ditian e batian, por tudo... especialmente por me ensinarem a importância do “por favor”, “obrigada” e “desculpe”...

Aos meus pais, Shiger e Elena, pela educação, valores e princípios.. pelo esforço, dedicação e trabalho que propiciaram os nossos estudos... à minha mãe, pela paciência e amor incondicional... por tudo que fez e faz por mim e minhas irmãs.

Às minhas irmãs, Olga e Nancy, por cuidarem de mim e estarem ao meu lado sempre, mesmo quando algo foge do controle e erroneamente desconto meu stress em casa, nas pessoas mais importantes. Me desculpem, e obrigada por tudo. Não sei o que seria de mim sem vocês!!!

## RESUMO

Muto NH. **Análise do perfil de expressão gênica de lesões melanocíticas**. São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

O melanoma cutâneo surge da transformação maligna dos melanócitos. Embora esse tumor seja curável por cirurgia quando o diagnóstico é precoce, o prognóstico de melanoma avançado é baixo em função do alto potencial metastático e falha ao tratamento clínico. O modelo de progressão tumoral sugere uma seqüência de passos: nevo comum, nevo displásico, melanoma primário em fase de crescimento radial, melanoma em fase de crescimento vertical, e melanoma metastático. Nevos são lesões benignas compostas por melanócitos com proliferação focal, organizados em ninhos e restritos em seu crescimento. Eles são precursores e marcadores para melanoma. O estabelecimento do perfil molecular de nevos, e a comparação com melanomas poderão melhorar o conhecimento da biologia do nevo, e identificar genes envolvidos nos passos iniciais da progressão tumoral. Utilizando a técnica de microarranjos de cDNA, fizemos uma análise sistemática dos genes expressos por 23 amostras de nevos (intradérmico e composto) e 18 melanomas. Nossos resultados mostraram diferenças substanciais na expressão gênica global entre nevos e melanomas, visto que as amostras puderam ser separadas por métodos de agrupamento não-supervisionado. Ainda, identificamos 510 trios classificadores capazes de distinguir amostras com 100% de precisão. Treze módulos funcionais mostraram alteração com significância estatística entre nevo e melanoma. Dentre eles, módulos correspondendo a genes envolvidos com junção intercelular, comunicação e adesão celular reforçam a importância da comunicação celular de melanócitos em seu microambiente. Diversos genes destes módulos foram estudados. Desmocolina 3 e claudina 4, com

expressão diminuída em lesões neoplásicas foram validados por RT-PCR. Kalikreína 7 e membros da família das claudinas (claudinas 7 e 11) foram avaliadas por imuno-histoquímica e tiveram expressão diminuída em melanomas. Em resumo, nossos dados apontam diferenças moleculares entre nevo benigno e melanoma primário, particularmente em módulos de adesão e comunicação celular que poderão melhorar o entendimento da biologia dos nevos e melanomas. Suporte financeiro: CNPq e CEPID/FAPESP.

## SUMMARY

Muto NH. **[Analysis of gene expression profile of melanocytic lesions]**. São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Cutaneous melanoma arises from the malignant transformation of melanocytes. Although melanoma is curable by surgery when diagnosis occurs during its early stages, the prognosis of advanced melanoma is poor due to the high metastatic potential and failure to clinical treatment. A sequence of steps for tumor progression has been proposed: common nevi, dysplastic nevi, RGP (radial growth phase) and VGP (vertical growth phase) primary melanomas, and metastatic melanomas. Nevi are benign lesions composed by melanocytes with focal proliferation, organized in nests and temporally restricted in their growth. They are both precursors and markers for melanoma. Thus, by establishing the molecular profile of nevi, and comparing it to those of melanomas, we may be able to both improve our knowledge on the biology of nevi and identify genes involved in the early steps of tumor progression. We performed a systematic analysis of genes expressed by 23 nevi samples (intra-dermal and compound) and 18 melanoma samples using cDNA microarray technology. Our results showed substantial differences in global gene expression between nevi and melanomas, as samples were precisely grouped by non-supervised clustering methods. Moreover, we identified 510 molecular classifiers able to distinguish samples with 100% efficiency. Thirteen functional modules showed alterations with statistical significance between nevi and melanoma. Among them were the modules corresponding to genes involved with intercellular junction, cell communication and cell adhesion, highlighting the importance of cellular communication of melanocytes in their microenvironment. Several genes from these modules were further studied. Desmocollin 3 and Claudin 4 were investigated by RT-PCR, and were

downregulated in neoplastic lesions. Kalikrein 7 and members of the claudin family (claudin 7 and 11) had decreased expression at the protein level, as observed using immunohistochemistry. In summary, our data pointed to molecular differences between benign nevus and primary melanoma, particularly in modules of cell adhesion and cell communication that could help in the better understanding of the biology of nevi and melanomas. Financial support: CNPq and CEPID/FAPESP.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema da progressão tumoral do melanoma	7
<b>Figura 2</b>	Esquema do modelo de reconstituição artificial de pele	22
<b>Figura 3</b>	Macrofoto e dermafoto de nevo intradérmico	58
<b>Figura 4</b>	Perfil eletroforético de RNA total de nevus	62
<b>Figura 5</b>	Perfil eletroforético dos RNAs componentes do RNA referência	62
<b>Figura 6</b>	Perfil eletroforético do RNA amplificado de nevus	63
<b>Figura 7</b>	Imagem composta de hibridação	64
<b>Figura 8</b>	MAPlot e histograma do dado não normalizado e normalizado por Lowess	67
<b>Figura 9</b>	Correlação entre a normalização por Mdye e Lowess	68
<b>Figura 10</b>	Controle regional da lâmina	69
<b>Figura 11</b>	Controle entre as réplicas	70
<b>Figura 12</b>	Agrupamento hierárquico não-supervisionado de nevus e melanomas	71
<b>Figura 13</b>	Agrupamento não-supervisionado das amostras por Self Organizing Map	72
<b>Figura 14</b>	Mapa de módulos funcionais alterados	78
<b>Figura 15</b>	Boxplot de genes diferencialmente expressos nos módulos alterados	82
<b>Figura 16</b>	Agrupamento por SOM do módulo de comunicação celular	87
<b>Figura 17</b>	Agrupamento por SOM do módulo de assinatura metastática	88
<b>Figura 18</b>	Rede de relevância do módulo de adesão	90
<b>Figura 19</b>	Scatter plot da correlação entre DSC3 e ARF6	91
<b>Figura 20</b>	Scatter plot de pares de genes de desenvolvimento da epiderme	92
<b>Figura 21</b>	Scatter plot de alguns pares de genes de módulos alterados	93
<b>Figura 22</b>	Representação do trio classificador UBE3A, SELS e CASP6	97
<b>Figura 23</b>	Análise da eficiência de classificação de duplas de genes	98

<b>Figura 24</b>	Análise da eficiência de classificação de duplas de genes	100
<b>Figura 25</b>	Classificadores entre melanoma extensivo superficial x nevo e melanoma acral x nevo	101
<b>Figura 26</b>	Scatter plot da comparação nevo composto x intradérmico e melanoma extensivo superficial x acral lentiginoso	103
<b>Figura 27</b>	Agrupamento hierárquico não-supervisionado de nevos intradérmicos e compostos	106
<b>Figura 28</b>	Boxplot de DSC3 e CLDN4	107
<b>Figura 29</b>	Validação por RT-PCR de DSC3	109
<b>Figura 30</b>	RT-PCR de DSC3 em linhagens de melanoma e cultura primária de queratinócito	110
<b>Figura 31</b>	Validação de CLDN4 por RT-PCR	112
<b>Figura 32</b>	RT-PCR de CLDN4 em linhagens de melanoma	112
<b>Figura 33</b>	RT-PCR de DSC3 em amostras microdissecadas a laser	113
<b>Figura 34</b>	Teste de detecção cromogênica	115
<b>Figura 35</b>	Imuno-histoquímica de DSC3 em nevos	115
<b>Figura 36</b>	Imunocitoquímica de DSC3 e CLDN4 em linhagem SKMel28	116
<b>Figura 37</b>	Imunocitoquímica de DSC3 e CLDN4 em linhagem SKMel188	116
<b>Figura 38</b>	Validação por imuno-histoquímica de KLK7	117
<b>Figura 39</b>	Imuno-histoquímica de Claudina 7	118
<b>Figura 40</b>	Imuno-histoquímica de Claudina 11	119
<b>Figura 41</b>	Representação do trio classificador DSC3, KRT5 e COL4A1	120
<b>Figura 42</b>	Imuno-histoquímica de queratinócito isolado de prepúcio	122
<b>Figura 43</b>	Imuno-histoquímica de fibroblasto isolado de prepúcio	122
<b>Figura 44</b>	Equivalente artificial de pele	123
<b>Figura 45</b>	Imuno-histoquímica de Melan A	123

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Estadiamento clínico do melanoma cutâneo	9
<b>Tabela 2</b>	Seqüência dos iniciadores para amplificação dos genes DSC3 e CLDN4	38
<b>Tabela 3</b>	Painel de anticorpos utilizados	40
<b>Tabela 4</b>	Sistemas de amplificação e cromógenos de detecção	41
<b>Tabela 5</b>	Dados clínicos de Nevos	60
<b>Tabela 6</b>	Dados clínicos de Melanomas	61
<b>Tabela 7</b>	Genes diferencialmente expressos entre melanomas primários e nevos	73
<b>Tabela 8</b>	Lista dos genes com alteração significativa nas amostras, que contribuíram para definição do status do módulo (pvalor < 0.05)	79
<b>Tabela 9</b>	Melhores trios classificadores	96
<b>Tabela 10</b>	Genes diferencialmente expressos entre 10 nevos intradérmicos e 4 nevos compostos	105

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\phi$	diâmetro
$\lambda$	lambda
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
$\alpha\text{-MSH}$	alpha-melanocyte stimulating hormone
$\mu\text{g}$	micrograma
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{m}$	micrômetro
>	maior
<	menor
<b>AP</b>	Anátomo Patológico
<b>ARF6</b>	ADP-ribosylation factor 6
<b>aRNA</b>	amplified RNA
<b>BID</b>	BH3 interacting domain death agonist
<b>BNC</b>	basonuclein 1
<b>BRAF</b>	B-Raf proto-oncogene serine/ threonine-protein kinase
<b>BSA</b>	bovine serum albumin
<b><i>B. subtilis</i></b>	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>C1QR1</b>	C1q receptor 1
<b>CASP</b>	caspase
<b>CD44</b>	CD44 molecule (Indian blood group)
<b>CDKN2A</b>	cyclin dependent kinase inhibitor 2A
<b>cDNA</b>	complementary DNA
<b>CEP</b>	Comitê de ética em pesquisa
<b>Ch</b>	canal (channel)
<b>CLCA4</b>	chloride channel, calcium activate, family member 4
<b>CLDN</b>	claudin
<b>CNPq</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

<b>CNTN1</b>	contactin 1
<b>CO<sub>2</sub></b>	gás carbônico
<b>COL17A1</b>	collagen, type XVII, alpha 1
<b>COL4A1</b>	collagen, type IV, alpha 1
<b>CTGF</b>	connective tissue growth factor
<b>CYP27B1</b>	cytochrome P450, family 27, subfamily B, polypeptide 1
<b>CYR61</b>	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61
<b>DAB</b>	3,3”Diaminobenzidine Tetrahydrochloride
<b>dATP</b>	deoxyadenosine triphosphate
<b>dCTP</b>	deoxycytosine triphosphate
<b>DEPC</b>	diethyl pyrocarbonate
<b>dGTP</b>	deoxyguanosine triphosphate
<b>DMEM</b>	dulbecco’s Modified Eagle’s Medium
<b>DMSO</b>	dimethyl sulfoxide
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid
<b>dNTP</b>	deoxyribonucleotides triphosphate
<b>DSC3</b>	desmocollin 3
<b>dTTP</b>	deoxythymidine triphosphate
<b>dT(24)-T7</b>	cauda de resíduo de 24 timinas ancorado ao promotor da T7 polimerase
<b>dUTP</b>	deoxyuridine triphosphate
<b>EGF</b>	fator de crescimento epidérmico (epidermal growth factor)
<b>ED</b>	equivalente dérmico
<b>EDNRB</b>	endotelin receptor type B
<b>EDTA</b>	ethylenediamine tetraacetic acid
<b>EVPL</b>	envoplakin
<b>FAD104</b>	factor for adipocyte differentiation 104
<b>FAPESP</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
<b>FASTK</b>	Fas-activated serine/threonine kinase
<b>FDPS</b>	farnesyl-diphosphate synthase
<b>FDR</b>	false discovery rate
<b>FLJ25084</b>	hypothetical protein FLJ25084

<b>FLOT1</b>	flotillin 1
<b>FXYD5</b>	FXYD domain containing ion transport regulator 5
<b>GABRA4</b>	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 4
<b>GEO</b>	gene expression omnibus
<b>GGPS1</b>	geranylgeranyl diphosphate synthase 1
<b>GJA1</b>	gap junction protein, alpha 1, 43kDa
<b>GJB1</b>	gap junction protein, beta1, 32kDa
<b>GRIN2B</b>	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	água oxigenada
<b>H/E</b>	hematoxilina/ eosina
<b>HCl</b>	ácido clorídrico
<b>HEPES</b>	4-(2-hydroxyethyl)-1- piperazineethanesulfonic acid
<b>HIPK2</b>	homeodomain interacting protein kinase 2
<b>HMGCR</b>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase
<b>HNRPF</b>	heterogenous nuclear ribonucleoprotein F
<b>IME-USP</b>	Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo
<b>KEGG</b>	Kyoto Enciclopédia of Genes and Genomes
<b>KLK</b>	kallikrein
<b>KRT</b>	keratin
<b>KSFM</b>	Keratinocyte serum-free medium
<b>LABRI</b>	Laboratório de Resposta à Inflamação
<b>LAMA3</b>	laminin, alpha 3
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>LEPR</b>	leptin receptor
<b>LICR</b>	Ludwig Institute For Cancer Research
<b>LOC56851</b>	chromosome 15 hypothetical ATG/GTP binding protein
<b>Log2</b>	binary logarithm
<b>LOWESS</b>	locally weighted scatterplot smothing
<b>MAIGES</b>	Mathematical Analysis of Interacting Gene Expression Systems
<b>MCR1R</b>	melanocortin1 receptor
<b>MDM4</b>	double minute 4 protein

<b>mg</b>	miligrama
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	cloreto de magnésio
<b>mL</b>	mili-litros
<b>mM</b>	miliMolar
<b>M</b>	molar
<b>ms</b>	mili-segundo
<b>mRNA</b>	messenger RNA
<b>mw</b>	mili-wolts
<b>NFkB</b>	nuclear factor NF-kappa-B
<b>NH<sub>4</sub>AC</b>	acetato de amônia
<b>ng</b>	nanograma
<b>NEO1</b>	neogenin homolog 1 (chicken)
<b>NER</b>	nucleotide excision repair
<b>NaOH</b>	hidróxido de sódio
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	sodium bicarbonate
<b>NMU</b>	neuromedin U
<b>OMIM</b>	Online Mendelian Inheritance in Man
<b>ORESTES</b>	open read frame EST sequences
<b>PAK1IP1</b>	PAK1 interacting protein 1
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PBS</b>	phosphate Buffered Saline
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction
<b>PGD</b>	phosphogluconate dehydrogenase
<b>pH</b>	potencial de hidrogênio iônico
<b>PLAGL1</b>	pleiomorphic adenoma gene-like 1
<b>pmol</b>	picomoles
<b>PMT</b>	photomultiplier tube
<b>POMC</b>	pró-opiomelanocortin
<b>POSTN</b>	periostin, osteoblast specific factor
<b>PPIB</b>	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)
<b>Pró-MMP2</b>	pró-metalloprotein 2
<b>pvalor</b>	valor de probabilidade

<b>SDS</b>	sodium dodecyl sulfate
<b>SFRP2</b>	secreted frizzled-related protein 2
<b>SVD</b>	singular value decomposition
<b>RGH</b>	registro geral do hospital
<b>RNA</b>	ribonucleic acid
<b>RnasIN</b>	RNAse inhibitor
<b>rNTP</b>	ribonucleotides triphosphate
<b>SSC</b>	saline sodium citrate
<b>RT-PCR</b>	reverse transcription polymerase chain reaction
<b>SELS</b>	selenoprotein S
<b>SFB</b>	soro fetal bovino
<b>SGCE</b>	sarcoglycan, epsilon
<b>SOM</b>	Self organizing map
<b>STIM2</b>	stromal interaction molecule 2
<b>STK3</b>	serine threonine kinase 3
<b>SUS</b>	Sistema único de saúde
<b>SVM</b>	support vector machine
<b>Tcf/LEF</b>	transcription factor/lymphoid enhancer binding factor
<b>TM</b>	melting temperature
<b>TNFSF13</b>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13
<b>TPBG</b>	trophoblast glycoprotein
<b>U</b>	unidade
<b>UBE3A</b>	ubiquitin protein ligase E3A
<b>UV</b>	ultravioleta
<b>xg</b>	vezes a gravidade
<b>ZNF83</b>	zinc finger protein 83

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Pele	1
1.1.1	A origem dos melanócitos	2
1.1.2	Melanócitos e sua interação com queratinócitos	3
1.1.3	A melanina	4
1.2	Melanoma e o modelo de progressão tumoral	6
1.2.1	Fatores de risco	10
1.2.2	Lesões precursoras	13
1.2.3	Nevo melanocítico adquirido	14
1.2.4	Nevo melanocítico congênito	15
1.2.5	Processo de nevogênese	16
1.3	Diagnóstico de lesões melanocíticas	17
1.4	Caracterização do problema	19
1.5	A metodologia de microarranjos de cDNA e sua utilização em lesões melanocíticas	20
1.6	Modelo de reconstituição artificial da pele	21
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>23</b>
2.1	Objetivos específicos	23
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>24</b>
3.1	Coleta de amostras	25
3.1.1	Obtenção de RNA referência	27
3.2	Extração e amplificação de RNA	27
3.3	Experimentos com microarranjos de cDNA	28
3.3.1	Biochip	28
3.3.2	Marcação e hibridação	29
3.4	Aquisição das imagens e análise dos dados	30
3.4.1	Controle de qualidade dos dados	31
3.4.2	Análise estatística	32

3.4.3	Módulos Funcionais	34
3.4.4	Redes de Relevância	36
3.4.5	Classificadores	36
3.5	Validação de genes	37
3.5.1	Reação de seqüenciamento	37
3.5.2	Reação de RT-PCR	37
3.5.3	Microdissecção a laser de nevos emblocados em parafina	38
3.5.4	Reações de imuno-histoquímica	39
3.6	Isolamento e caracterização de células de prepúcio humano	42
3.7	Construção dos equivalentes de pele	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>57</b>
4.1	Casuística	57
4.2	Extração e amplificação de RNA	59
4.3	Marcação e hibridação	64
4.4	Controle de qualidade dos dados	65
4.5	Análise estatística dos dados	71
4.6	Validação por RT-PCR	107
4.6.1	RT-PCR em amostras dissecadas a laser	113
4.7	Validação por imuno-histoquímica	114
4.7.1	Tentativa de validação do trio classificador COL41A, DSC3, KRT5	120
4.8	Isolamento de células de prepúcio e sua utilização em equivalente dérmico	121
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>124</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>143</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>145</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>146</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PELE

A pele é o órgão de revestimento do corpo, constituindo barreira protetora contra o ambiente externo. É ainda, um fator de termo-regulação, além de sua função sensorial. Ela é composta por três estratos - epiderme, derme e tecido subcutâneo - que se interconectam anatômica e funcionalmente.

A epiderme é um epitélio escamoso estratificado composto principalmente por queratinócitos, além de melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. Os queratinócitos basais se proliferam e levam à renovação da epiderme. À medida que os queratinócitos movem em direção à superfície da pele, eles sofrem um processo de diferenciação resultando na queratinização da pele. A lâmina basal separa a epiderme da derme, formada por um sistema integrado de colágeno e fibras reticulares, elastina e glicosaminoglicanos numa matriz extracelular, que aloja nervos, vasos, apêndices epidérmicos, fibroblastos e outros tipos celulares como macrófagos, mastócitos, linfócitos e leucócitos, que chegam à derme em resposta a estímulos variados (CHU et al. 2003).

### 1.1.1 A origem dos melanócitos

Melanócitos são células produtoras de melanina, e localizam-se na camada basal da epiderme, infundíbulo e região bulbar dos folículos pilosos, coróide e leptomeninges. As células progenitoras da crista neural migram do tubo neural até a superfície dorsolateral, se tornando células com potencial para se diferenciar em melanoblastos, neurônio, células da glia, célula cardíaca, e tecido craniofacial (LIN e FISHER 2007). Os melanoblastos (células precursoras dos melanócitos) sofrem um processo de diferenciação na derme originando os pré-melanócitos precoces e intermediários, que expressam marcadores clássicos como TRP-1 (tyrosinase-related protein 1) e tirosinase, sob influência de MSH (melanocyte-stimulating hormone). Na pele, eles tem seu destino final nos folículos pilosos e na camada basal da epiderme, onde permanecem quiescentes, apesar do seu potencial proliferativo (LI e HERLYN 2000).

Diversas vias de sinalização e fatores de transcrição regulam a migração dos melanócitos, como c-kit, endotelinas 1 e 3, HGF (hepatocyte growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), caderinas, e MITF (microphthalmia transcription factor) que tem papel central, regulando a ativação de uma diversidade de genes, como Bcl-2 (B-cell leukaemia/lymphoma 2), CDK2 (ciclin-dependent kinase 2), c-Met, p16, p21/cip1, TRP1, TRP2, gp100, melan-A e melastatin. O promotor de MITF, por sua vez, é regulado em parte pelos fatores de transcrição PAX3 (paired-box 3), SOX10 (sex-determining region Y-box 10), Tcf/LEF (Transcription factor/ Lymphoid enhancer binding factor) e CREB (cAMP responsive-

element-binding protein). Ainda, a sinalização de SCF/c-kit (stem cell factor/c-kit) leva à regulação pós-transcricional de MITF, através da fosforilação por MAP kinase (Mitogen- activated-protein kinase) (LIN e FISHER 2007).

### **1.1.2 Melanócitos e sua interação com queratinócitos**

Na pele humana em condições fisiológicas normais, melanócitos e queratinócitos estão alinhados ao longo da zona de lâmina basal numa razão de 1:5-8. Cada melanócito interage através de seus prolongamentos dendríticos com cerca de 35 queratinócitos da camada superficial da epiderme, constituindo a unidade pigmentar, responsável pela transferência de melanosomos durante o processo de pigmentação (LI e HERLYN 2000) possivelmente por um processo de exocitose-fagocitose (VIRADOR et al. 2002).

A proliferação de melanócitos é dependente do seu descolamento da membrana basal e perda de contato com queratinócitos, e posterior retração dos dendritos. Após o ciclo celular, as células migram ao longo da lâmina basal para estabelecimento de interações celulares formando outra unidade pigmentar (HAASS et al. 2005). Este posicionamento é fundamental para a manutenção da homeostasia, uma vez que o escape dos melanócitos seguido de proliferação contínua poderia levar à formação de nevos. Tanto proliferação como expressão de moléculas de superfície celular, grau de crescimento dendrítico e quantidade de melanina contida nos melanócitos estão sujeitos à regulação pelos queratinócitos basais vizinhos através de

um sistema complexo de fatores de crescimento parácrinos e moléculas de adesão célula-célula.

Diversas famílias de moléculas parecem estar envolvidas na adesão entre melanócitos e queratinócitos, como a família das caderinas, das conexinas e das integrinas, sendo a primeira a principal responsável pelo processo de inibição de proliferação por contato. Caderinas são moléculas de adesão celular dependentes de cálcio. Elas se localizam na membrana, se concentram nos sítios de contato célula-célula e interagem com proteínas citoplasmáticas, como beta-catenina, formando a junção aderente. As conexinas formam a junção intercelular *gap*, um canal que permite a transferência passiva de moléculas de baixo peso molecular. A perda ou redução da permeabilidade de junções *gap* poderia isolar células de sinais regulatórios do micro-ambiente, resultando em padrões anormais de crescimento (LI e HERLYN 2000).

### **1.1.3 A melanina**

O processo de biossíntese da melanina ocorre no melanossomo, uma organela intracelular (estruturalmente semelhante ao lisossomo) que se origina do retículo endoplasmático. Durante a biogênese do melanossomo, há compartimentalização da enzima tirosinase e proteínas relacionadas (TRP1 e TRP2), que participam da gênese da melanina. Ela se inicia com a hidroxilação de L-fenilalanina a L-tirosina, ou diretamente de L-tirosina, que é hidroxilado (via tirosinase) para L-dihydroxifenilalanina (L-DOPA). Posteriormente, L-DOPA é oxidado para dopaquinona, comum às vias de

eumelanina (pigmento preto/marrom) e feomelanina (pigmento vermelho/amarelo).

A eumelanogênese envolve a transformação de dopaquinona em leukodopachrome, seguido por uma série de reações de oxi-redução com a produção de 5,6-dihidroindol (DHI) e 5,6-dihidroindol-2-ácido carboxílico (DHICA), que sofrem polimerização formando a eumelanina. No caso de feomelanina, a dopaquinona é conjugada à cisteína ou glutatona produzindo cisteinildopa e glutationildopa, que são então transformadas em feomelanina (SLOMINSKI et al. 2004).

A pigmentação humana é geneticamente determinada, e diferenças individuais são resultantes de variações no número, tamanho, composição e distribuição dos melanossomos, embora o número de melanócitos se mantenha relativamente constante. A combinação da síntese dos dois tipos de pigmento produzem misturas de composição variada que são expressas fenotipicamente nos fototipos de pele e cuja distribuição pode afetar a absorção e reflexão da luz (KINCANNON e BOUTZALE 1999). Segundo a classificação de Fitzpatrick, os tipos de pele são divididos em fototipo I a VI, de acordo com a susceptibilidade a queimadura solar e capacidade de bronzeamento.

Nos queratinócitos a melanina tem ação fotoprotetora, se posicionando estrategicamente sob a região do núcleo exposta ao sol, de modo a formar estruturas protetoras (*cap-like*) absorvendo radiação e removendo os radicais livres da foto-oxidação; entretanto, nos melanócitos, o processo de melanogênese pode representar um risco devido a geração

de ortoquinonas, espécie reativa que pode se ligar covalentemente a proteínas e ácido nucléico, caso ocorra escape destas moléculas do compartimento melanosomal (RILEY 2003).

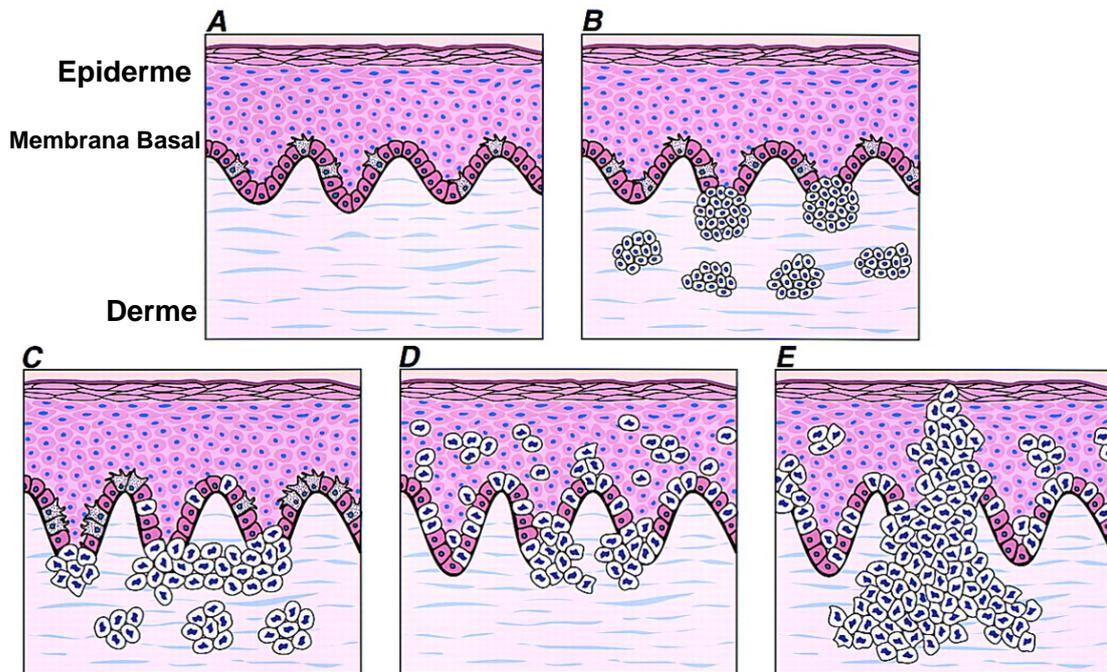
## 1.2 MELANOMA E O MODELO DE PROGRESSÃO TUMORAL

Melanoma cutâneo é uma neoplasia maligna dos melanócitos. É o câncer de pele com pior prognóstico devido ao seu comportamento biológico agressivo e alto potencial de produzir metástase.

É uma neoplasia que pode afetar indivíduos jovens, e inicia-se como uma lesão escura que aumenta de tamanho em extensão e/ou profundidade, com alteração de cores, surgimento de pontos pigmentados, ulceração, sangramento e/ou sintomas como coceira, dor e inflamação. Quando ocorre metástase, tende a se localizar em sítios não viscerais como pele ou linfonodo, mas pode acometer vísceras como pulmão, fígado, cérebro e intestino delgado (MASCI e BORDEN 2002).

Baseado em características clínicas e histopatológicas, foi proposto um modelo de progressão tumoral que explica a gênese de alguns melanomas, a partir de lesões precursoras. Segundo este modelo, proposto por CLARK (1991) e ELDER (1999), lesões névicas comuns, originados direta ou indiretamente de melanócitos imaturos poderiam progredir para nevos displásicos, melanomas de crescimento radial (melanoma *in situ*, confinado primariamente na epiderme), melanomas de crescimento vertical (invasão tumoral na derme) e finalmente melanomas metastáticos.

Alternativamente, melanócitos imaturos poderiam originar inicialmente qualquer uma das formas tumorais. A Figura 1 mostra o esquema de progressão do melanoma, ilustrado na revisão de CHIN et al. (1998).



**Legenda:** Estágios da progressão histopatológica na transformação melanocítica. **A-** pele normal. **B-** proliferação benigna de melanócitos. Melanócitos névicos estão organizados em ninhos uniformes, formando o nevo composto. **C-** Displasia. Os ninhos são irregulares e constituídos de melanócitos atípicos, formando o nevo displásico. **D-** Melanoma in situ, em fase de crescimento radial. Algumas células se espalham para porções superiores da epiderme. **E-** Melanoma maligno, em fase de crescimento vertical.

**Fonte:** CHIN et al. (1998)

**Figura 1** - Esquema de progressão tumoral do melanoma.

De acordo com a localização anatômica e padrão de crescimento do tumor, os principais tipos de melanoma são: extensivo superficial, lentigo maligno, nodular e acral lentiginoso. O tipo extensivo superficial é o tipo mais comum (70% dos melanomas), e geralmente acomete tronco nos homens, e

pernas nas mulheres, assim como melanoma nodular cuja frequência é de cerca de 10-25%. O subtipo acral tem frequência de cerca de 5% e acomete palma, sola do pé, e unhas, enquanto lentigo maligno é o mais raro, com frequência menor de 1%, acometendo normalmente cabeça e pescoço de pacientes idosos (CHUDNOVSKY et al. 2005).

De acordo com o American Joint Committee on Cancer/AJCC/2006, o estadiamento clínico segue a classificação TNM (Tumor Node Metastasis), que é utilizado para a definição dos estádios clínicos 0 a IV (GREENE et al. 2006), como mostrado na Tabela 1. A classificação T mede a profundidade do tumor em milímetros, a classificação N avalia o número de linfonodos acometidos, e M o número de metástase.

A espessura do tumor é avaliada pelo índice de Breslow, medida em milímetros da camada granulosa da epiderme até a célula de melanoma mais profunda na derme (BRESLOW 1970). O nível de Clark (CLARK et al. 1969) também é uma medida de profundidade do tumor, e corresponde à invasão do melanoma em níveis: I) melanoma confinado à epiderme sem invasão da derme papilar; II) invasão da derme papilar; III) comprometimento de toda a derme papilar até a transição com a derme reticular; IV) invasão da derme reticular e V) invasão da hipoderme.

**Tabela 1 - Estadiamento do melanoma cutâneo.**

Estadio clínico	T	N	M
0	Tis	NO	MO
IA	T1a	NO	MO
IB	T1b	NO	MO
	T2a	NO	MO
IIA	T2b	NO	MO
	T3a	NO	MO
IIB	T3b	NO	MO
	T4a	NO	MO
IIC	T4b	NO	MO
III	qq T	N1	MO
		N2	MO
		N3	MO
IV	qq T	qq N	qq M1

Classificação T		
T1	<=1mm	a: sem ulceração ou Clark I/II b: com ulceração ou Clark IV/V
T2	1.01 – 2mm	a: sem ulceração b: com ulceração
T3	2.01 - 4mm	a: sem ulceração b: com ulceração
T4	>4mm	a: sem ulceração b: com ulceração
Classificação N		
N1	1 linfonodo	a: micrometástase b: macrometástase
N2	2 - 3 linfonodos	a: micrometástase b: macrometástase c: metástase em trânsito/nódulo satellite sem metástase linfonodal
N3	>=4 linfonodos, ou a combinação de metástase em trânsito/nódulo satellite com metástase linfonodal	
Classificação M		
M1	Pele à distância, tecido subcutâneo ou linfonodo	LDH sérico normal
M2	Pulmão	LDH sérico normal
M3	Outros órgãos viscerais	LDH sérico normal
	Qualquer metástase à distância	LDH sérico elevado

**Fonte:** GREENE et al. (2006)

### 1.2.1 Fatores de risco

O melanoma representa um dos melhores exemplos de interação entre fatores genéticos e ambientais. É uma neoplasia em que o background étnico é um fator de risco significativo, e indivíduos com olhos, pele e cabelos claros com dificuldade de bronzeamento e maior propensão a queimaduras solares têm maior risco de desenvolver melanoma.

A presença de efélides e cabelo ruivo também são indicadores de risco aumentado de câncer de pele, e variantes polimórficas do gene que codifica o receptor de melanocortina-1 (MCR1R) parecem estar associados a este fenótipo. Indivíduos que se encaixam nesta situação sintetizam predominantemente feomelanina, pigmento fotolábil que pode contribuir para carcinogênese através da produção de peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, disparando stress oxidativo. Em condições normais, a ligação de  $\alpha$ -MSH (alpha-melanocyte-stimulating hormone) ao receptor MCR1R resulta na síntese de eumelanina (fotoprotetora). Já variantes polimórficas de MCR1R ou mutações no gene POMC (pró-opiomelanocortina, precursor de  $\alpha$ -MSH) levam à diminuição da habilidade da epiderme em responder aos efeitos da luz UV, pelo aumento da quantidade de feomelanina (BASTIAENS et al. 2001, CHIN 2003).

Evidências suportam a associação entre grande número de nevos adquiridos (maior que 50) ou presença de nevo atípico e um risco aumentado para desenvolvimento de melanoma (KANZLER e MRAZGERNHARD 2001). Entretanto, ainda não está claro se a frequência ou a densidade de nevos seja o melhor marcador de risco para melanoma. Se o

mecanismo de indução da doença se relaciona a um nevo em particular, o risco de doença variaria essencialmente com o número de nevos, mas considerando que o mecanismo de doença seja sistêmico, e não relacionado a um nevo específico, a densidade de nevo seria um melhor marcador de risco. De acordo com o estudo de WALTER et al. (2000), acredita-se que o número de nevos seja mais apropriado, em vistas da fraca relação encontrada entre contagem de nevos e área de superfície corpórea nos indivíduos analisados.

Cerca de 10% dos melanomas apresentam um evidente componente familiar, e estudos de pacientes portadores de formas hereditárias de melanoma cutâneo, associados à síndrome do nevo displásico culminaram na identificação do locus *CDKN2A* no cromossomo 9p21, que codifica 2 genes de suscetibilidade – p16 (INK4a) e p14 (ARF), cujos produtos agem como reguladores negativos da progressão do ciclo celular (PIEPKORN 2000).

A Síndrome do Nevo Displásico é caracterizada pelo risco aumentado para o desenvolvimento de melanoma cutâneo, freqüentemente associado a múltiplos melanomas primários e nevos displásicos. Clinicamente, os nevos displásicos possuem pigmentação variável e bordas mal definidas (MOOI 1997).

Outra condição que predispõe ao melanoma é o *Xeroderma pigmentosum*, uma doença hereditária rara, transmitida de maneira autossômica recessiva, caracterizada pelo comprometimento funcional do sistema de reparo por excisão (NER- nucleotide excision repair), que gera

sensibilidade extrema da pele a exposição solar, envelhecimento precoce da pele, predisposição a neoplasias de pele, e freqüentemente neurodegeneração (LICHON e KHACHEMOUNE 2007).

A exposição solar é o principal estímulo para pigmentação da pele através da proliferação e melanização dos melanócitos, sendo fator de risco ambiental implicado na etiologia de melanoma cutâneo maligno. Embora ainda controverso, estudos sugerem que a exposição excessiva a luz UV-B esteja implicada na indução de melanoma, agindo como iniciador e promotor tumoral (DE FABO et al. 2004).

Considera-se que o principal mecanismo de bronzeamento pela UV-B seja a produção de melanina resultante do aumento da atividade da tirosinase, enquanto o bronzeamento causado pela UV-A não constitui uma resposta celular, e ocorre fora dos melanócitos, através da foto-oxidação de precursores melanogênicos presentes na camada basal e parcialmente na camada suprabasal da epiderme (MAEDA e HATAO 2004).

Os efeitos biológicos da radiação solar nos tecidos expostos é multifatorial. A luz UV pode gerar espécies de oxigênio reativo via enzimas como catalase, levando a alteração no equilíbrio *redox* e conseqüente ativação de receptores de citocinas e fatores de crescimento. Já ácidos nucléicos podem diretamente absorver luz UV-B resultando na formação de fotodímeros pirimidina (6-4)pirimidona e dímeros de pirimidina (HECK et al. 2004), e este dano ao DNA poderia estimular a melanogênese através do aumento do nível de tirosinase e de receptores de  $\alpha$ MSH (ELLER et al. 1996).

A intensidade e tempo de exposição solar parece ser um fator fundamental na gênese do melanoma, e a exposição solar intensa e intermitente principalmente durante a infância e a adolescência parecem acentuar os efeitos da radiação ultravioleta (GILCHREST et al. 1999).

### **1.2.2 Lesões precursoras**

As lesões névicas benignas (nevos) representam tanto lesões precursoras como marcadoras para o desenvolvimento de melanoma e são compostas por ninhos de melanócitos névicos geralmente sem anormalidade citogenética, mas com comprometimento da transferência de melanossomo e redução dos prolongamentos dendríticos.

As lesões névicas já apresentam uma perturbação do balanço entre melanócitos e queratinócitos (LI e HERLYN 2000). A perda da expressão de E-caderina e o aumento da expressão de N-caderinas (expressa em fibroblastos dérmicos e células endoteliais) parece ser um evento crítico na progressão do melanoma, conferindo novas propriedades de adesão às células (HSU et al. 2000). Ainda, a diminuição de E-caderinas leva ao acúmulo de  $\beta$ -catenina, que em condições normais é recrutada para a junção aderente. Uma vez livres no citoplasma, e ocorrendo escape do mecanismo de degradação, as moléculas de  $\beta$ -catenina migram para o núcleo e formam complexo com fatores de transcrição como Tcf/LEF, promovendo proliferação celular (MEIER et al. 1998).

A noção de que nevos são precursores de melanomas é sustentada por evidência histológica de regiões de nevo lateralmente ou abaixo do

tumor. URSO et al. (1991) constataram 22,7% de melanomas com traços de nevo pré-existente ao exame patológico, enquanto SKENDER-KALNENAAS et al. (1995) encontraram 50% e KADDU et al. (2002), encontraram 22.1% de melanomas com componente névico.

Entretanto, os números podem estar sub-estimados, já que tumores avançados poderiam se sobrepor a nevo pré-existente. Num estudo abrangendo uma maior casuística, BEVONA et al. (2003) encontraram uma freqüência de 26%, sendo que alguns fatores como idade, melanoma do subtipo extensivo superficial, e localização no tronco estavam significativamente associados a melanomas com nevos pré-existente, enquanto nenhuma evidência foi encontrada em melanomas acral lentiginoso e desmoplásico.

### **1.2.3 Nevo melanocítico adquirido**

Nevos adquiridos aparecem após 6 a 12 meses de idade. Estes nevos aumentam em tamanho (em geral diâmetro menor que 5mm) e número durante a infância e a adolescência. Durante a terceira e quarta décadas de vida ainda se observa um aumento em número, com tendência ao desaparecimento com a idade (KANZLER e MRAZ-GERNHARD 2001).

Acredita-se que o nevo melanocítico adquirido tenha origem a partir da hiperplasia de melanócitos epidérmicos. A seguir, essas células se agrupam em ninhos na junção dermo-epidérmica formando o nevo juncional e migram para a região superior da derme (nevo composto). Progressivamente, esses ninhos desaparecem da epiderme concentrando-

se exclusivamente na derme, localizando-se cada vez mais profundamente e caracterizando o nevo intradérmico. No decorrer das décadas, essas células névicas sofrem diferenciação final, tornam-se senescentes e involuem (CHIN et al. 1998).

Esta seqüência de diferenciação é acompanhada por mudanças morfológicas e bioquímicas nas células névicas. As células situadas na epiderme e derme superficial (denominadas células névicas tipo A) são arredondadas (ou epitelióides), e funcionalmente equivalentes aos melanócitos epidérmicos na sua habilidade de sintetizar melanina. À medida que essas células migram para regiões inferiores da derme, elas se tornam menores, produzem menos melanina e perdem capacidade proliferativa, caracterizando células névicas do tipo B. Já quando as células alcançam regiões mais profundas da derme, elas adotam uma morfologia fusiforme, perdem a capacidade de sintetizar melanina, representando células névicas do tipo C, que se assemelham a células de Schwan. Acredita-se que as células névicas tipo C recapitulam eventos iniciais do desenvolvimento de células de Schwan, num fenômeno de transdiferenciação, ao contrário de células de melanoma que seguem vias divergentes de diferenciação (REED et al. 1999).

#### **1.2.4 Nevo melanocítico congênito**

Nevos congênitos são aqueles presentes ao nascimento ou nos primeiros 6 meses de vida. Eles podem ser divididos em nevos pequenos ( $\phi < 1,5\text{cm}$ ), intermediários ( $\phi 1,5-19,9\text{cm}$ ) e grandes ( $\phi > 20\text{cm}$ ) (MAKKAR e

FRIEDEN 2002). Cerca de 1 a 2% da população possui um ou mais nevos congênitos.

As células do nevo congênito normalmente se localizam em regiões mais profundas da derme e tendem a acompanhar os anexos cutâneos. Nevos congênitos pequenos estão confinados na região superior da derme e tem baixo risco de malignização, com raras ocorrências, como num caso relatado por KIYOHARA et al. (2003). Já em casos de nevo congênito grande se recomenda excisão profilática pelo fato destas lesões acometerem 2/3 inferiores da derme, dificultando a observação clínica de malignização (KANZLER e MRAZ-GERNHARD 2001).

#### **1.2.5 Processo de nevogênese**

Duas teorias existem para explicar a formação do componente dérmico de um nevo melanocítico, uma adaptada da teoria Abtropfung apresentada por Unna e outra que apóia a origem dérmica resultante do erro de migração celular da linhagem melanocítica (KRENGEL 2005).

Segundo a teoria Abtropfung, as células névicas têm origem epidérmica e ocorre um aprofundamento destas células na derme ao longo da idade. Este processo levaria ao desenvolvimento seqüencial de nevo juncional, composto, e finalmente nevos intradérmicos. Assim, na infância a maior parte dos nevos seriam juncionais, e com o decorrer da idade eles se tornariam intradérmicos. O trabalho de WORRET e BURGDORF (1998) correlacionou o padrão de 3.534 nevos com a idade do paciente e não encontrou evidência da teoria Abtropfung, sugerindo que possa ocorrer

movimentação de melanócitos tanto para epiderme como para derme, ao longo da vida do indivíduo, o que justificaria a presença de nevos juncionais em idosos, e nevos intradérmicos em jovens.

Ainda, especula-se que a formação do componente dérmico do nevo tenha alguma semelhança ao processo de invasão dérmica das células de melanoma durante a progressão tumoral, como a destruição da lâmina basal e matriz extracelular. GONTIER et al. (2002, 2003), utilizando modelo de derme acelular observaram presença de pró-MMP2 (pró-metaloproteinase2) em células dérmicas de nevo congênito (GONTIER et al. 2004).

Por outro lado, é possível que durante o processo de diferenciação os melanócitos não alcançaram a epiderme, mas ficaram contidos na derme por um erro de migração, e sob algum estímulo tenham proliferado formando ninhos. Isso seria especialmente válido para nevos congênitos, nos quais é difícil imaginar todo processo descrito por Unna ocorrendo em um intervalo tão curto de tempo.

### 1.3 DIAGNÓSTICO DE LESÕES MELANOCÍTICAS

Os nevo benignos, em contraste com melanoma, são lesões mais estáveis, tendem a ser simétricos, ter bordas bem definidas e uma distribuição regular de cor. Desta forma, clinicamente, a progressão de nevos melanocíticos em melanoma pode ser diagnosticada baseada numa análise quantitativa de 4 critérios (nomeados **ABCD**) referentes a **A**ssimetria, **B**ordas, **C**or e **D**iâmetro maior que 6mm.

Estes critérios foram primeiramente propostos por RIGEL e FRIEDMAN (1993) e complementados por KITTLER et al. (2000) no critério **Evolução da lesão**. Entretanto estudos recentes mostram que nem todos os melanomas se encaixam neste padrão no quesito diâmetro, com parcela significativa de melanomas menores que 6mm (FERNANDEZ e HELM 2004).

A dermatoscopia, ou microscopia de superfície com epiluminescência é um método auxiliar de diagnóstico de lesões pigmentadas cutâneas não invasivo, que permite uma melhora significativa no diagnóstico de lesões melanocíticas, proporcionando uma acurácia diagnóstica próxima de 90% (BLUM et al. 2003). Este método consiste no emprego de um aparelho ótico no qual um feixe de luz é emitido na superfície cutânea, permitindo a visualização dos caracteres dermatoscópicos resultantes da presença da pigmentação (melanina) nas diferentes camadas da pele (SA e REZZE 2004).

Dermatoscopicamente, nevos são lesões homogêneas, com rede pigmentar regular, cor única, e ausência de estruturas como estrias radiadas e pseudópodes, áreas de regressão e véu azul-esbranquiçado (indicadores de malignidade).

A característica mais comumente observada em nevos em malignização é mudança no tamanho. KITTLER et al. (2000) constataram que a frequência de crescimento de nevo comum é inversamente relacionada à idade, corroborando os relatos de RHODES (2000) de que o valor preditivo de nevos em crescimento - com ausência de características suspeitas adicionais - no diagnóstico de melanoma tende a ser alta em

adultos e baixa em crianças em fase de crescimento. Já BRAUN e SAURAT (2001) encontraram, adicionalmente ao fator crescimento, modificações no grau de pigmentação (principalmente em nevo composto) e arquitetura da lesão (principalmente em nevos displásicos).

#### **1.4 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA**

Embora o melanoma represente cerca de 5% dentre os cânceres de pele, sua incidência vem aumentando consideravelmente nas últimas décadas. No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer-INCA permitiram estimar 5760 novos casos para o ano de 2006 (Ministério da Saúde 2005).

Esta neoplasia é freqüentemente curável quando detectada e removida nos estágios iniciais, entretanto, o comportamento biológico agressivo e alto potencial metastático associado à resistência a terapias convencionais são responsáveis pela alta taxa de mortalidade em casos de diagnóstico tardio (SERRONE e HERSEY 1999).

No momento, prevenção e detecção precoce são as únicas medidas efetivas para o tratamento do melanoma. Assim, é necessário o desenvolvimento e melhora das técnicas diagnósticas para detecção precoce de lesões melanocíticas, e a falta de elementos que permitam caracterizar melhor as lesões precursoras tem motivado a busca de marcadores moleculares que possam esclarecer as alterações bioquímicas na transformação maligna, com potencial preditivo para o fenômeno de progressão destes tumores.

Desta forma, a identificação de alteração dos genes expressos pelos melanócitos névicos podem prover dados fundamentais para o conhecimento da biologia do nevo, e também dos fatores que discriminariam as lesões que progridem para melanoma, sobretudo através de metodologias com alta capacidade de processamento como a técnica de hibridação em microarranjos de cDNA (*cDNA microarrays*).

## **1.5 A METODOLOGIA DE MICROARRANJOS DE cDNA E SUA UTILIZAÇÃO EM LESÕES MELANOCÍTICAS**

Técnicas para análise de expressão gênica incluem *Northern blot*, *differential display*, PCR, entre outros, entretanto uma das limitações destas metodologias se baseia na pequena quantidade de gene que pode ser estudado em um único experimento. Já a tecnologia de microarranjos de cDNA permite a análise de milhares de genes em um único experimento e tem sido empregada em diversas doenças humanas, particularmente em cânceres, com o intuito de identificar genes envolvidos na oncogênese e progressão tumoral (KIM et al. 2002). Tais estudos utilizando microarranjos de cDNA são possíveis graças ao conhecimento adquirido durante o mapeamento e seqüenciamento em larga escala do genoma humano (genômica estrutural), que fornece subsídio para a análise funcional em larga escala (genômica funcional).

Esta técnica tem sido utilizada em lesões melanocíticas e permitido a análise global dos genes expressos em diferentes tipos de abordagens,

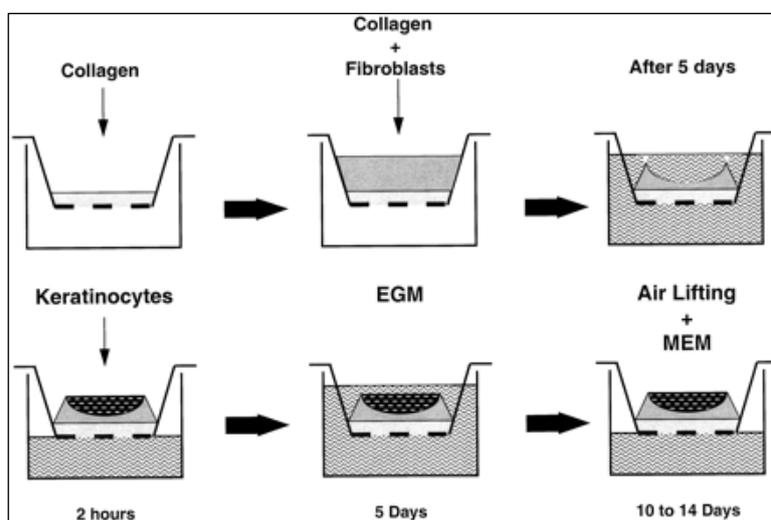
como tentativa de classificação molecular (BITTNER et al. 2000), busca de assinatura molecular de potencial imunogênico (WANG et al. 2002, 2004), busca de genes diferencialmente expressos associados à supressão tumoral em linhagem de melanoma humano (DERISI et al. 1996; SU et al. 2000), estudos comparativos entre linhagem de melanócitos e melanoma humano (HOEK et al. 2004), identificação de genes diferencialmente expressos entre nevos, melanomas primários (SEYKORA et al. 2003) e metástases (HAQQ et al. 2005), identificação de perfil de expressão relacionados a risco de metástase a distância (WINNEPENNINCKX et al. 2006), comparação de linhagens com alto e baixo potencial metastático (CLARK et al. 2000), de linhagens mutadas e *wild type* para o gene BRAF (PAVEY et al. 2004) entre outros.

## **1.6 MODELO DE RECONSTITUIÇÃO ARTIFICIAL DA PELE**

Reconstruções artificiais de pele são modelos tri-dimensionais *in vitro* que simulam a estrutura e funcionamento da pele, e podem ser obtidos pela utilização de derme acelular cadavérica (ESPINOSA-DE-LOS-MONTEROS et al. 2007) ou matriz de colágeno com fibroblasto (WILSON et al. 1992; MEIER et al. 2000) nos quais queratinócitos epidérmicos são semeados.

O sistema que utiliza matriz de colágeno compreende um compartimento dérmico composto por fibroblastos embebidos em uma matriz de colágeno colocada sobre uma grade que permite a formação da interface ar-meio de cultura, que favorece a formação do componente epidérmico

através da proliferação, estratificação e diferenciação dos queratinócitos semeados neste “raft”. Um esquema deste tipo de modelo está ilustrado na Figura 2, obtida de MEIER et al. 2000. Dessa forma, este modelo possibilita o estudo do comportamento de células cutâneas isoladas de diferentes contextos fisiológicos, além de permitir a validação de genes diferencialmente expressos identificados ao longo da progressão tumoral do melanoma.



**Legenda:** Esquema da reconstrução de pele humana *in vitro*. A matriz de colágeno compreende uma camada de colágeno com fibroblastos, os quais, após 05 dias, provocam retração do colágeno. Queratinócitos com melanócitos ou células de melanoma são semeados na presença de fator de crescimento epidérmico por 05 dias, seguido da formação da interface ar-meio de cultura, promovendo diferenciação dos queratinócitos.

**Fonte:** MEIER et al. (2000)

**Figura 2** - Esquema do modelo de reconstituição artificial de pele

## **2 OBJETIVO**

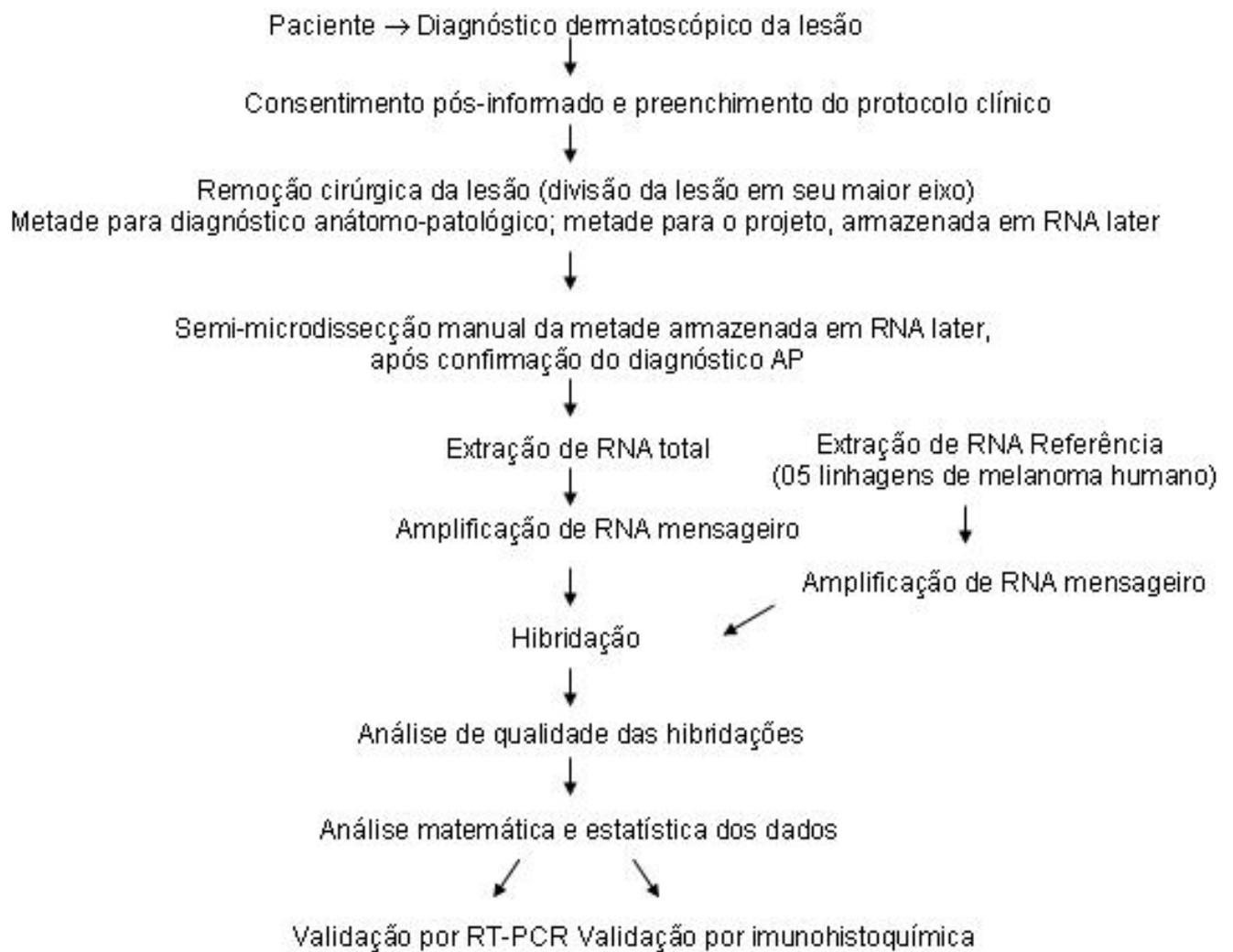
O trabalho teve como objetivo analisar o perfil de expressão gênica global em nevos compostos e intradérmicos e comparar com melanomas primários, visando o entendimento das diferenças moleculares que determinem que o melanócito névico se comporte como uma lesão benigna, mesmo estando fora do seu microambiente natural, e a busca de marcadores que possam esclarecer as alterações bioquímicas da transformação maligna.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar o perfil de expressão gênica de amostras de nevo composto e nevo intradérmico através da metodologia de cDNA microarray.
2. Comparar o perfil de genes dessas amostras com perfil de genes expressos em melanoma (amostras utilizadas no projeto de doutorado de Waleska K Martins – MARTINS 2007)
3. Efetuar a validação de alguns genes diferencialmente expressos por RT-PCR e imuno-histoquímica
4. Isolar e estabelecer cultivo primário de queratinócito e fibroblasto humano, e aplicar estas células no modelo de reconstituição artificial de pele.

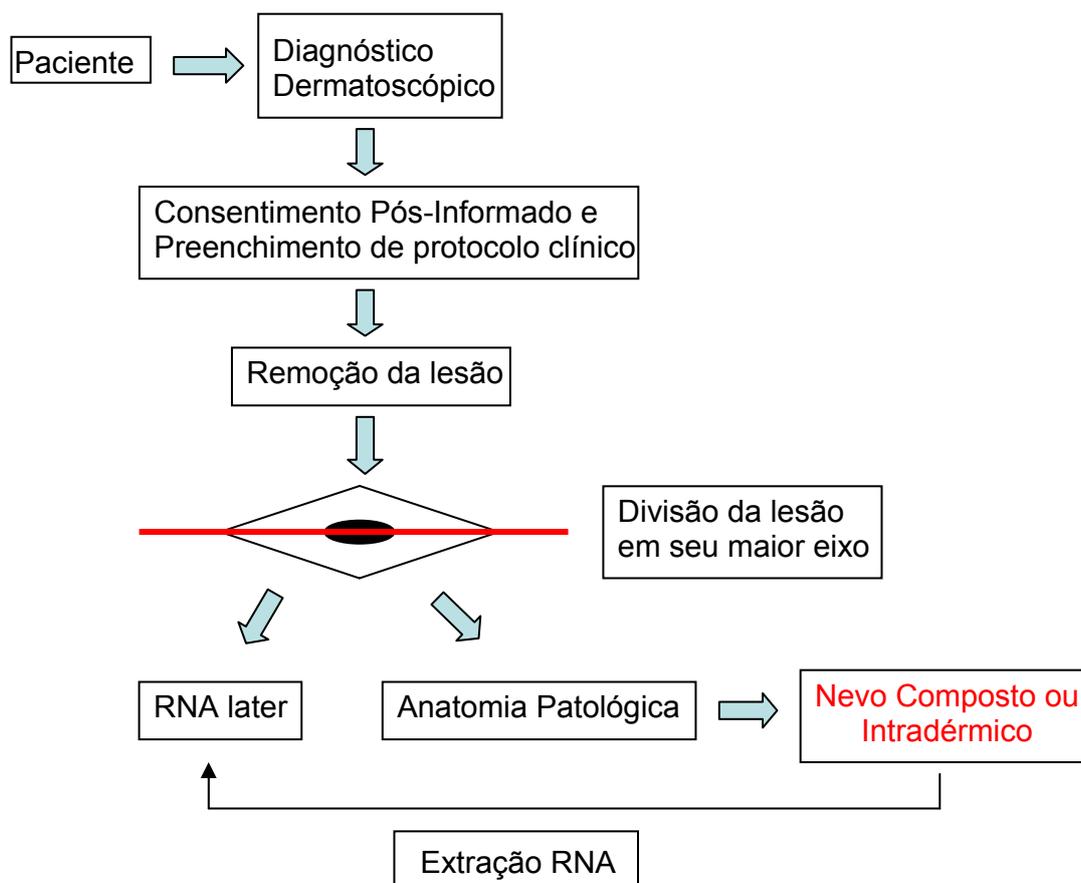
### 3 MATERIAL E MÉTODO

A metodologia utilizada no trabalho está representada no fluxograma abaixo:



### 3.1 COLETA DE AMOSTRAS

Todos os procedimentos para recrutamento e coleta de amostras de nevos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital AC Camargo (CEP 560/03 – 09.12.2003), e estão esquematizados abaixo.



Foram incluídos no estudo nevos compostos e intradérmicos, adquiridos ou de padrão congênito. As amostras de melanoma primário foram cedidas por Waleska K Martins do nosso grupo, cujo estudo comparou, pela mesma metodologia, melanomas primários e melanomas metastáticos.

As lesões névicas foram avaliadas clinicamente de acordo com o critério ABCDE (RIGEL e FRIEDMAN 1993; KITTLER et al. 2000) e dermatoscopicamente, para definição da hipótese diagnóstica. Somente pacientes com diagnóstico dermatoscópico de nevo composto/ dérmico sem suspeita de atipia foram recrutados para este projeto. Os pacientes foram encaminhados para remoção cirúrgica da lesão, após preenchimento de um protocolo clínico, do termo de consentimento informado e documentação fotográfica (fotos macro e dermafoto).

A lesão foi dividida ao meio (em seu maior eixo), sendo uma metade armazenada em RNA later™ (Ambion) por 24 horas a 4°C seguido de estocagem a -20°C e a outra metade encaminhada ao Departamento de Anatomia Patológica (seguindo-se procedimento rotineiro) do Hospital AC Camargo. Foram confeccionadas lâminas histológicas (H/E-hematoxilina/eosina) por corte de congelação, da metade da lesão encaminhada ao projeto, que foram avaliadas durante o processo de semi-microdissecção. Em caso de nevo atípico ou indefinição do diagnóstico, o fragmento armazenado em RNA later seria devolvido para definição do diagnóstico, portanto sem acarretar prejuízo ao paciente.

O processo de semi-microdissecção manual constituiu a remoção de tecido contaminante (epiderme, derme, anexos cutâneos) da peça cirúrgica, através de um bisturi, orientando-se pela lâmina H/E da amostra. A área microdissecada compreendeu ninhos de nevos, incluindo componentes estromais dos ninhos, e a contaminação estimada foi de cerca de 30- 40%.

O material semi-microdissecado foi armazenado em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA total.

### **3.1.1 Obtenção do RNA referência**

O RNA referência é uma amostra utilizada como controle para gerar medidas de razão para diferentes amostras testes, permitindo a subsequente comparação horizontal entre todas as amostras. Neste projeto, o RNA referência utilizado nas hibridações foi proveniente de um pool de RNA de 05 linhagens de células de melanoma humano (SKMeI05, SKMeI19, SKMeI28, SKMeI37 e SKMeI188) cultivadas em nosso laboratório pela aluna Ana Helena Pagotto. O DNA destas células foi submetido ao teste de contaminação por micoplasma, através de PCR do gene ribossomal 16S, e o RNA total foi extraído utilizando o kit RNeasy Midikit (Qiagen), seguindo especificações do fabricante.

## **3.2 EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE RNA**

O RNA total dos fragmentos de tecido foi extraído utilizando o Kit RNeasy Midi kit (Qiagen) com algumas modificações (**Protocolo I**), e

alíquotas de 0.5ug foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para análise da qualidade do RNA.

Uma das limitações na utilização de tecido fresco para experimentos de *microarray* é a baixa quantidade de RNA obtido, dependendo do tipo de tecido. Este problema pode ser contornado pela amplificação linear de RNA, que visa o enriquecimento da população de RNA mensageiro, mantendo a diversidade dos transcritos.

O protocolo de amplificação de mRNA (para amostra e referência) baseou-se na metodologia implementada em nosso grupo por GOMES et al. (2003), e modificada por Dr Alex Fiorini de Carvalho. O procedimento está descrito em **Protocolo II**, onde cerca de 3ug de RNA total são utilizados para transcrição reversa na presença de iniciador oligo dT ligado à seqüência do promotor T7 da RNA polimerase, seguido de clivagem de RNA molde e síntese de cDNA dupla fita, para posterior transcrição *in vitro* T7-dependente.

### **3.3 EXPERIMENTOS COM MICROARRANJOS DE cDNA**

#### **3.3.1 Biochip**

O biochip previamente construído por membros do LABRI / LUDWIG sob coordenação do Dr Alex Fiorini de Carvalho utiliza lâminas de vidro silanizadas (Corning) contendo 4800 elementos distribuídos em sua superfície pelo robô Flexys (Genomic Solutions). As seqüências de cDNA representadas neste biochip foram selecionadas à partir de seqüências

ORESTES, geradas pelo Projeto Genoma Humano do Câncer FAPESP/LICR (CAMARGO et al. 2001) - (<http://www.compbio.ludwig.org.br/ORESTES>). A lista dos genes imobilizados no biochip encontra-se disponível online em - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, sob GEO Acession: GPL1930.

Estas seqüências foram selecionadas de acordo com os seguintes critérios: tamanho entre 300 e 800 pares de bases; ausência de seqüência repetitiva; homologia com um único gene no genoma humano (100% de homologia com um gene humano de seqüência conhecida); não mais do que 85% de homologia com nenhuma seqüência do genoma humano em qualquer segmento de 100 pares de base; se localizar mais 3' possível mas sempre 5' em relação ao primeiro sítio de poliadenilação.

Como controles positivos, cDNAs dos genes: Q do fago  $\lambda$ , *Trp*, *DapB*, *ThrB*, *PheB* e *LysA* foram também depositados nos biochips, além de spots com 50% de DMSO, representando controle negativo.

### **3.3.2 Marcação e hibridação**

Os RNAs amplificados provenientes das amostras de nevus, melanomas e RNA referência foram submetidos ao protocolo de marcação indireta, composto por 2 etapas. Na primeira etapa, partindo-se de 3 $\mu$ g de RNA amplificado, procede-se a síntese da primeira fita de cDNA na presença de aminoallyl-dUTP (Sigma), e na segunda etapa procede-se o acoplamento, onde o fluorocromo Alexa Fluor succinimidyl ester 555 ou 647

(Molecular Probes) reage com o cDNA sintetizado, de modo a formar pontes covalentes com os amino-grupos introduzidos no cDNA (**Protocolo III**).

Após purificação em coluna QIAquick (Qiagen), a eficiência da marcação (em pmol- picomoles) foi calculada com base no valor obtido em leitor de Elisa. Essa metodologia foi implementada em nosso laboratório por Anna Coló, Mariana Santos e Dr Alex Fiorini de Carvalho e consiste na relação entre a absorbância obtida em leitor de Elisa e a quantidade do Fluoróforo Alexa incorporado, resultando numa reta para cada fluoróforo, que pode ser representada pelas seguintes equações: para Alexa 555  $y=0,0006x - 0,001$  ( $R^2=0,9986$ ) e para Alexa 647  $y=0,0003x -0,0005$  ( $R^2=0,9977$ ). Atualmente, a quantificação é realizada através do equipamento Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer).

As amostras de cDNA marcadas com os 2 fluoróforos foram misturadas em tampão e hibridadas com um biochip no sistema Gene TAC™ Hybridization Station (**Protocolo IV**).

Para cada amostra estudada foram geradas 02 lâminas, uma principal ou “main” (amostra marcada com Alexa 555, referência marcada com Alexa 647) e a réplica ou “swap” (amostra marcada com Alexa 647 e referência marcada com Alexa 555).

### **3.4 AQUISIÇÃO DAS IMAGENS E ANÁLISE DOS DADOS**

As imagens provenientes das hibridações foram digitalizadas pelo leitor confocal a laser ScannArray Express (Packard BioScience) utilizando

fotomultiplicação (PMT-photomultiplier tube) 60 para os dois canais, e o programa computacional ScanArray foi adotado para captura dos valores de intensidade dos elementos, através de um método que constrói um histograma e utiliza a mediana dos valores dos pixels e percentis de 80 a 95 para o sinal e 5 a 20 para o background. É um método simples, estável e exclui pixels de características extremas do cálculo das intensidades dos elementos e do sinal de fundo (“ruído”).

### **3.4.1 Controle de qualidade dos dados**

Após a quantificação, as tabelas geradas foram depositadas em um banco de dados do Laboratório de Bioinformática do Hospital AC Camargo (<http://www.lbc.ludwig.org.br/arraymanager>) coordenado pela Dra Helena Brentani, a fim de se efetuar o controle de qualidade dos dados gerados.

Num primeiro momento, o valor de ruído local foi subtraído do sinal e a razão canal 2/ canal 1 ( $ch2/ch1$ ) foi calculada, aplicando-se logaritmo na base 2 ( $\log_2$ ). O dado foi normalizado por Lowess (locally weighted scatterplot smothing), que é um método de regressão polinomial local, que permite a correção das variações locais. O dado normalizado por Lowess foi comparado ao dado normalizado por outro método, M dye (ou “self normalization”), através de um MM plot que mostra a correlação entre os dois métodos. O efeito da normalização por Lowess foi verificado por um MAplot e um histograma. O MA Plot é um gráfico de dispersão de todos os elementos da lâmina, que possui o  $\log_2$  da razão de intensidade nos dois

canais ( $\log_2 R/G$ ) plotados no eixo y contra o log da média de intensidade plotado no eixo x.

Ainda, foi feita uma representação gráfica da lâmina, juntamente com o boxplot, que mostra a distribuição do logaritmo da razão de intensidade em cada conjunto de genes (sub-array) correspondente à agulha utilizada, dado que o biochip utilizado no projeto foi confeccionado por um conjunto de 48 agulhas.

Para cada amostra foi avaliada a correlação entre as lâminas principal e réplica, bem como a correspondência das mesmas por análise de agrupamento. A correlação principal-réplica das lâminas foi analisada através do MMplot ( $\log_2$  da razão canal2/ canal1 da lâmina principal plotado no eixo x, e  $\log_2$  da razão canal2/canal1 da lâmina réplica plotado no eixo y) que reflete o grau de correlação linear entre duas variáveis através da correlação de Pearson, calculada pela divisão da covariância dos dois conjuntos de dados pelo produto do desvio padrão de cada série.

### **3.4.2 Análise estatística**

Após a análise de qualidade, os dados foram enviados para o MAIGES (Mathematical Analysis of Interacting Gene Expression Systems - <http://www.maiges.org/lwmoodle/login/>), uma página desenvolvida para interação entre nosso grupo e o grupo do Dr Eduardo Jordão Neves do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo (IME-USP). As análises estatísticas foram realizadas através do programa R

(<http://www.cran.r.project.org/>), e ferramentas do projeto bioconductor (<http://www.bioconductor.org> – GENTLEMAN et al. 2004).

Nesta análise, os valores dos elementos foram subtraídos do valor do respectivo ruído, e considerados apenas elementos com relação sinal/ruído  $>1,05$ . A normalização dos dados foi feita utilizando o método de *Lowess* global, com  $\text{span}=0,4$  e grau 1.

Para agrupamento das amostras, foi construído um cluster hierárquico não-supervisionado (EISEN et al. 1998) método completo, que toma o máximo da distância entre todos os elementos que compõem um grupo. De acordo com o perfil de expressão gênica, as amostras são posicionadas num espaço multi-dimensional, onde cada amostra é representada por um ponto. A distância euclidiana entre os pontos é calculada, e as amostras são agrupadas em estruturas simples (pares), que são então agrupadas com as amostras mais próximas a este par, e assim sucessivamente, permitindo a representação gráfica do agrupamento de modo similar às árvores filogenéticas, considerando que o tamanho do braço de separação é proporcional ao coeficiente de correlação entre as amostras.

Foi também utilizada a ferramenta SOM (Self Organizing Map – TAMAYO et al. 1999) com topologia linear e a metodologia de K-médias (TAVAZOIE et al. 1999), que consistem no agrupamento não-supervisionado das amostras baseado no nível de expressão de todos os genes da lâmina. A análise por SOM também utiliza distância euclidiana e espaço multidimensional, mas ela procura por agrupamento de pontos, e permite a escolha do número de grupos que se deseja obter.

Para identificação dos genes diferencialmente expressos em cada uma das comparações, foram utilizados método paramétrico (estatística t) e não paramétrico (teste de Wilcoxon e bootstrap), para as diferenças de médias, medianas e da estatística t, assumindo um valor de significância  $\leq 0.05$ . O valor de p para cada gene foi corrigido pelo método FDR (False Discovery Rate), como proposto por BENJAMINI e HOCHBERG (1995). A abordagem matemática e estatística para análise desses dados tem sido amplamente discutida na literatura e utilizada com sucesso em nosso grupo (GOMES et al. 2003; MEIRELES et al. 2003; MEIRELES 2003; STOLF 2003; MEIRELES et al. 2004).

### 3.4.3 Módulos Funcionais

A metodologia de módulos funcionais foi descrita por SEGAL et al. (2004) e consistia, para um determinado conjunto de dados de *microarray*, na identificação de grupos de genes relacionados a processos biológicos conhecidos, denominados de módulos, e na caracterização de uma condição biológica como sendo a combinação de ativação ou inibição desses módulos. Baseado na idéia original de Segal, esta metodologia foi implementada em nosso grupo para análise de tumor esofágico e gástrico (GOMES et al. 2005).

Para estudos em lesões melanocíticas, foram selecionados 124 grupos gênicos de interesse, de acordo com anotações disponíveis em bancos de dados públicos como Gene Ontology (<http://www.godatabase.org>) e Gene Deck (<http://www.genecards.org/cgi-bin/GeneDecks>), e cada grupo

foi denominado um módulo funcional. Adicionalmente, agrupamos genes associados ao potencial metastático de melanomas cutâneos (com base em referências bibliográficas disponíveis na literatura) em um grupo funcional que denominamos assinatura metastática. Deste modo, 1418 genes do biochip puderam ser agrupados no total de 125 módulos estudados no projeto. A lista completa dos módulos e genes se encontra disponível no CD anexo e em – <http://www.maiges.org/en/melanoma>

Para cada módulo, e para cada amostra, foi determinada a fração de genes induzidos ou reprimidos. Um gene foi considerado induzido quando a sua expressão foi pelo menos duas vezes maior que a média de expressão de todos os genes do módulo, e reprimido quando sua expressão foi pelo menos duas vezes menor. Para definir o *status* do módulo na amostra, verificamos a quantidade de genes induzidos e reprimidos e testamos a hipótese dessa quantidade se aproximar de uma distribuição hipergeométrica, e a partir desse resultado, foi definido módulo ativo ou reprimido.

O próximo passo foi caracterizar os dois grupos (nevos e melanomas) de acordo com a combinação de módulos ativos ou inibidos. Para cada módulo em cada tecido foi calculada a fração de amostras que estavam ativas ou reprimidas, assim como seu valor de *p*, para identificação dos módulos ativos ou inibidos nos grupos de nevos e de melanomas.

Em cada módulo alterado, foi feito um teste de consistência que caracteriza os genes que tem seu perfil de expressão alterado de forma significativa na maior parte das amostras avaliadas. O *score* (ou pontuação)

é uma medida que indica o quanto um gene específico se alterou no conjunto de amostras, não fazendo distinção entre induzido ou reprimido. Portanto, genes com valores de  $p$  menores que 0,05, e com pontuação alta são considerados genes consistentes do módulo.

#### **3.4.4 Redes de relevância**

A idéia original de BUTTE et al. (2000) foi ligeiramente modificada para busca por pares de genes com valores de correlação linear significativamente alterados entre melanomas e nevos, assumindo um valor de  $p \leq 0.001$ . O coeficiente de correlação entre todos os pares de genes possíveis dentro de um módulo foi calculado, selecionando-se as correlações abaixo do limiar estabelecido. Assim, foram construídas redes de relevância para todos os grupos gênicos utilizados na análise de módulos funcionais. As redes de relevância foram geradas graficamente através dos nós que representam os genes, e as linhas entre os nós representam relações funcionais hipotéticas.

#### **3.4.5 Classificadores**

Neste estudo também foi feita uma busca exaustiva por trios de genes classificadores capazes de distinguir as amostras de nevos e melanomas, dentro dos 125 grupos de genes utilizados na análise de módulos ativos. Os trios de genes foram construídos por três métodos: discriminador linear de Fisher, SVM (support vector machine) e método dos k-vizinhos. O discriminador linear de Fisher tem sido o método mais utilizado em estudos

de nosso grupo (MEIRELES et al. 2004; STOLF et al. 2006), e optamos por utilizar os resultados obtidos por este método.

### **3.5 VALIDAÇÃO DE GENES**

Para etapa de validação de genes, realizamos reações de RT-PCR e/ou imuno-histoquímica.

#### **3.5.1 Reação de seqüenciamento**

Para confirmar a seqüência do fragmento depositado no biochip referente à DSC3, realizamos seqüenciamento do clone ORESTES, como descrito no **Protocolo V**.

#### **3.5.2 Reação de RT-PCR**

Os iniciadores para reação foram desenhados com auxílio do software Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)), e a especificidade avaliada através da ferramenta “in silico PCR” (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>). Foram selecionadas 04 amostras de nevos (32,34,36, e 38) e 04 melanomas primários (49,62,111 e 115) para realização do RT-PCR. Como controle, foram feitas reações para Beta actina.

**Tabela 2** - sequência dos iniciadores para amplificação dos genes DSC3 (A) e CLDN4 (B).

**A1 - DSC3 – amplicon (285pb, e 242bp)**

	Seqüência	Tamanho	TM	%GC
FORWARD	5' AATGGAGGGCAGGAAACC 3'	18	59,86	55,56%
REVERSE	5' GCAGCAGCCCACAGAAC 3'	17	59	64,71%

**A2 – DSC3 – amplicon (103pb, e 60pb)**

	Seqüência	Tamanho	TM	%GC
FORWARD	5' CAACCCCGTCTCGGTGAA 3'	18	57,4	61,1%
REVERSE	5' GGATGGCATGCGGTCTTC 3'	18	56,6	61,1%

**B - CLDN4 – amplicon (228pb)**

	Seqüência	Tamanho	TM	%GC
FORWARD	5' CATCGTGGCTGCTCTGG 3'	17	60,08	64,71%
REVERSE	5' AGCGAGGCACCCATCTC 3'	17	59,88	64,71%

### 3.5.3 Microdissecção a laser de nevos emblocados em parafina

Esta etapa foi realizada em colaboração com Dra Renata Coudry, do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo, sendo todos os procedimentos (**protocolo VII**) feitos em condições livres de RNAses.

As reações de RT das amostras foram realizadas como descrito no item 3.5.1, utilizando a massa total obtida para cada amostra, e o RT-PCR foi feito com 40 ciclos de amplificação. Novos iniciadores foram desenhados no software Primer Express (Applied Biosystems), de modo a produzir amplicons menores, com tamanho de 60 ou 103pb (de acordo com a isoforma), uma vez que o RNA obtido de amostras parafinadas não apresenta alta qualidade.

### 3.5.4 Reações de imuno-histoquímica

Esta etapa foi realizada por Suely Nonogaki, colaboradora do Centro de Pesquisas do Hospital AC Camargo, e José Ivanildo Neves, do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo. Foram feitos cortes de 3µm de material fixado em formalina tamponada e incluída em parafina em lâminas revestidas (Superfrost Plus, Easy Path). Após a desparafinização em xilol e hidratação em banhos seriados de etanol, as lâminas foram tratadas em tampão citrato 10mM pH6,0 em panela de pressão para recuperação antigênica. Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, e após lavagem em água destilada e PBS, os cortes foram incubados com anticorpos primários diluídos em títulos pré-estabelecidos, em tampão PBS com BSA 1% e azida sódica 0,1% por 30 minutos a 37°C e 18 horas a 4°C em câmara úmida. Os anticorpos utilizados, sua diluição e controles estão listados na Tabela 2.

Após lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas com diferentes kits de amplificação e cromógenos de revelação, sendo montadas com lamínulas em meio apropriado para cada sistema (Tabela 3).

Cada anticorpo foi testado em 06 nevos e 06 melanomas, acompanhado do controle negativo (BSA) e seu controle positivo.

**Tabela 3 - Painel de anticorpos utilizados.**

Anticorpos	Clones	Fabricantes	Diluições	Controles positivos	Kit amplificação
Citoqueratina de alto peso molecular	34 $\beta$ E12	Dako, Carpinteria, EUA, código M0630	1/400 1/800	Pele	B
Citoqueratina de baixo peso molecular	35 $\beta$ H11	DakoCytomation, Carpinteria, EUA, código M0631	1/200 1/400	Fígado	B
Pan citoqueratina	AE1AE3	DakoCytomation, Carpinteria, EUA, código M3515	1/2000 1/4000 1/8000	Carcinoma	B
Claudina 01	Policlonal feito em coelho	ZYMED, San Francisco, EUA, código 51-9000	1/500 1/1000	Pele	B
Claudina 03	Policlonal feito em coelho	NeoMarkers, Fremont CA, EUA Cod. RB-9251	1/500	Intestino	C
Claudina 04	Policlonal feito em coelho	NeoMarkers, Fremont, EUA, código Rb9266P1	1/200 1/50	Tonsila	A E D B
Claudina 04	Policlonal feito em coelho	Affinity Bioreagents, Golden. EUA, código PA1-20906	1/100 1/200 1/400	Tonsila	A
Claudina 05	Policlonal feito em coelho	NeoMarkers, Fremont CA, USA Cod. RB-9243	1/1000	Colon	C
Claudina 07	Policlonal	ZYMED, San Francisco, EUA, código 18-7378	1/800	Colon	C
Claudina 11		NeoMarkers, Fremont CA, USA Cod. RB-9283	1/800	Testículo	C
Desmocolina 3	DSC3-U114	Biodesign, Saco, EUA, código H44350M	Pronto para uso, 1/2 1/4	Pele	A E F D B
Kalikreina 3			1/6000		D
Kalikreina 6	Policlonal feito em cabra	R & D, Minneapolis, EUA, código AF2008	1/80	Pele	D A
Kalikreina7 (H50)	Policlonal feito em coelho	Santa Cruz, Santa Cruz, EUA, código 20625	1/500	Ovário	E
Keratina 5	XM26 obtido em camundongo	NeoMarkers, Fremont CA, USA Cod. MS-1896	1/100	Próstata	C
Melan A	A103	DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca, código M7196	1/300	Melanoma	B
Melanosoma	HMB45	DakoCytomation, Carpinteria, EUA, código M0634	1/200	Melanoma	E
Microphthalmia transcription factor (MITF)	34CA5	Novocastra, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido, código NCL-MITF	1/50	Melanoma	B
Receptor de leptina	52263-11	R & D, Minneapolis, EUA, código MAB867	1/100	Cérebro	A
Vimentina	Vim 3B4	DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca, código M7020	1/2000	Carcinoma	B

**Tabela 4 - Sistemas de amplificação e cromógenos de detecção.**

	<b>Kits de amplificação</b>	<b>Cromógenos</b>	<b>Coloração observada</b>	<b>Meios de montagem</b>
A	StreptABC / HRP, Duet mouse / rabbit, DakoCytomation, código K0492, Glostrup, Dinamarca	DAB (3, 3" Diaminobenzidine Tetrahydrochloride), Sigma, código D-5637, St Louis, EUA - 60mg% + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DMSO por 5 min a 37°C	Marron dourado	Entellan Neu Merck, Darmstadt, código 1.07961, Alemanha
B	NovoLink Max polymer / HRP, Visionsystems, código RE7260-K Reino Unido	DAB (3, 3" Diaminobenzidine Tetrahydrochloride), Sigma, código D-5637, St Louis, EUA - 60mg% + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DMSO por 5 min a 37°C	Marron dourado	Entellan Neu Merck, Darmstadt, código 1.07961, Alemanha
C	NovoLink Max polymer / HRP, NovoCastr, código RE7260-K Reino Unido	DAB (3, 3" Diaminobenzidine Tetrahydrochloride), DakoCytomation Liquid DAB+ Substrate Chromogen System - DAKO	Marron dourado	Entellan Neu Merck, Darmstadt, código 1.07961, Alemanha
D	LSAB+ System – AP, Dakocytomation K0689, Carpinteria, EUA	Naftol - 2mg Napthol-As-mx-phosphate, 0,2mL N,N-dimetil-formamida, 9,8mL Tris HCl [100mM] pH8,5, 3mg tetramisole hydrochloride, 2mg Fast Blue BB salt hemi (zinc chloride) salt. Preparado no momento do uso e incubado por 20 min	Azul	Aquatex, Merck, Darmstadt, código 1.08562, Alemanha
E	Envision+ System AP mouse / rabbit – Dako, K4018, Carpinteria, EUA	Fast Red Substrate System, DakoCytomation código K0699, Carpinteria, EUA - conforme as instruções do fabricante e incubado por 20 min	Rosa púrpura	Crystal Mount, Biomeda, código M03, Foster City, EUA
F	Envision+ System AP mouse / rabbit – Dako, K4018, Carpinteria, EUA	Naftol - 2mg Napthol-As-mx-phosphate, 0,2mL N,N-dimetil-formamida, 9,8mL Tris HCl [100mM] pH8,5, 3mg tetramisole hydrochloride, 2mg Fast Blue BB salt hemi (zinc chloride) salt. Preparado no momento do uso e incubado por 20 min	Azul	Aquatex, Merck, Darmstadt, código 1.08562, Alemanha

### 3.6 Isolamento e caracterização de células de prepúcio humano

O procedimento para isolamento de queratinócitos e fibroblastos foi implementado em nosso laboratório com auxílio do Dr Enrique Boccardo, do Laboratório de Virologia do Instituto Ludwig, baseado em WILSON et al. (1992). O procedimento está descrito em **Protocolo VIII**.

### 3.7 Construção dos equivalentes de pele

As culturas primárias de queratinócitos e fibroblastos, assim como a linhagem celular de melanoma (Mewo) foram utilizadas para construção de equivalentes de pele, seguindo **protocolo IX**.

#### Protocolo I

##### Extração de RNA (Rneasy Midi kit – Qiagen)

- Colocar o tecido em uma placa de Petri;
- Colocar 1 mL de tampão RLT- $\beta$ -mercaptoetanol sobre o tecido;
- Fragmentar o tecido com auxílio de um bisturi;
- Transferir para um tubo adequado para politronização;
- Adicionar mais 1 mL de tampão RLT- $\beta$ -mercaptoetanol;
- Triturar com homogenizador (Polytron®, Kinematica AG, Switzerland);
- Congelar em freezer -80°C;
- Descongelar a amostra no gelo;
- Incubar 37°C por 20 minutos;
- Centrifugar o lisado por 10 minutos a 5.000xg, 25°C;
- Transferir sobrenadante para tubo Falcon 15mL;

- Adicionar 1x volume (2mL) de Etanol 70% ao lisado, vortexando;
- Aplicar na coluna;
- Centrifugar por 5 minutos a 5.000xg, 25°C;
- Reaplicar o lisado à coluna;
- Centrifugar por 5 minutos a 5.000xg, 25°C;
- Adicionar 4mL de tampão RWI à coluna;
- Centrifugar por 5 minutos a 5.000xg, 25°C;
- Adicionar 2,5mL de tampão RPE à coluna;
- Centrifugar por 5 minutos a 5.000xg, 25°C;
- Adicionar outros 2,5mL de tampão RPE à coluna;
- Centrifugar por 5 minutos a 5.000xg, 25°C;
- Transferir coluna para novo tubo;
- Aplicar 150µL de água livre de Rnase;
- Esperar 1 minuto e centrifugar por 3 minutos a 5.000xg, 25°C;
- Coletar o volume eluído e re-aplicar na coluna;
- Esperar 1 minuto e centrifugar por 3 minutos a 5.000xg, 25°C;
- Coletar o volume eluído e concentrar em *speed-vac*, até atingir cerca de 30µL;
- Quantificar em espectrofotômetro.

**Protocolo II****Amplificação de RNA****◆ Síntese da primeira fita de cDNA**

- Colocar no tubo de reação:

3 $\mu$ g RNA total (6,7 $\mu$ L)

500ng oligo dT(24)-T7 primer- (1 $\mu$ L [0,5 $\mu$ g/ $\mu$ L])

- Desnaturar a 70°C por 10 minutos

- Adicionar:

4 $\mu$ L Impron First Strand buffer [5x] para [Final = 1x];

4,8 $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> [25mM] para [Final = 6mM];

0,5 $\mu$ L RnaseIN (Promega) [40u/ $\mu$ L] para [Final =20U];

2 $\mu$ L dNTP mix [10mM] para [Final = 1mM];

1 $\mu$ L Impron II Reverse Transcriptase (Promega).

- Incubar 42°C por 2 horas

**◆ Síntese da segunda fita de cDNA**

- Adicionar ao produto da reação:

16,9 $\mu$ L água tratada com DEPC;

10 $\mu$ L 2nd strand buffer [5x] para [Final = 1x];

1 $\mu$ L dNTP mix [10mM] para [Final = 0,2mM];

0,3 $\mu$ L RNase H [2U/ $\mu$ L] para [Final = 0,6u];

0,5 $\mu$ L *E. coli* DNA Ligase [10U/ $\mu$ L] para [Final = 5u];

1,3 $\mu$ L *E. coli* DNA Polymerase [10U/ $\mu$ L] para [Final = 13u];

- Incubar 16°C por 2 horas;
- Adicionar 1 $\mu$ L T4 DNA Pol [5U/ $\mu$ L] para [Final = 5u];
- Incubar 16°C por 10 minutos.

#### ◆ Purificação e precipitação do cDNA dupla-fita

- Adicionar ao produto da reação:  
102 $\mu$ L água DEPC;  
152 $\mu$ L fenol pH8,0/ clorofórmio/ álcool isoamílico [25:24:01].
- Homogenizar por inversão e centrifugar 20.000xg por 5 minutos;
- Coletar o sobrenadante e adicionar 152 $\mu$ L clorofórmio/álcool isoamílico [24:01];
- Homogenizar por inversão e centrifugar 20000xg por 5 minutos;
- Coletar o sobrenadante e adicionar:  
1 $\mu$ L acrilamida [5mg/mL] para [Final = 5 $\mu$ g];  
0,5x volume Acetato de Amônia [7,5M];  
2,5x volumes Etanol 100% gelado.
- Incubar em freezer -20°C por pelo menos 1 hora;
- Centrifugar 20.000xg por 30 minutos a 4°C;
- Desprezar o sobrenadante e lavar pellet com 1,5mL de Etanol 75%;
- Centrifugar 8.000xg por 8 minutos a 4°C;
- Repetir a lavagem mais 02 vezes;

- Secar o pellet e ressuspender em 10 $\mu$ L de água DEPC.
  
- ◆ **Transcrição *in vitro* (Kit RiboMAX – Promega)**
- Colocar no tubo de reação:
  - 10 $\mu$ L cDNA dupla-fita resultante da etapa anterior;
  - 7,5 $\mu$ L rNTP mix [25mM] para [Final = 7,5mM];
  - 5 $\mu$ L tampão de reação [5x] para [Final = 1x];
  - 2,5 $\mu$ L mix de enzima.
- Incubar por 6 horas a 37°C;
  
- ◆ **Purificação do aRNA**
- Adicionar 0,5mL de Trizol (Invitrogen) a cada tubo de transcrição;
- Incubar 5 minutos em temperatura ambiente;
- Adicionar 100 $\mu$ L de clorofórmio, vortexar por 15 segundos;
- Incubar 3 minutos em temperatura ambiente;
- Centrifugar 20.000xg por 30 minutos a 4°C;
- Transferir a fase aquosa para novo tubo e adicionar 250 $\mu$ L de isopropanol;
- Incubar 4°C por 15 minutos;
- Centrifugar 20.000xg por 30 minutos a 4°C;
- Lavar pellet com 1,5mL de Etanol 70%;
- Centrifugar 8.000xg por 10 minutos a 4°C;
- Repetir a lavagem mais 02 vezes;

- Secar o pellet e ressuspender em 10-20 $\mu$ L de água DEPC (dependendo do tamanho do pellet);
- Quantificar em espectrofotômetro;
- Verificar qualidade do aRNA por eletroforese em gel de agarose.

### Protocolo III

#### Marcação indireta de cDNA

##### ♦ Síntese do cDNA marcado com aminoallyl dUTP

- Colocar no tubo de reação:
  - 3 $\mu$ g aRNA (9,8 $\mu$ L);
  - 2 $\mu$ L random hexamers primers [5 $\mu$ g/ $\mu$ L] para [Final = 10 $\mu$ g];
  - 1 $\mu$ L RNA controle \*.
- Incubar a 70°C por 10 minutos.
- Adicionar:
  - 6 $\mu$ L Impron First Strand buffer [5x] para [Final = 1x];
  - 7,2 $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> [25mM] para [Final = 6mM];
  - 2 $\mu$ L mix de dNTP\*\*;
  - 0,5  $\mu$ L RnasIN [40U/ $\mu$ L] para [Final = 20U];
  - 1,5 $\mu$ L Impron II RT (Promega).
- Incubar 42°C por 2 horas.
- Adicionar:

15 $\mu$ L NaOH [1M];

01 $\mu$ L EDTA [0,5M].

- Incubar a 70°C por 10 minutos;
- Adicionar:  
15 $\mu$ L HCl [1M].

◆ **Precipitação do cDNA e acoplamento**

- Adicionar ao produto da reação:  
6 $\mu$ L Acetato de sódio [3M] (1/10 volume);  
1 $\mu$ L glicogênio [20 $\mu$ g/ $\mu$ L] para [Final = 20 $\mu$ g];  
150 $\mu$ L Etanol 100% gelado (2,5x o volume).
- Incubar *overnight*;
- Centrifugar 20.000xg por 30 minutos a 4°C;
- Desprezar o sobrenadante e lavar pellet com 1,5mL de Etanol 70%;
- Centrifugar 8.000xg por 5 minutos a 4°C;
- Repetir a lavagem mais 02 vezes;
- Secar o pellet e ressuspender em 08 $\mu$ L de tampão de acoplamento [1,25x] \*\*\*;
- Adicionar 4 $\mu$ L de DMSO ao tubo de Alexa dye (Molecular Probes) e vortexar por 15 segundos;
- Aliquotar 2 $\mu$ L de Alexa dye (Molecular Probes/ Invitrogen) a cada tubo;
- Incubar por 2 horas a temperatura ambiente, protegido da luz.

◆ **Purificação da reação (Qiaquick PCR Purification Kit)**

- Para cada tubo de reação, adicionar:  
40 $\mu$ L acetato de sódio [100mM] pH5.2 para [Final = 7,3mM];  
500 $\mu$ L PB binding buffer.
- Aplicar na coluna e centrifugar 18.000xg por um minuto;
- Re-aplicar o volume na coluna e centrifugar novamente;
- Adicionar 750 $\mu$ L de Etanol 80% e centrifugar 18000xg por um minuto;
- Adicionar outros 750 $\mu$ L de Etanol 80% e centrifugar 18.000xg por um minuto;
- Desprezar o líquido e centrifugar a coluna 18.000xg por um minuto;
- Transferir a coluna em novo tubo e adicionar 50 $\mu$ L de água pH 7-8, pré-aquecida a 70°C;
- Aguardar 2 minutos e centrifugar 18.000xg por um minuto;
- Repetir a eluição com outros 50 $\mu$ L de água pH 7-8, pré-aquecida a 70°C;
- Verificar a quantidade de fluoróforo em leitor de Elisa;

\*RNA controle (quantidades referentes a 1 $\mu$ L):

4,5 ng gene Q do fago  $\lambda$ ;

3 ng gene trp (clone de *B. subtilis*);

1,5 ng gene dapB (clone de *B. subtilis*);

0,3 ng gene thrB (clone de *B. subtilis*);

0,15 ng gene pheB (clone de *B. subtilis*);

0,03 ng gene *lysA* (clone de *B. subtilis*);

\*\*dNTP mix:

5mM dATP;

5mM dCTP;

5mM dGTP;

2mM dTTP;

3mM Aminoallyl dUTP;

\*\*\* Tampão de acoplamento:

Tampão bicarbonato de sódio 0.065M (pH 9.0).

## Protocolo IV

### Pré-hibridação, hibridação e lavagem das lâminas

#### ◆ Pré-hibridação

- Incubar a lâmina *overnight* em cerca de 40mL de solução 5x SSC, 0.2% SDS, 1% BSA, 5x Denhardt's (filtrada em membrana 0.22 ou 0.45  $\mu\text{m}$ ).

#### ◆ Hibridação

- Misturar os cDNAs marcados com Alexa 555 e Alexa 647;
- Adicionar 2 $\mu\text{L}$  polyA DNA [2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ];
- Adicionar 2 $\mu\text{L}$  Cot1 DNA [2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ];

- Secar em *Speed vac*;
  - Ressuspender em 100 $\mu$ L de solução 5x SSC, 0.1% SDS, 5x Denhardt's, 40% formamida, 0,1mg/mL DNA de esperma de salmão;
  - Desnaturar por 5 minutos a 95°C;
  - Manter aquecido a 70°C;
  - Hibridar com um biochip no sistema Gene TAC™ Hybridization Station (Genomic Solutions, Inc – Ann Arbor, MI) por cerca de 16 horas a 42°C.
- ◆ **Lavagem**
- Lavar 2 vezes em tampão 2x SSC, por 8 minutos;
  - Lavar 2 vezes em tampão 0,1x SSC, 0.1% SDS, por 10 minutos;
  - Lavar 2 vezes em tampão 0,1x SSC, por 5 minutos.

#### **Protocolo V**

- Crescer o clone bacteriano ORESTES RC2-BN0127-011-A08 em meio de cultura LB (Luria-Bertani) com ampicilina;
- Extrair o DNA plasmidial, com o kit Wizard Plus- Miniprep DNA Purification System (Promega), seguindo especificações do fabricante;
- Preparar a reação em volume final de 10 $\mu$ L composta por:  
200ng de DNA plasmidial:  
5 picomoles de iniciador universal M13 *forward*;  
1 $\mu$ L do reagente ABI Big Dye Terminator cycle sequencing kit v3.1;

0.5 $\mu$ L tampão 5x.

- Submeter a reação à 95°C por 1 ½ minuto, seguido de 35 ciclos de 95°C por 18 segundos, 55°C por 12 segundos e 60°C por quatro minutos.
- Precipitar em 4x volume de Isopropanol 65%, lavar em Etanol 60% e secar.
- Ressuspender em formamida, desnaturar e aplicar em seqüenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

## Protocolo VI

### ◆ RT

- Colocar no tubo de reação:
  - 1 $\mu$ g RNA total (4 $\mu$ L);
  - 500ng oligo (dT)15 primer (1 $\mu$ L [0,5 $\mu$ g/ $\mu$ L] - Promega);
- Desnaturar a 70°C por 10 minutos, esfriar em gelo;
- Adicionar:
  - 4 $\mu$ L Impron First Strand buffer [5x] para [Final = 1x];
  - 2,4 $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> [25mM] para [Final = 3mM];
  - 6,1 $\mu$ L água DEPC;
  - 0,5 $\mu$ L RNaseIN (Promega) [40u/ $\mu$ L] para [Final =20U];
  - 1 $\mu$ L dNTP mix [10mM] para [Final = 0,5mM];
  - 1 $\mu$ L Impron II Reverse Transcriptase (Promega).
- Incubar 25°C por 15 minutos, 42°C por 1hora, 70°C por 15 minutos.

◆ **RT-PCR**

- Aliquotar 1 $\mu$ L do produto de RT em cada tubo;
- Adicionar:
  - 2 $\mu$ L tampão Taq [10x] para [Final= 1x];
  - 0,6 $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> [50mM] para [Final= 1,5mM];
  - 0,4 $\mu$ L dNTP mix [10mM] para [Final = 0,2mM];
  - 0,4 $\mu$ L primer Forward [10 $\mu$ M] para [Final = 0,2 $\mu$ M];
  - 0,4 $\mu$ L primer Reverse [10 $\mu$ M] para [Final= 0,2 $\mu$ M];
  - 0,2 $\mu$ L Taq DNA polimerase [5U/ $\mu$ L] para [Final= 1U].
- Incubar em termociclador, sob condições padronizadas para cada gene a ser amplificado;
- Verificar amplificação em gel de poliacrilamida 8% e agarose 1% ou agarose NuSieve GTG (Cambrex) 3,5%, de acordo com o tamanho do amplicon.

**Protocolo VII**

- Preparar cortes de 5 $\mu$ m do material no centro da lâmina
- Corar a lâmina com Hematoxilina/ Eosina
- Proceder a captura a laser no sistema Pixcell Laser Capture *Microdissection System (Arcturus Systems for Microgenomics)* sobre os seguintes parâmetros: Power: 70mW, Duration: 4,00ms, Target:0.070, Spot size: 15 $\mu$ m.

- Extrair o RNA das amostras microdissecadas utilizando o kit Paradise™ Reagent System (Arcturus), seguindo especificações do fabricante.

### **Protocolo VIII**

- Coletar prepúcio imediatamente após a cirurgia em meio DMEM com 10% SFB (soro fetal bovino) contendo ciprofloxacina [5µg/mL] e anfotericina [1µg/mL];
- Em placa de Petri, coletar epiderme, removendo tecido adiposo e derme;
- Fragmentar a epiderme e incubar com 10mL de Tripsina-EDTA [0,3%: 0,020% em meio Hanks] por 45 minutos, 37°C, sob agitação;
- Filtrar em papel filtro e neutralizar com 1x volume de PBS 10% SFB;
- Centrifugar 5 minutos, desprezar sobrenadante;
- Resuspender em 10mL de meio de queratinócito (KSFM- Invitrogen) com ciprofloxacina [5µg/mL] e anfotericina [1µg/mL];
- Cultivar células em 5% CO<sub>2</sub>, 37°C;

Uma vez estabelecida a cultura primária de queratinócitos, fibroblastos contaminantes foram isolados através de cultivo em meio DMEM 10% SFB, que promoveu diferenciação de queratinócitos e favoreceu o cultivo dos fibroblastos.

Para confirmação do tipo celular isolado,  $2 \times 10^4$  células foram crescidas por 24 horas no sistema Lab-Tek (Nalg Nunk) com 08 câmaras seguida de lavagem em PBS, fixação em formol 10% tamponado e posterior lavagem em PBS, para análise imuno-histoquímica com anticorpo para

citoceratinas e vimentina, que são marcadores de queratinócitos e fibroblastos, respectivamente.

### Protocolo IX

- Preparar matriz de colágeno composto (cada matriz) de 525  $\mu\text{L}$  colágeno (BD 40236), 75 $\mu\text{L}$  meio F12 [10x] e 75 $\mu\text{L}$  tampão de reconstituição [10x] \*;
- Em cada matriz adicionar  $10^5$  fibroblastos ressuspensos em 75 $\mu\text{L}$  SFB;
- Distribuir sobre poço na placa (24 poços, Corning 3526) e deixar solidificando por 45 minutos;
- Adicionar 1mL de meio pra ED \*\*, e armazenar em estufa 37°C, 5%CO<sub>2</sub>;
- No dia seguinte, aspirar o meio e semear  $10^5$  queratinócitos (com ou sem  $2 \times 10^4$  células de melanoma) em 0,5mL de KSFM;
- Adicionar 0,5mL de meio para ED e incubar em estufa *overnight*;
- Soltar o equivalente dérmico do poço, e esperar cerca de 3 horas, ou até que o ED esteja retraído;
- Transferir para gradinhas de metal colocados em poços de placa Nunclon™ $\Delta$  surface (Nunc);
- Adicionar 3 mL de meio para ED, de modo a formar interface líquido-ar;
- Trocar o meio a cada 48horas, e fixar o ED em formol 10% tamponado após 10 dias;

- Emblocar em parafina e fazer cortes histológicos para H/E e imuno-histoquímica.

\* Tampão de reconstituição [10x] = 2,2% NaHCO<sub>3</sub>, 0,05M NaOH, 200mM HEPES buffer;

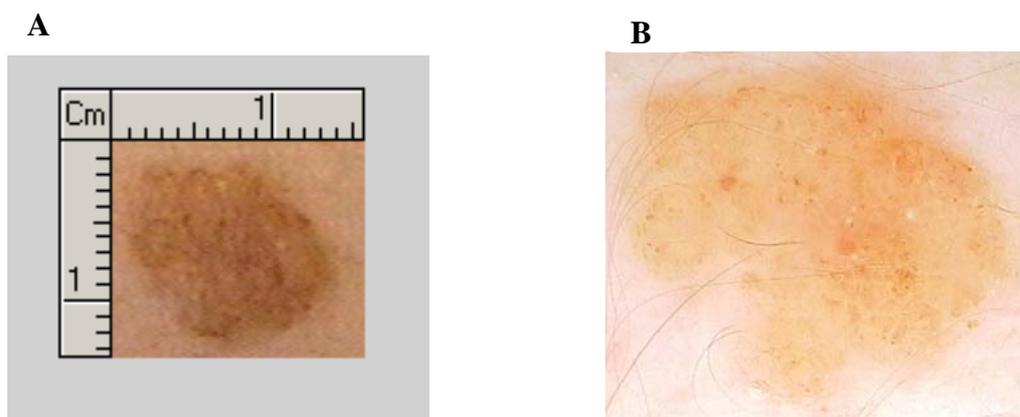
\*\* Solução DMEM / F12 (3:1) suplementado com 0,1nM toxina colérica, 5µg/mL insulina, 5µg/mL apo-Transferrina, 0,4µg/mL hidrocortisona e 0,5ng/mL EGF (epidermal growth factor).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CASUÍSTICA

A casuística de nevos foi constituída por 23 amostras, sendo 18 intradérmicos, dentre estes 10 de padrão adquirido e 08 de padrão congênito, e 05 nevos compostos, dentre estes 04 de padrão adquirido e 01 de padrão congênito.

Importante salientar que somente entraram neste projeto lesões névicas de aspecto benigno (Figura 3A), que em procedimento rotineiro não seriam excisados, em função de suas características clínicas e dermatoscópicas de nevo composto ou intradérmico benigno, sem qualquer suspeita de alteração e/ou malignidade. Clinicamente, se caracterizavam como lesões estáveis, homogêneas, simétricas, com bordas regulares e presença de uma única cor. E dermatoscopicamente eram lesões homogêneas, com rede pigmentar regular, cor única, e ausência de estruturas indicadoras de malignidade (Figura 3B). Considerando que a dermatoscopia proporcione uma acurácia diagnóstica próxima de 90% (BLUM et al. 2003), obviamente associada à experiência do observador e ao bom emprego e treinamento dos critérios dermatoscópicos, este procedimento foi aprovado pelo comitê de Ética da Instituição (CEP 560/03 – 09.12.2003).



**Legenda** – **A**- Macrofoto de nevo intradérmico de aspecto benigno, com dimensão 1,3cm x 1,2cm. **B** – Dermafoto da mesma lesão, mostrando os caracteres dermatoscópicos.

**Figura 3** - Macrofoto e dermafoto de nevo intradérmico.

A casuística de melanomas primários foi constituída por 18 amostras, sendo 07 casos do tipo acral lentiginoso, 06 extensivo superficial, 02 nodular, 01 lentigo maligno e 02 não-classificáveis. Os RNAs amplificados de melanomas primários foram gentilmente cedidos por Waleska K Martins.

Os dados clínicos de nevos e melanomas estão representados nas Tabelas 4 e 5. As amostras de nevos foram provenientes de pacientes com uma média de idade de 40 anos (18-68), em sua maioria mulheres (78%), com predominância de brancos de tipo de pele II. Já os melanomas foram provenientes de pacientes mais velhos, com média de idade de 65 anos (41-94), sem predominância de sexo, em sua maioria brancos, e 50% dos pacientes com histórico pessoal de melanoma.

Amostras de nevos e melanomas foram dissecadas manualmente, e este procedimento permitiu retirar áreas de tecido normal das amostras, bem como descartar regiões com extensos infiltrados linfocitários ou necrose. A contaminação estimada foi de cerca de 30% e, dado que a porcentagem de

contaminação (epiderme, derme, anexos) entre as amostras é similar, acreditamos que ela introduz um erro pequeno e consistente em todas as amostras, de modo a não influenciar a qualidade dos dados.

## **4.2 EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE RNA**

Os RNAs extraídos das amostras apresentaram rendimento médio de 8,4 $\mu$ g e qualidade adequada (razão 28S/18S  $\geq$  1), conforme pode ser visualizada na foto proveniente de eletroforese em gel de agarose de algumas amostras (Figura 4), assim como RNAs das 05 linhagens de melanoma humano componentes do RNA referência (Figura 5).

O perfil de alguns RNAs amplificados pode ser visualizado na Figura 6 onde se observa um rastro na região que corresponde de 260 a 2.000 pb, que caracteriza um bom perfil de amplificação. Esta etapa apresentou um enriquecimento da população de RNA mensageiro de 66 a 354 vezes.

**Tabela 5 - Dados clínicos dos nevus.**

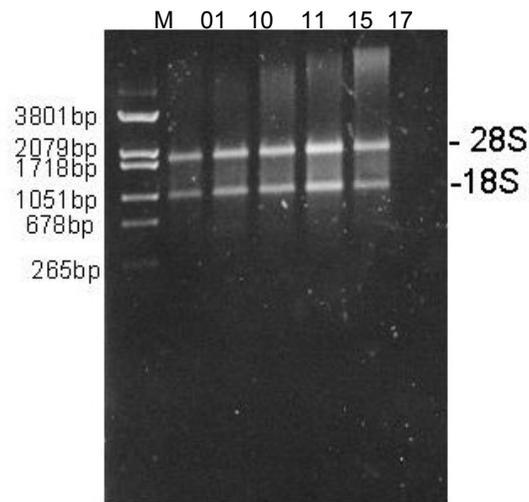
AMOSTRA	LAUDO AP AI-Adquirido Intradérmico AC-Adquirido Composto CI-Congênito Intradérmico CC-Congênito Composto	Localização da lesão em área exposta ao sol ??	IDADE	SEXO	TIPO DE PELE Segundo Fitzpatrick	Cor de Pele	Uso Protetor Solar	Presença de nevus múltiplos	Presença de nevo atípico	Antecedente de melanoma pessoal ou Familiar
NEVO 01	AI	S	31	F	3	Branca	S			
NEVO 02	AC	N	36	F	2	Branca	S			
NEVO 05	AC	N	31	F	2	Branca	S	N	N	F
NEVO 06	AI	N	34	F	2	Branca	N	N	S	P
NEVO 10	AI	N	22	F	1	Branca	S	N	S	
NEVO 11	CI	N	45	F	2	Branca	N	N	N	
NEVO 13	CI	N	43	F	2	Branca	S	N	N	P/F
NEVO 15	AI	S	58	F	2	Branca	S	N	N	
NEVO 17	AI	S	35	F	2	Branca	S	N	N	
NEVO 22	CC	S	45	M	2	Branca	S	S	S	P
NEVO 23	AI	N	18	F	2	Branca	S	S	N	
NEVO 24	AI	S	28	F	2	Branca	S	S	S	
NEVO 25	AC	S	47	F	4	Parda	S	N	N	
NEVO 27	CI	S	60	F	2	Branca	S	N	S	
NEVO 29	AI	S	56	M	2	Branca	S	N	N	
NEVO 30	AC	N	27	F	2	Branca	S	S	S	
NEVO 31	CI	S	48	F	4	Parda	N	N	N	
NEVO 32	CI	S	68	M	3	Branca	S			
NEVO 34	CI	S	37	F	2	Branca	S	N	N	
NEVO 35	CI	N	27	M	3	Branca	S			
NEVO 36	AI	S	30	F	1	Branca	S	N	N	
NEVO 37	AI	S	53	F	3	Branca	S	N	N	P
NEVO 38	CI	S	47	M	3	Branca	S			

**Tabela 6 - Dados clínicos dos melanomas.**

AMOSTRA	SEXO M- Masculino F- Feminino	IDADE	Cor de pele B-Branco NB- Não branco	Tipo de pele A- I ou II B-Outros	Tipo histológico ES:Extensivo superficial N:Nodular AL:Acral lentiginoso NC:Não-classificável O: Outro	Estadiamento da amostra 1:IA 2:IB 3:IIA 4:IIB 5:IIC 6:IIIA 7:IIIB 8:IIIC 9:IV	Classificação da profundidade - Breslow 1:<=0 1,0 2:1,01- 2,0 3:2,01-4,0 4:>4,0	Classificação da profundidade - Nível de Clark 1:I 2:II 3:III 4:IV 5:V
MEL14	F	69	B		AL	8	4	5
MEL19	M	64	B	A	ES	6	3	3
MEL20	F	73	B	B	ES	7	3	4
MEL38	M	65	B	B	ES	6	4	3
MEL49	F	86	B	B	AL	8	4	5
MEL51	F	59	NB	B	AL	5	4	4
MEL54	M	58	B	B	N	9	4	3
MEL55	F	94	B		ES	4	3	2
MEL62	M	41	B	A	ES	5	4	4
MEL64	F	76	B		AL	4	3	5
MEL71	M	46	B	A	ES	2	2	3
MEL72	F	61	NB	B	O	7	4	5
MEL100	M	59	B	B	N	7	4	5
MEL103	M	50	NB	B	AL	7	4	4
MEL111	M	67	B	B	ES	3	3	5
MEL115	F	76	B	B	AL	3	3	4
MEL119	M	53			NC	5	4	4
MEL887	M	77	B		NC	9	4	4

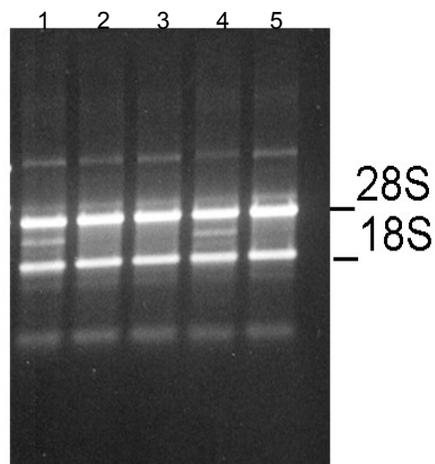
Cont/. Tabela 5

AMOSTRA	Nevo pré-existente S- sim N- não	Localização do tumor 1: Área exposta ao sol 2: Área não-exposta 3: Sítio acral	Antecedente de melanoma P- pessoal	Presença de nevo atípico S- sim N- não	Presença de nevo múltiplo S- sim N- não	Queimadura solar 1:Infância 2:Idade Adulta 3:Ambos 4:Não
MEL14	N	3	P			3
MEL19	S	2		N	S	1
MEL20	N	2				
MEL38	N	2		N	N	4
MEL49	N	3	P	N		2
MEL51	N	1		N	N	4
MEL54	N	2	P	N	N	4
MEL55	N	2	P			
MEL62	N	2	P	N	S	1
MEL64	N	3				
MEL71	N	2	P			
MEL72	N	3				
MEL100	N	1		N	N	1
MEL103	N	3	P	N	N	
MEL111	N	1	P	N	N	4
MEL115	N	3		N	N	4
MEL119	N	2				
MEL887	N	1	P			



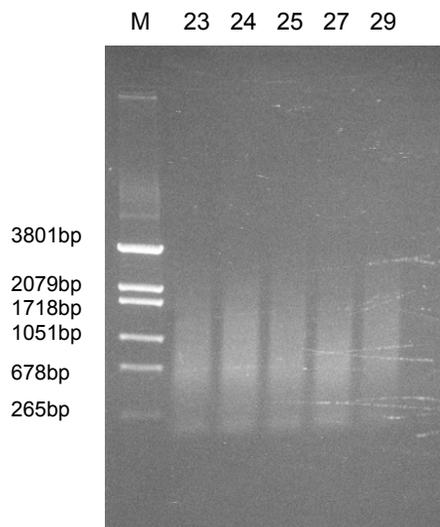
**Legenda:** Eletroforese em gel de agarose 1% dos RNAs extraídos das amostras de nevos 01,10,11,15 e 17. Foram aplicados 0.5ug de cada amostra, e *Pel/HindIII* foi utilizado como marcador de peso molecular.

**Figura 4** - Perfil eletroforético do RNA total de nevos.



**Legenda** - Eletroforese em gel de agarose 1% dos RNAs extraídos das linhagens celulares de melanoma humano. 1- SKMel 05, 2- SKMel 19, 3-SKMel 28, 4- SKMel 37, 5- SKMel 188. Foram aplicados 0.5ug de cada amostra.

**Figura 5** - Perfil eletroforético dos RNAs componentes do RNA Referência



**Legenda:** Eletroforese em gel de agarose 1% dos RNAs amplificados das amostras de nevos 23,24,25,27 e 29. Foram aplicados 0,5ug de cada amostra, e *Pel/HindIII* (M) foi utilizado como marcador de peso molecular

**Figura 6** - Perfil eletroforético do RNA amplificado de nevos.

### 4.3 MARCAÇÃO E HIBRIDAÇÃO

Nesta etapa, somente foram submetidas à hibridação amostras cuja incorporação de fluoróforo após a marcação tivesse valor igual ou superior a 20 pmoles, que tem proporcionado sinal satisfatório nos experimentos do nosso grupo. Obtivemos uma média de 54,5 pmoles de fluoróforo incorporado/ 100 $\mu$ L de cDNA marcado, resultando em hibridações com sinal bastante satisfatório, como pode ser visualizado na Figura 7.



**Legenda:** Imagem composta resultante da hibridação do Nevo 01 com o biochip 4.8K. A amostra está marcada com fluoróforo verde, e referência com fluoróforo vermelho.

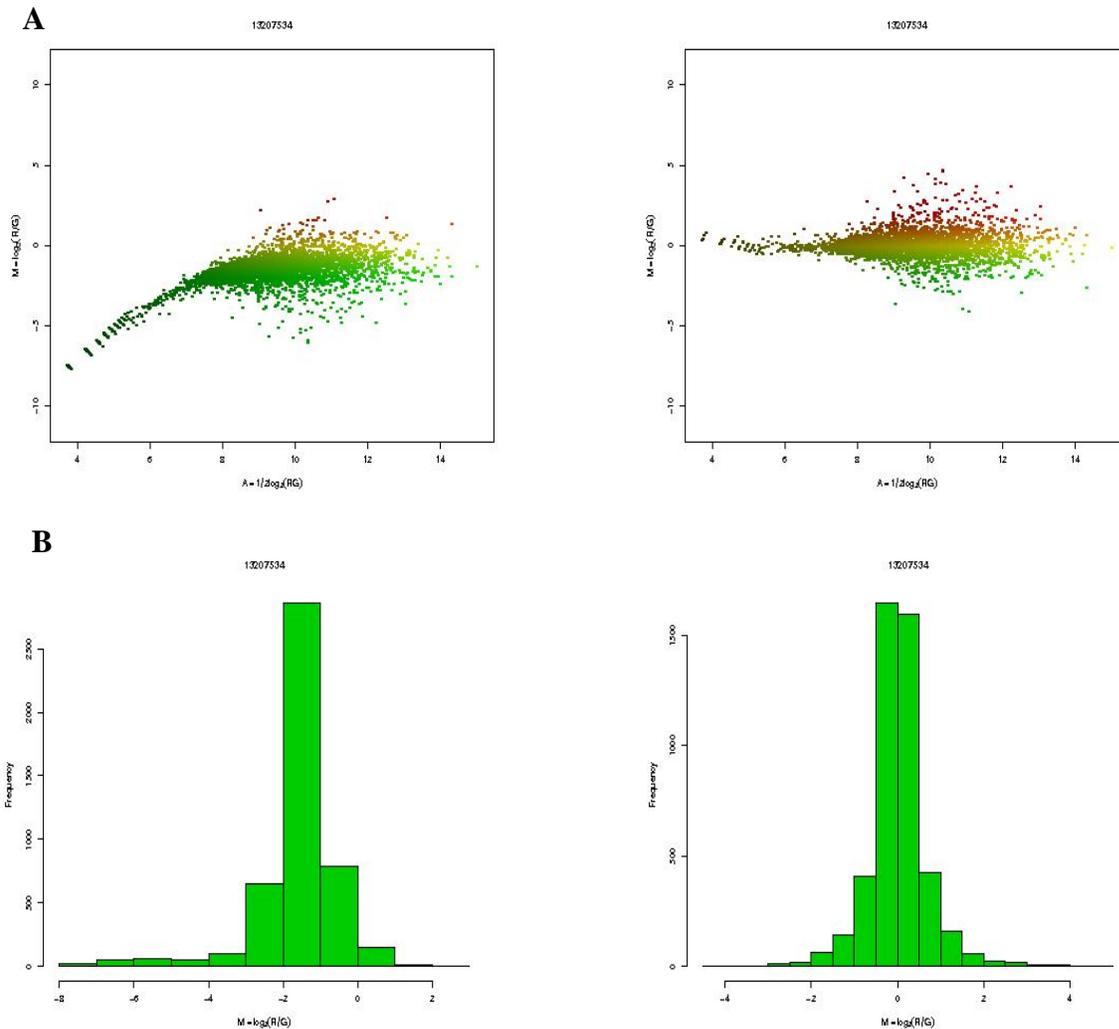
**Figura 7** - Imagem composta de hibridação.

#### 4.4 CONTROLE DE QUALIDADE DOS DADOS

Para cada lâmina foram construídos gráficos MAplot e histograma (Figura 8) que mostram o dado antes e depois da normalização por Lowess. A comparação entre o dado normalizado por Lowess e por Mdye está representada na Figura 9, onde o valor de correlação próximo a 1 indica que os dados apresentaram boa qualidade. Para esta amostra, o valor de correlação foi de 0,9861, o valor médio das correlações para todas as lâminas foi de 0,95. Diferenças locais na lâmina puderam ser avaliadas através de boxplots por agulhas de deposição, como mostrado na Figura 10. A dispersão dos genes no boxplot juntamente com variações de cor na representação esquemática da lâmina poderia indicar presença de alteração de intensidade de sinal em consequência de alguma variável local. Assim,

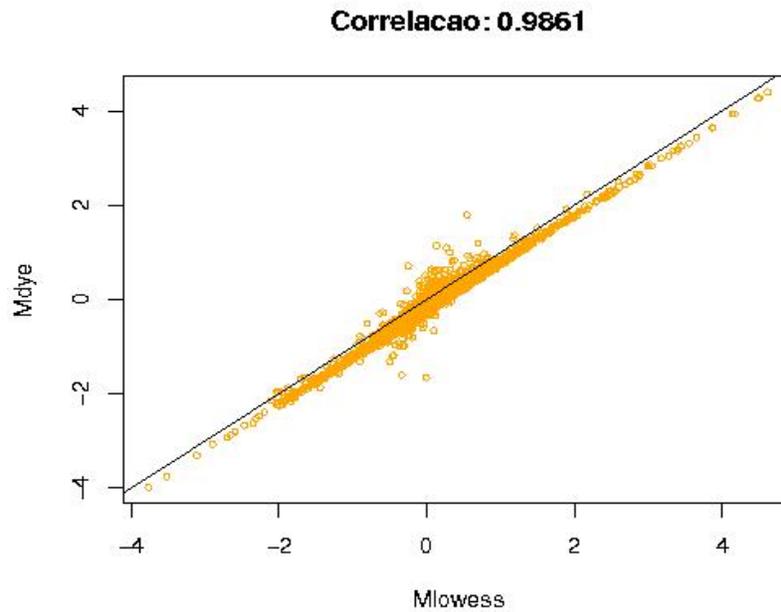
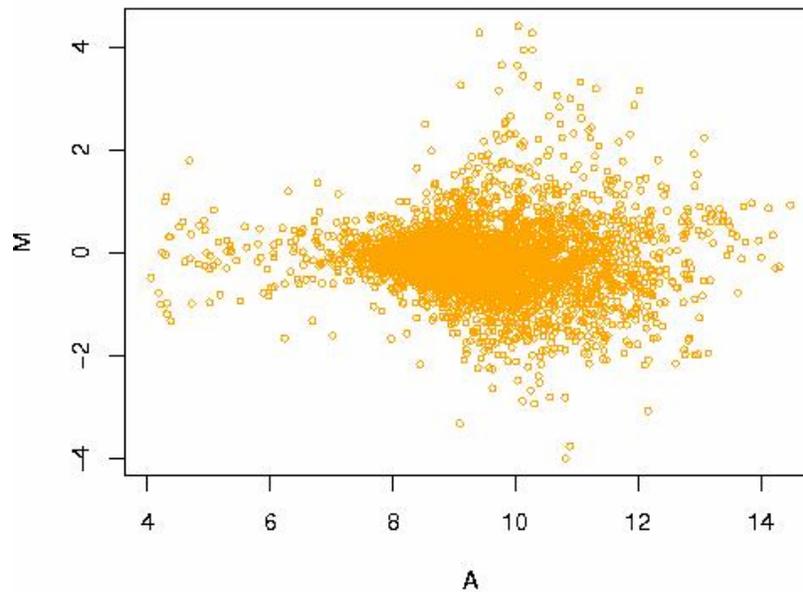
conforme mostra a Figura 10, nossas hibridações estão livres de variações espúrias.

Para avaliar a correlação entre as réplicas, foi construído um gráfico MMplot como exemplificado na Figura 11, através da Correlação de Pearson, que considera o número de pontos (spots, ou elementos) que se localizam ao longo da reta diagonal, de modo que o valor da correlação é 1 quando 100% dos elementos se localizam nesta reta. No nosso conjunto de dados a correlação de Pearson médio foi de 0,88, mostrando que os dados gerados pela lâmina réplica reproduziram os dados obtidos pela lâmina principal



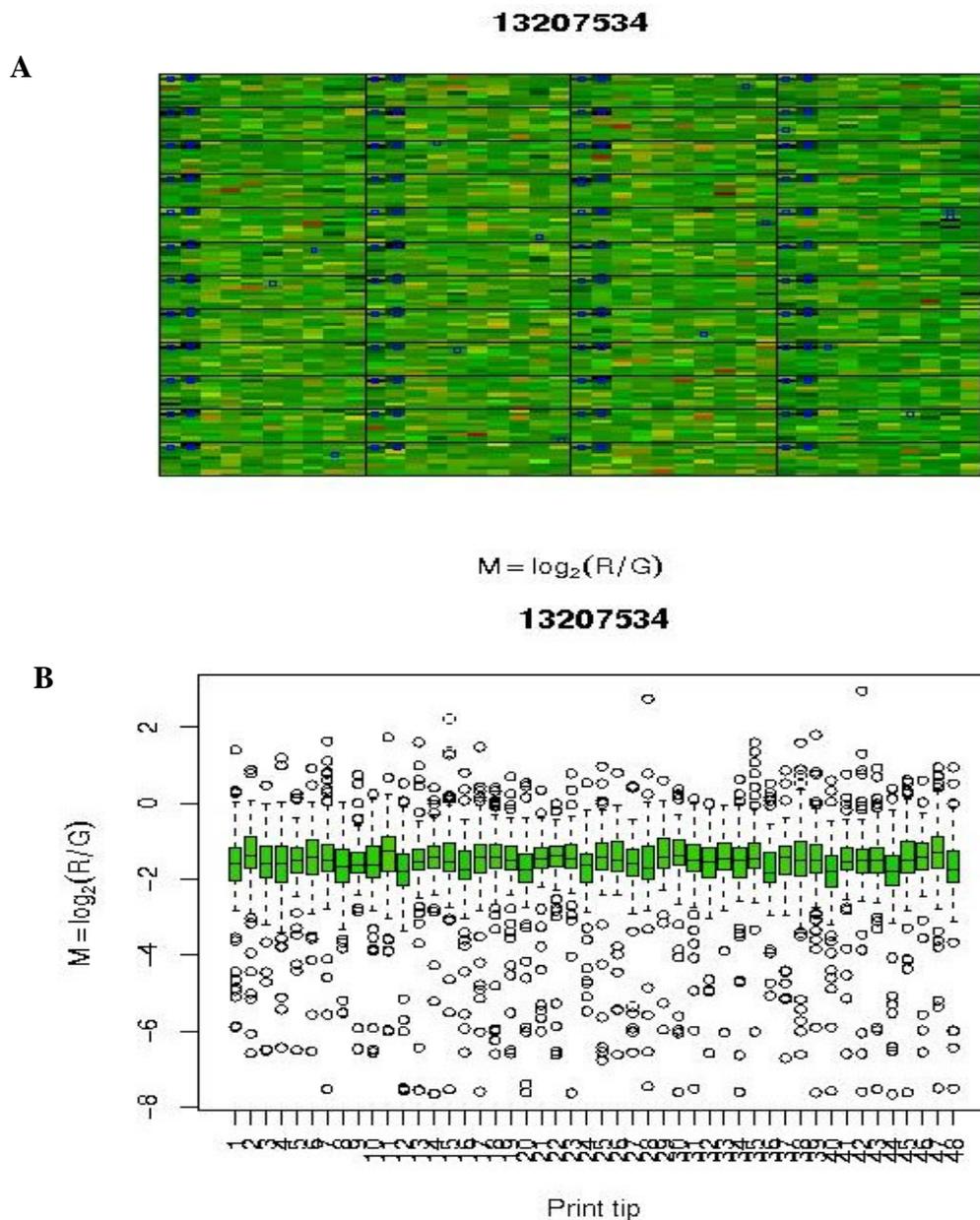
**Legenda:** **A** - MA Plot dos dados referentes à lâmina principal do Nevo 01, onde cada ponto corresponde a um elemento da lâmina, de acordo com a razão de intensidade canal 2/canal 1 (em log2) no eixo y e média da intensidade entre canal2 e canal1 (em log2) no eixo x. **B** – Histograma mostrando a distribuição de todos os elementos da lâmina de acordo com a razão de intensidade canal2/canal1. Dado não-normalizado à esquerda e dado normalizado pelo método de Lowess à direita.

**Figura 8** - MA Plot e Histograma do dado não-normalizado e dado normalizado por Lowess

**A****B**

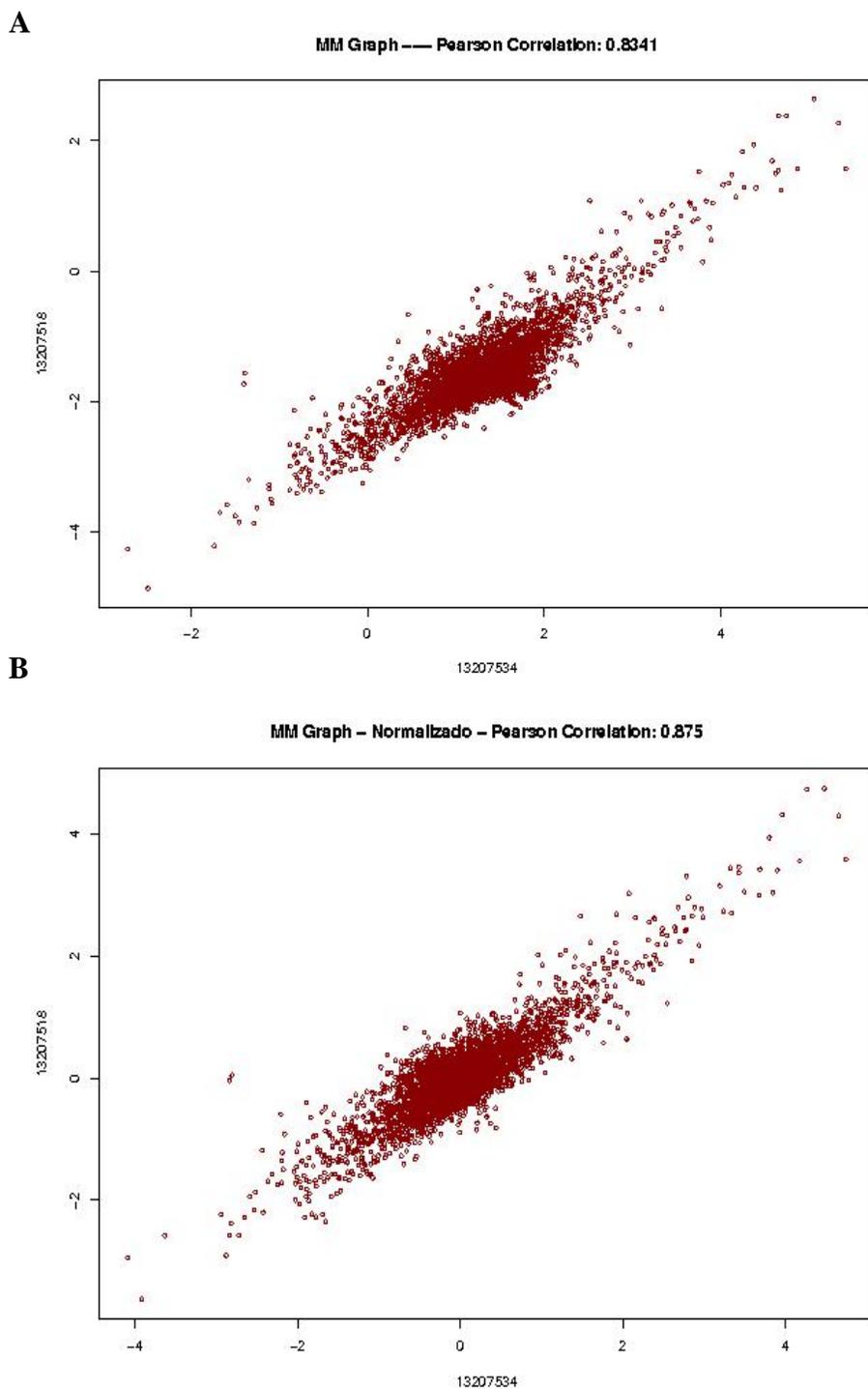
**Legenda:** **A**- MM Plot (Nevo 01) mostrando a correlação entre o dado normalizado por Mdye e o dado normalizado por Lowess. Cada ponto corresponde a um elemento, de acordo com a razão de intensidade de canal2/canal1 normalizada pelo método de Lowess (eixo x), e normalizada pelo método Mdye (eixo y). **B** - MA Plot (Nevo 01) do dado normalizado por Mdye, onde M representa a razão canal 2/canal 1 (log2), e A representa a média da intensidade dos elementos.

**Figura 9** - Correlação entre a normalização por Mdye e Lowess



**Legenda:** **A** - Representação da imagem composta de hibridação da lâmina principal do Nevo1. **B** - Boxplot da razão da intensidade Canal2/Canal1 ( $\log_2$ ) em cada conjunto de elementos correspondente à agulha de deposição utilizada. O boxplot compreende um retângulo alinhado horizontalmente com duas semi-retas, uma em cada um dos lados opostos do retângulo, ligando respectivamente os quartis Q1 e Q3 ao valor mínimo e máximo do conjunto de dados. O retângulo contém 50% dos valores do conjunto de dados, cuja largura é definida pelos quartis Q1 e Q3, e uma linha secciona o retângulo no valor da mediana.

**Figura 10** - Controle local da lâmina.

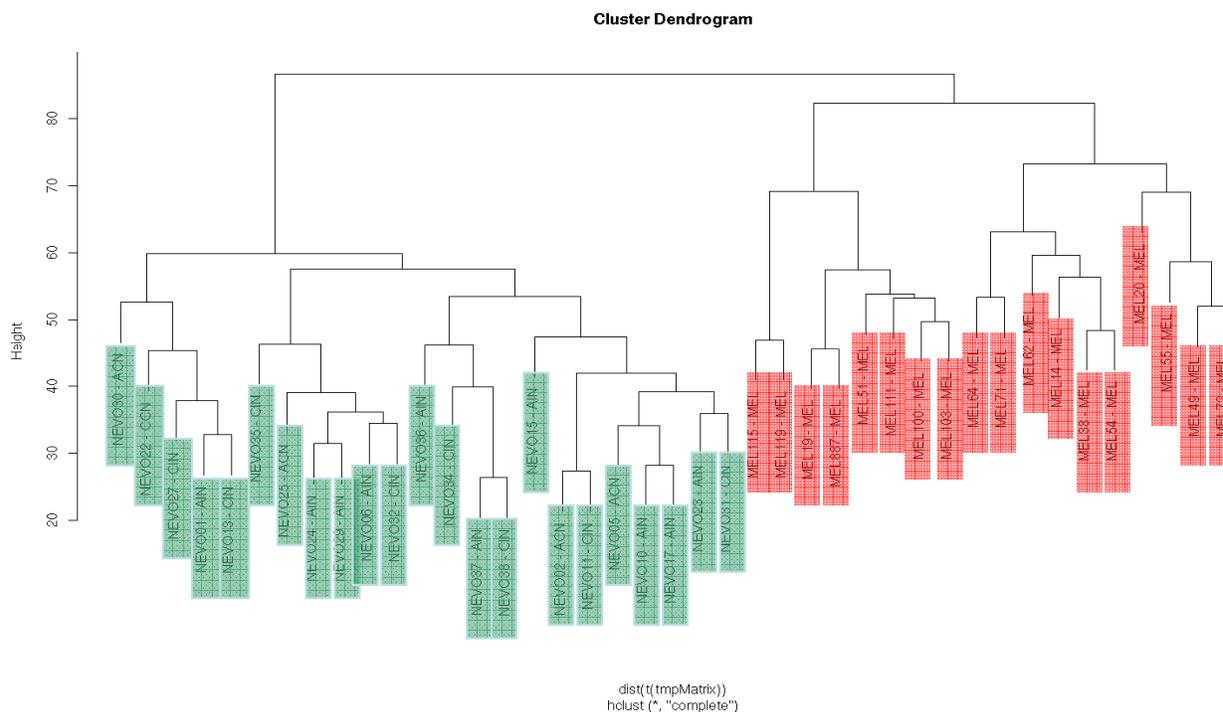


**Legenda:** MM Plot do dado não-normalizado (A) e dado normalizado por Lowess (B) das lâminas referentes ao Nevo 01. O valor da razão de intensidade canal2/canal1 (log2) de cada elemento da lâmina principal (13207518) está plotado no eixo y, e da lâmina réplica (13207534) está plotado no eixo x.

**Figura 11** - Correlação entre as réplicas

## 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

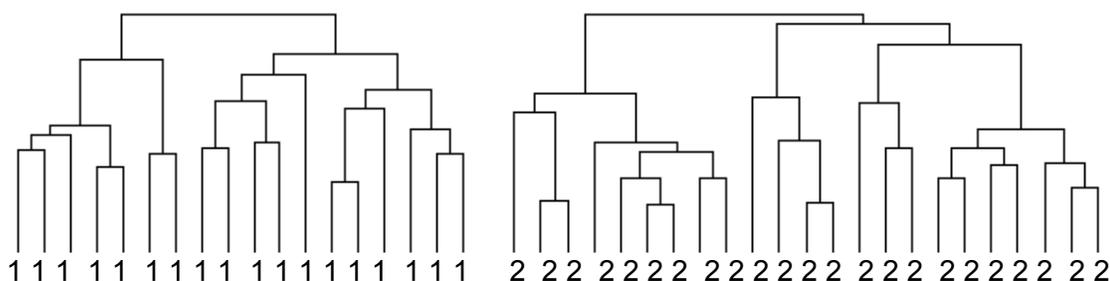
Após análise de qualidade e normalização de todas as lâminas, foi construído um cluster hierárquico não-supervisionado, método completo, que toma o máximo da distância entre todos os elementos que compõem um grupo. O cluster gerado pode ser visualizado na Figura 12, onde as amostras de nevos e melanomas primários foram separadas em dois braços principais.



**Legenda:** Agrupamento hierárquico não supervisionado das amostras de nevos e melanomas baseado no perfil de expressão de todos os genes da lâmina, removendo controles positivos e spots vazios. Todas as amostras foram hibridadas em duplicata (dye-swap) e as lâminas foram normalizadas e clusterizadas utilizando distância de correlação como métrica. Nevos estão destacados em verde, e melanomas em vermelho.

**Figura 12** - Agrupamento hierárquico não supervisionado de nevos e melanomas

Também foi utilizada a ferramenta SOM (Self Organizing Map) com topologia linear e o método de K-médias, que consistem no agrupamento não-supervisionado das amostras baseado no nível de expressão de todos os genes da lâmina. O resultado do agrupamento por SOM com 02 grupos está representado na Figura 13.



**Legenda:** Agrupamento não-supervisionado obtido pela análise por SOM (02 grupos), de acordo com a expressão de todos os elementos da plataforma, removendo controles positivos e spots vazios. 1=melanoma; 2=nevo

**Figura 13** - Agrupamento não-supervisionada das amostras por Self Organizing Map.

Esta separação de nevos e melanomas é determinada pelo grande número de genes diferencialmente expressos (2149 genes, considerando valor de  $p \leq 0,05$ ). A Tabela 6 mostra a lista dos 211 genes identificados pelo teste de Wilcoxon, considerando  $\text{fold} \geq \pm 2$  (Melanoma/Nevo), e valor de  $p \leq 0,05$ .

A escolha de genes para validação foi orientada pela análise de módulos alterados, que forneceram indicativos de vias ou funções biológicas alteradas entre nevos e melanomas.

**Tabela 7** – Genes diferencialmente expressos entre melanomas primários e nevos (fold > +/- 2, valor de p <=0,05, ordenados pelo valor de *Fold-change*)

Gene	Nome	Fold	pvalor
ZNF83	zinc finger protein 83 (HPF1)	-11.92	0
CRTAC1	cartilage acidic protein 1	-9.61	0
ANXA8	annexin A8	-9.37	0
POF1B	premature ovarian failure 1B	-8.35	0
FLJ25084	hypothetical protein FLJ25084	-7.56	0
S100A14	S100 calcium binding protein A14	-7.08	0
GJA1	gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)	-6.79	0
RDH-E2	retinal short chain dehydrogenase reductase	-6.03	0
DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase	-5.33	0
EHF	ets homologous factor	-4.84	0
FLJ32028	hypothetical protein FLJ32028	-4.72	0
SDBCAG84	serologically defined breast cancer antigen 84	-4.58	0
KLK7	kallikrein 7 (chymotryptic, stratum corneum) monogenic, audiogenic seizure susceptibility 1 homolog (mouse)	-4.39	0
MASS1		-4.35	1.00E-04
UBN1	ubinuclein 1	-4.34	0
COL17A1	collagen, type XVII, alpha 1	-4.23	0
DSC3	desmocollin 3	-4.19	0
ALDH3A2	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2	-4.13	0
PLCL2	phospholipase C-like 2	-4.09	0
ABLIM2	actin binding LIM protein family, member 2	-4.03	0
MAL2	mal, T-cell differentiation protein 2	-4.00	0
SARS	seryl-tRNA synthetase	-3.83	0
COL18A1	collagen, type XVIII, alpha 1	-3.77	0
SPINT2	serine protease inhibitor, Kunitz type, 2	-3.73	0
HNRPF	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	-3.58	0
ACAT2	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2 (acetoacetyl Coenzyme A thiolase)	-3.57	0
DGAT2	diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2 (mouse)	-3.56	0
RPL15	ribosomal protein L15	-3.47	0
SSFA2	sperm specific antigen 2	-3.47	0
MGC20460	hypothetical protein MGC20460	-3.47	0
SPARCL1	SPARC-like 1 (mast9, hevin) farnesyl diphosphate synthase (farnesyl pyrophosphate synthetase, dimethylallyltranstransferase, geranyltranstransferase)	-3.36	0
FDPS		-3.32	0
NMU	neuromedin U	-3.30	0
RPL5	ribosomal protein L5	-3.22	0
PRDX3	peroxiredoxin 3	-3.20	0
GSN	gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	-3.19	0
NTRK2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	-3.16	0
SERPING1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)	-3.16	0
RHOV	ras homolog gene family, member V	-3.12	0
HOP	homeodomain-only protein	-3.10	0

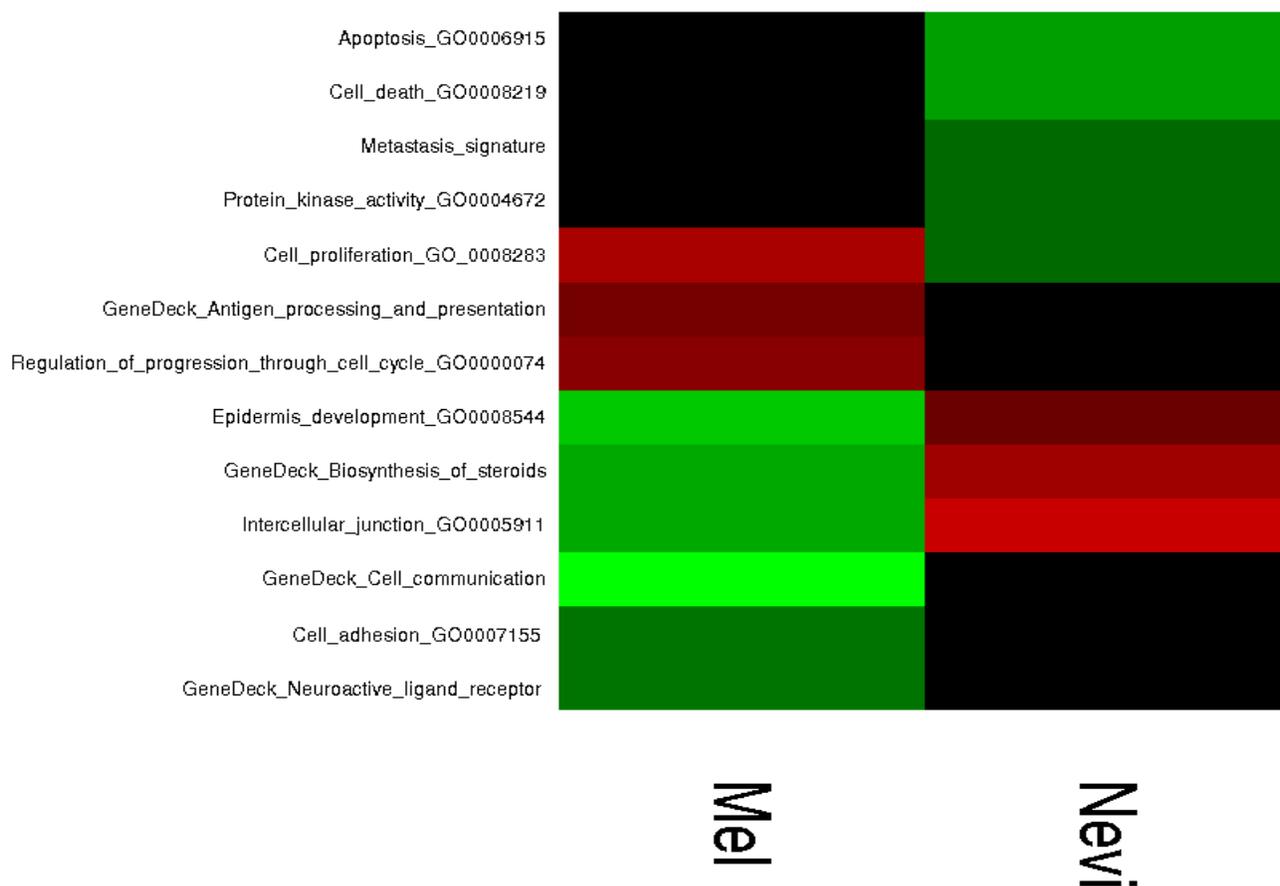
GRHPR	glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	-3.09	0
GLCE	glucuronyl C5-epimerase	-3.09	0
SOAT1	sterol O-acyltransferase (acyl-Coenzyme A: cholesterol acyltransferase) 1	-3.08	1.00E-04
TMEM16A	transmembrane protein 16A	-3.07	0
FBLN1	fibulin 1	-3.03	0
EIF3S4	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 4 delta, 44kDa	-3.02	0
KIAA1522	KIAA1522 protein	-3.02	0
MAPK13	mitogen-activated protein kinase 13	-3.00	0
KMO	kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase)	-2.98	0.0049
BCAP31	B-cell receptor-associated protein 31	-2.94	0
NCB5OR	NADPH cytochrome B5 oxidoreductase	-2.94	0
CREG	cellular repressor of E1A-stimulated genes	-2.92	0
C9orf125	chromosome 9 open reading frame 125	-2.91	0
SEPX1	selenoprotein X, 1	-2.85	0
CCT4	chaperonin containing TCP1, subunit 4 (delta)	-2.85	0
TA-PP2C	T-cell activation protein phosphatase 2C	-2.85	0.0398
KRT5	keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types)	-2.83	0
IMPA2	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2	-2.82	0
LOC51035	ORF	-2.82	0
AHCYL1	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1	-2.81	0
PDZK3	PDZ domain containing 3	-2.79	0
AQP3	aquaporin 3	-2.78	0
RG9MTD3	RNA (guanine-9-) methyltransferase domain containing 3	-2.77	0.0104
RARRES1	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	-2.75	2.00E-04
ADH1B	alcohol dehydrogenase IB (class I), beta polypeptide	-2.71	0
TACC2	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2	-2.71	0
ABTB1	ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 1	-2.69	0
P8	p8 protein (candidate of metastasis 1)	-2.68	0
SPON1	spondin 1, extracellular matrix protein	-2.68	0
SCOC	short coiled-coil protein	-2.67	0
CLDN4	claudin 4	-2.66	0
C20orf72	chromosome 20 open reading frame 72	-2.63	0
PALMD	palmdelphin	-2.59	0
PFDN5	prefoldin 5	-2.57	0
KAI1	kangai 1 (suppression of tumorigenicity 6, prostate; CD82 antigen (R2 leukocyte antigen, antigen detected by monoclonal and antibody IA4))	-2.56	0
SCAMP3	secretory carrier membrane protein 3	-2.55	0
MAP17	membrane-associated protein 17	-2.53	0
CPE	carboxypeptidase E	-2.53	0
SLIT3	slit homolog 3 (Drosophila)	-2.51	0
SRP9	signal recognition particle 9kDa	-2.48	0
LOC113828	hypothetical protein BC011204	-2.46	0
MGST2	microsomal glutathione S-transferase 2	-2.45	0
CUEDC2	CUE domain containing 2	-2.45	0
LTA4H	leukotriene A4 hydrolase	-2.44	0
GATM	glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)	-2.41	0

ME1	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	-2.40	0
PLP2	proteolipid protein 2 (colonic epithelium-enriched)	-2.40	0
ATP5G2	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 2	-2.40	0
COMT	catechol-O-methyltransferase	-2.39	0
ZFP106	zinc finger protein 106 homolog (mouse)	-2.39	0
FDFT1	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1	-2.37	0
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	-2.35	1.00E-04
POSTN	periostin, osteoblast specific factor	-2.33	0.0045
LOC120224	hypothetical protein BC016153	-2.33	0
SAT2	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 2	-2.33	0
FAM32A	family with sequence similarity 32, member A	-2.32	0
NDRG1	N-myc downstream regulated gene 1	-2.32	0
MGC2603	hypothetical protein MGC2603	-2.31	0
FADS1	fatty acid desaturase 1	-2.31	0.0069
TESK1	testis-specific kinase 1	-2.31	0
ACTR3	ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast)	-2.31	0
DSIPI	delta sleep inducing peptide, immunoreactor	-2.30	0
PPIB	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)	-2.29	0
HOXB7	homeo box B7	-2.27	0
TEF	thyrotrophic embryonic factor	-2.26	0
LOC56851	chromosome 15 hypothetical ATG/GTP binding protein	-2.26	0
HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)	-2.25	0
KIAA1423	KIAA1423	-2.24	0.0424
MAP7	microtubule-associated protein 7	-2.23	0
DCTN6	dynactin 6	-2.23	0
CDC27	cell division cycle 27	-2.22	0
SERPINB6	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 6	-2.21	0
CNTN1	contactin 1	-2.12	0
TOMM20	translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog (yeast)	-2.19	0
MTPN	myotrophin	-2.19	0
OCIA	ovarian carcinoma immunoreactive antigen	-2.18	0
APP	amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease)	-2.18	1.00E-04
GOLGA7	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 7	-2.18	0
ZNF403	zinc finger protein 403	-2.18	0
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	-2.17	0
ELOVL1	elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 1	2.17	0
CDS1	CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidyltransferase) 1	-2.16	0
EDNRB	endothelin receptor type B	-2.16	0.0026
C1R	complement component 1, r subcomponent	-2.16	0
DOCK9	dedicator of cytokinesis 9	-2.16	3.00E-04
FBLN5	fibulin 5	-2.14	0
C20orf3	chromosome 20 open reading frame 3	-2.13	0
REA	repressor of estrogen receptor activity	-2.13	0

SELS	selenoprotein S	-2.12	0
UBE2I	ubiquitin-conjugating enzyme E2I (UBC9 homolog, yeast)	-2.12	0
FLJ20343	hypothetical protein FLJ20343	-2.12	0
GTL3	likely ortholog of mouse gene trap locus 3	-2.12	0
CKMT2	creatine kinase, mitochondrial 2 (sarcomeric)	-2.11	0
LOC129642	hypothetical protein BC016005	-2.11	0
PPP2R2C	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), gamma isoform	-2.10	0.0018
IPO7	importin 7	-2.09	0
DOC1	downregulated in ovarian cancer 1	-2.09	0
RNF141	ring finger protein 141	-2.09	0
VPS39	vacuolar protein sorting 39 (yeast)	-2.09	0
KIAA1671	KIAA1671 protein	-2.09	0
CDK5RAP2	CDK5 regulatory subunit associated protein 2	-2.08	0
SMARCD2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 2	-2.08	0
PLXND1	plexin D1	-2.06	2.00E-04
FLNB	filamin B, beta (actin binding protein 278)	-2.06	0
NIPA	nuclear interacting partner of anaplastic lymphoma kinase (ALK)	-2.06	0
C14orf123	chromosome 14 open reading frame 123	-2.06	0
REV1L	REV1-like (yeast)	-2.06	0
LAMA3	laminin, alpha 3	-2.06	0.0012
ATF7	activating transcription factor 7	-2.06	0
RGS2	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa	-2.05	3.00E-04
IL1R2	interleukin 1 receptor, type II	-2.05	0
UROS	uroporphyrinogen III synthase (congenital erythropoietic porphyria)	-2.04	0
CRYZL1	crystallin, zeta (quinone reductase)-like 1	-2.03	0
MRPL22	mitochondrial ribosomal protein L22	-2.03	0
DEGS	degenerative spermatocyte homolog, lipid desaturase (Drosophila)	-2.03	0
SSBP2	single-stranded DNA binding protein 2	-2.02	0
MGC34923	hypothetical protein MGC34923	-2.01	0
TPCN2	two pore segment channel 2	-2.01	2.00E-04
TP73L	tumor protein p73-like	-2.00	0
IL6ST	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	-2.00	0.0398
CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	-2.00	0
TMEFF2	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2	2.00	1.00E-04
KIAA1416	KIAA1416 protein	2.00	4.00E-04
E2F2	E2F transcription factor 2	2.01	0
SCHIP1	schwannomin interacting protein 1	2.01	0
PLP1	proteolipid protein 1 (Pelizaeus-Merzbacher disease, spastic paraplegia 2, uncomplicated)	2.02	1.00E-04
TIMP2	tissue inhibitor of metalloproteinase 2	2.03	0
MIR	c-mir, cellular modulator of immune recognition	2.03	4.00E-04
LAP3	leucine aminopeptidase 3	2.04	0
TRB2	tribbles homolog 2	2.06	0
HSPC121	butyrate-induced transcript 1	2.06	0

ATP6V1C1	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C, isoform 1	2.07	0
PIK3R3	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 3 (p55, gamma)	2.07	1.00E-04
SLC39A14	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14	2.09	0
TPX2	TPX2, microtubule-associated protein homolog (Xenopus laevis)	2.10	0
PIR51	RAD51-interacting protein	2.11	0
RALA	v-ral simian leukemia viral oncogene homolog A (ras related)	2.12	0
RUNDC1	RUN domain containing 1	2.13	0
CITED1	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 1	2.15	0
DNCH1	dynein, cytoplasmic, heavy polypeptide 1	2.17	0
RAB27A	RAB27A, member RAS oncogene family	2.1	0.0016
SDK1	sidekick homolog 1 (chicken)	2.19	0
SGK	serum/glucocorticoid regulated kinase	2.20	3.00E-04
HNRPA2B1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	2.20	0
CSNK1D	casein kinase 1, delta	2.22	0
PRKCBP1	protein kinase C binding protein 1	2.24	0
CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	2.24	2.00E-04
CXCL9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	2.27	0
PSEN2	presenilin 2 (Alzheimer disease 4)	2.27	0
ITPK1	inositol 1,3,4-triphosphate 5/6 kinase	2.30	0
CCBL1	cysteine conjugate-beta lyase; cytoplasmic (glutamine transaminase K, kynurenine aminotransferase)	2.30	0
CCT5	chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)	2.32	0
PRC1	protein regulator of cytokinesis 1	2.36	0
UMPK	uridine monophosphate kinase	2.39	0
FREB	Fc receptor homolog expressed in B cells	2.49	0
PRG1	proteoglycan 1, secretory granule	2.50	0
PIF1	DNA helicase homolog PIF1	2.54	0
HSPH1	heat shock 105kDa/110kDa protein 1	2.56	0
LMAN2L	lectin, mannose-binding 2-like	2.57	0
CALU	calumenin	2.60	0
TTL	tubulin tyrosine ligase	2.70	0
STARD3NL	STARD3 N-terminal like	2.71	0
POLR3E	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E (80kD)	2.85	0
FLOT1	flotillin 1	2.99	0
USP13	ubiquitin specific protease 13 (isopeptidase T-3)	3.06	0
MDM4	Mdm4, transformed 3T3 cell double minute 4, p53 binding protein (mouse)	3.16	0
CDK2	cyclin-dependent kinase 2	3.23	0
SLC20A1	solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1	3.31	0
SLC37A1	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 1	3.45	0
STK3	serine/threonine kinase 3 (STE20 homolog, yeast)	3.97	0
COL4A1	collagen, type IV, alpha 1	5.85	0

A metodologia de Módulos Funcionais (GOMES et al. 2005; ESTEVES 2007), foi empregada para busca por grupos de genes ativados ou inibidos, na comparação Nevo x Melanoma. A Figura 14 mostra o mapa de módulos alterados, considerando apenas os módulos alterados com significância estatística. Os genes que contribuíram para o “status” desses módulos estão listados na Tabela 7, e dentre eles, os boxplots referentes aos genes diferencialmente expressos (considerando fold  $\geq \pm 2$ , valor de  $p \leq 0.05$ ) estão representados na Figura 15.



**Legenda:** Mapa de módulos funcionais alterados entre o grupo de nevos e o grupo dos melanomas. A ativação do módulo é ilustrada em vermelho e a inibição em verde. A cor preta indica módulos sem significância estatística.

**Figura 14** - Mapa de módulos funcionais alterados.

**Tabela 8** - Lista dos genes com alteração significativa nas amostras, que contribuíram para definição do status do módulo (pvalor < 0.05), de acordo com o teste de consistência. Fold se refere à razão de expressão melanoma/nevo.

**Apoptosis\_GO0006915**

Gene	Nome	Pontuação	Pvalor	Fold
STK3	serine/threonine kinase 3 (STE20 homolog, yeast)	2.735e+01	1.119e-53	3,97
MDM4	Mdm4, transformed 3T3 cell double minute 4, p53 binding protein (mouse)	2.323e+01	8.035e-39	3,16

**Cell\_adhesion\_GO0007155**

Gene	Nome	Pontuação	Pvalor	Fold
POSTN	periostin, osteoblast specific factor	1.868e+01	3.253e-13	-2,33
DSC3	desmocollin 3	1.680e+01	1.047e-10	-4,15
FXVD5	FXVD domain containing ion transport regulator 5	1.342e+01	5.904e-07	—
CD44	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	9.944e+00	4.481e-04	-1,83
SGCE	sarcoglycan, epsilon	9.251e+00	1.287e-03	-1,97
CNTN1	cyclin-dependent kinase 2	9.028e+00	1.774e-03	-2,12
STIM2	stromal interaction molecule 2	6.160e+00	4.984e-02	-1,76

**Cell\_death\_GO0008219**

Gene	Nome	Pontuação	Pvalor	Fold
STK3	serine/threonine kinase 3 (STE20 homolog, yeast)	2.722e+01	7.910e-53	3,97
MDM4	Mdm4, transformed 3T3 cell double minute 4, p53 binding protein (mouse)	2.311e+01	3.384e-38	3,16

**Cell\_proliferation\_GO\_0008283**

Gene	Nome	Pontuação	Pvalor	Fold
MDM4	Mdm4, transformed 3T3 cell double minute 4, p53 binding protein (mouse)	3.081e+01	3.749e-40	3,16
CDK2	cyclin-dependent kinase 2	2.376e+01	6.561e-24	3,23
CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	2.216e+01	7.983e-21	2,24
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	1.128e+01	6.775e-06	1,42
TPX2	TPX2, microtubule-associated protein homolog (Xenopus laevis)	9.162e+00	3.484e-04	2,09
SHC1	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1	8.064e+00	1.912e-03	—
EPS8	epidermal growth factor receptor pathway substrate 8	6.065e+00	2.354e-02	1,56
BST2	bone marrow stromal cell antigen 2	5.842e+00	2.976e-02	1,67
BAP1	BRCA1 associated protein-1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase)	5.436e+00	4.454e-02	—
SSR4	signal sequence receptor, delta (translocon-associated protein delta)	5.436e+00	4.454e-02	—

**Epidermis\_development\_GO0008544**

Gene	Nome	Pontuação	Pvalor	Fold
KLK7	kallikrein 7 (chymotryptic, stratum corneum)	1.403e+01	6.113e-08	-4,39
LAMA3	laminin, alpha 3	1.028e+01	5.452e-04	-2,06

**GeneDeck\_Antigen\_processing\_and\_presentation**

Gene	Nome	Pontuação	Pvalor	Fold
HLA-F	major histocompatibility complex, class I, F	7.4547199	0.0001558	1,48
HLA-DPB1	major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	7.4547199	0.0001558	—
RFX5	regulatory factor X, 5 (influences HLA class II expression)	4.5643482	0.0435818	-1,68

**GeneDeck\_Biosynthesis\_of\_steroids**

Gene	Nome	Pontuação	Pvalor	Fold
FDPS	farnesyl diphosphate synthase (farnesyl pyrophosphate synthetase, dimethylallyltransferase, geranyltransferase)	9.856054	0.001138	3,31

**GeneDeck\_Cell\_communication**

Gene	Nome	Pontuação	Pvalor	Fold
GJA1	gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)	2.473e+01	2.916e-08	-6,79
DSC3	desmocollin 3	2.314e+01	3.937e-07	-4,15
COL3A1	collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)	2.246e+01	1.125e-06	--
COL17A1	collagen, type XVII, alpha 1	1.756e+01	6.180e-04	-4,23
COL4A1	collagen, type IV, alpha 1	1.427e+01	1.307e-02	5,85
KRT5	keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types)	1.404e+01	1.557e-02	-2,83

**GeneDeck\_Neuroactive\_ligand\_receptor**

Gene	Nome	Pontuação	Pvalor	Fold
EDNRB	endothelin receptor type B	1.237e+01	1.653e-11	-2,18
NMU	neuromedin U	9.259e+00	9.555e-07	-3,3
P2RX1	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1	8.566e+00	6.920e-06	—
ADORA3	adenosine A3 receptor	6.369e+00	1.235e-03	—
GRIN2B	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B	4.171e+00	4.386e-02	—

**Protein\_kinase\_activity\_GO0004672**

Gene	Nome	Pontuação	Pvalor	Fold
STK3	serine/threonine kinase 3 (STE20 homolog, yeast)	2.049e+01	1.238e-40	3,97
CDK2	cyclin-dependent kinase 2	1.260e+01	6.572e-16	3,23
LATS2	LATS, large tumor suppressor, homolog 2 (Drosophila)	6.096e+00	1.454e-04	1,68
STK11	serine/threonine kinase 11 (Peutz-Jeghers syndrome)	3.597e+00	2.596e-02	1,27

**Metastasis\_signature**

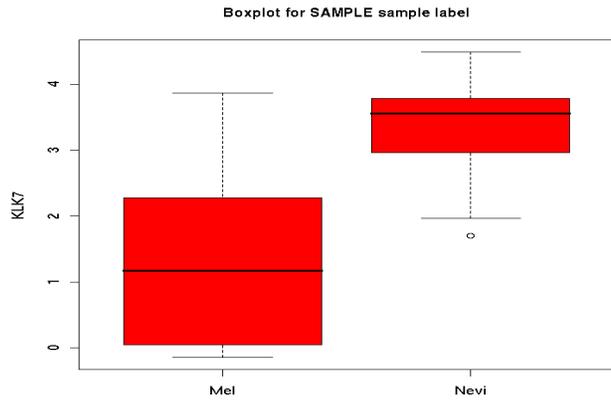
Gene	Nome	Pontuação	Pvalor	Fold
LUM	lumican	1.408e+01	1.730e-09	—
COL3A1	collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)	1.270e+01	8.090e-08	—
CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	1.035e+01	2.040e-05	2,24
S100P	S100 calcium binding protein P	8.736e+00	4.411e-04	-1,54
CCL18	chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	7.524e+00	3.069e-03	—

**Intercellular\_junction\_GO0005911**

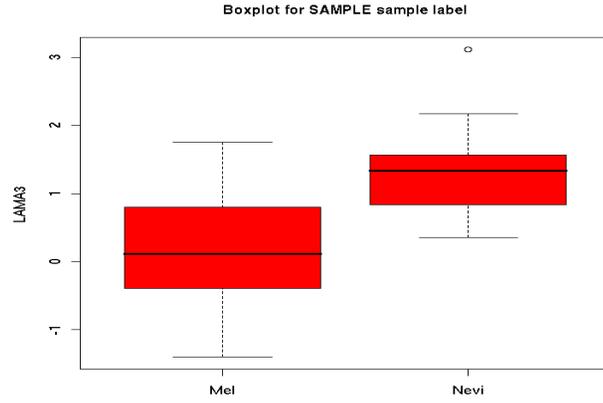
Gene	Nome	Pontuação	Pvalor	Fold
DSC3	desmocollin 3	1.057e+01	1.160e-04	-4,15

**Regulation\_of\_progression\_through\_cell\_cycle\_GO0000074**

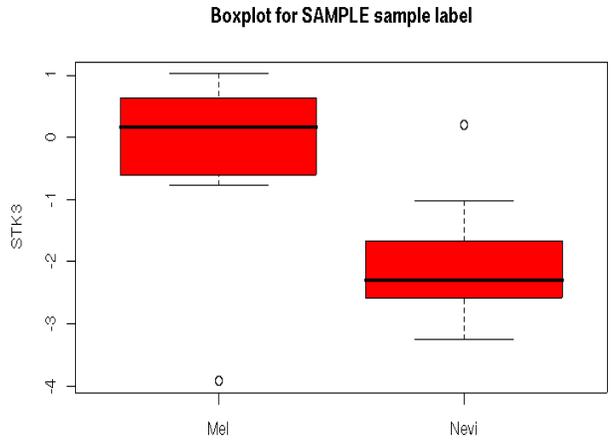
Gene	Nome	Pontuação	Pvalor	Fold
CDK2	cyclin-dependent kinase 2	2.453e+01	2.464e-27	3,23
MDM4	Mdm4, transformed 3T3 cell double minute 4, p53 binding protein (mouse)	2.413e+01	1.947e-26	3,16
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	1.330e+01	2.534e-08	1,42



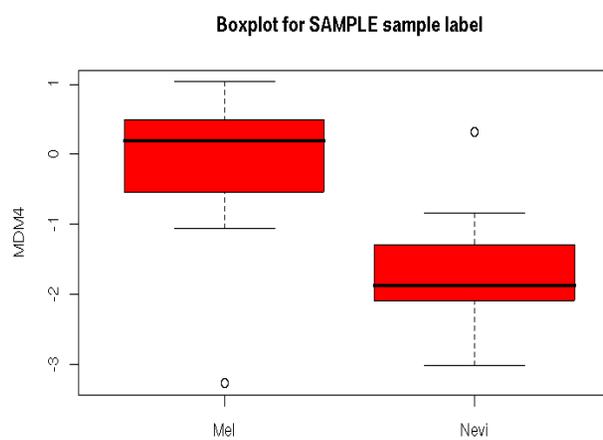
FOLD MEL/NEVO= - 4.39, VALOR DE P= 0



FOLD MEL/NEVO= - 2.06, VALOR DE P= 0.0012

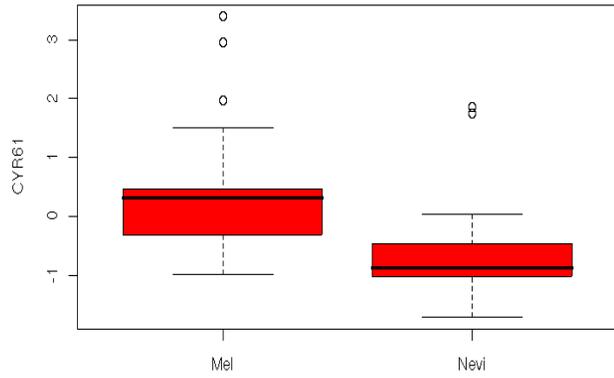


FOLD MEL/NEVO= 3.97, VALOR DE P= 0



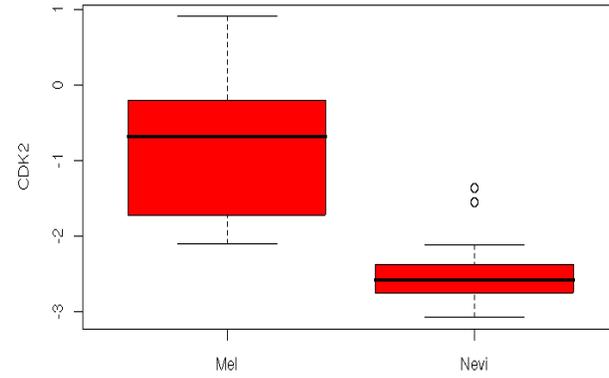
FOLD MEL/NEVO= 3.16, VALOR DE P= 0

Boxplot for SAMPLE sample label



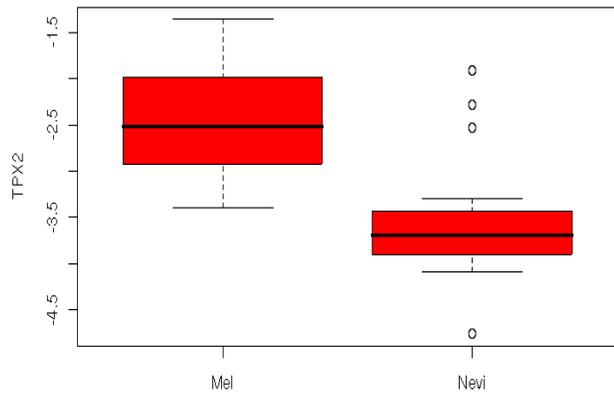
FOLD MEL/NEVO= 2.24, VALOR DE P= 0.0002

Boxplot for SAMPLE sample label



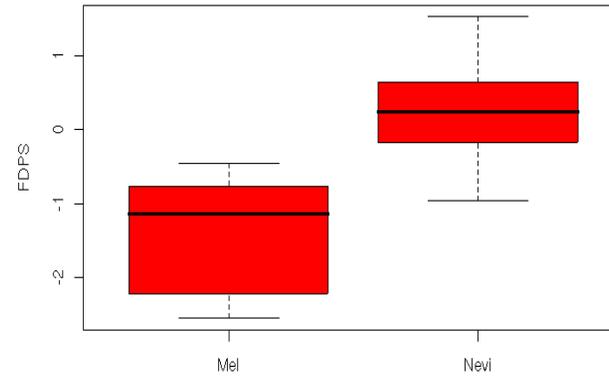
FOLD MEL/NEVO= 3.23, VALOR DE P= 0

Boxplot for SAMPLE sample label



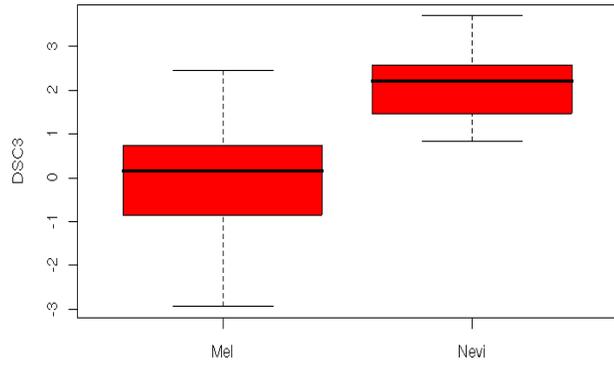
FOLD MEL/NEVO= 2.10, VALOR DE P= 0

Boxplot for SAMPLE sample label



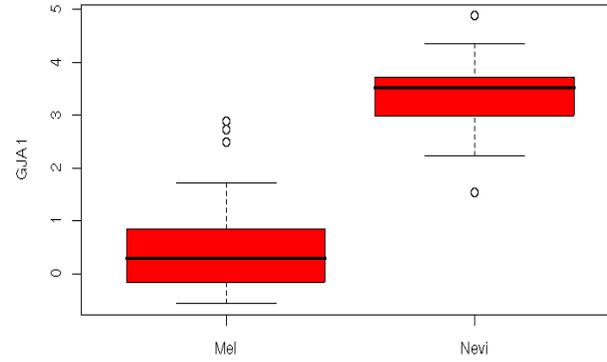
FOLD MEL/NEVO= - 3.32, VALOR DE P= 0

Boxplot for SAMPLE sample label



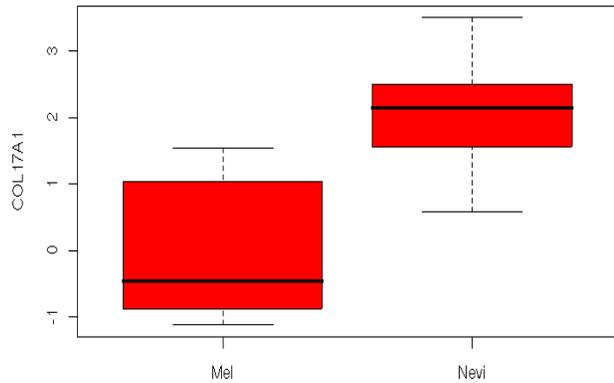
FOLD MEL/NEVO= - 4.15, VALOR DE P= 0

Boxplot for SAMPLE sample label



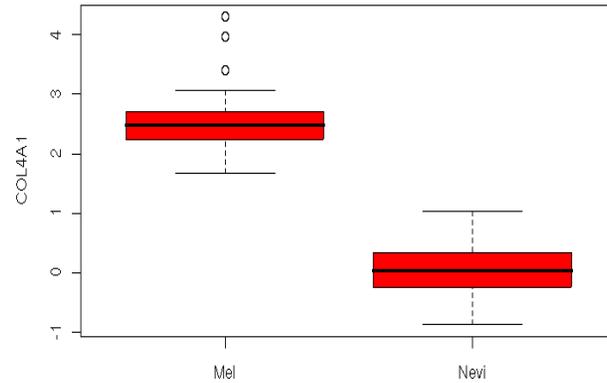
FOLD MEL/NEVO= - 6.79, VALOR DE P= 0

Boxplot for SAMPLE sample label



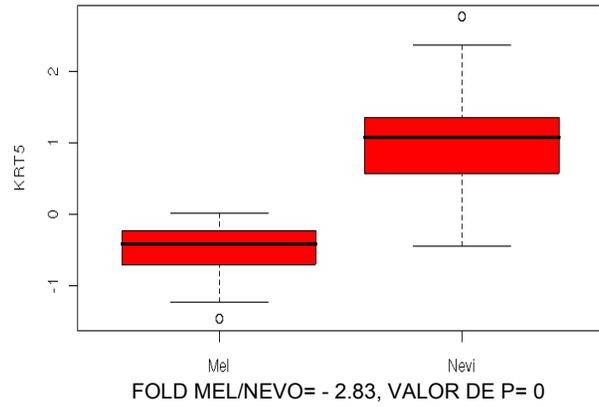
FOLD MEL/NEVO= - 4.23, VALOR DE P= 0

Boxplot for SAMPLE sample label

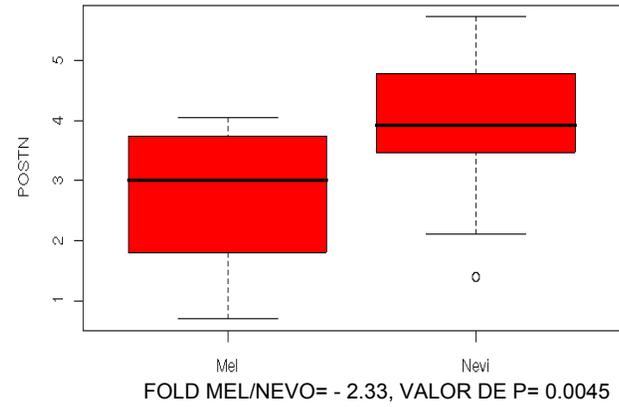


FOLD MEL/NEVO= 5.85, VALOR DE P= 0

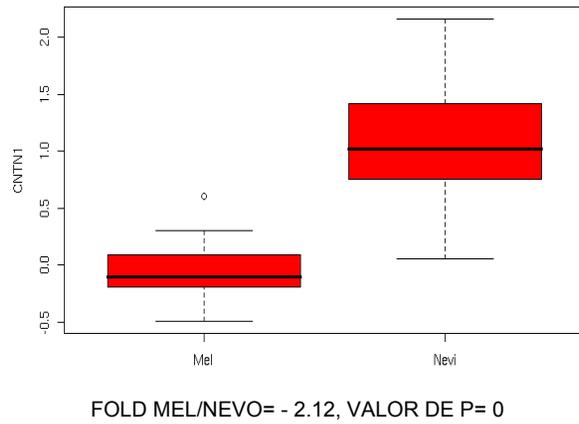
Boxplot for SAMPLE sample label



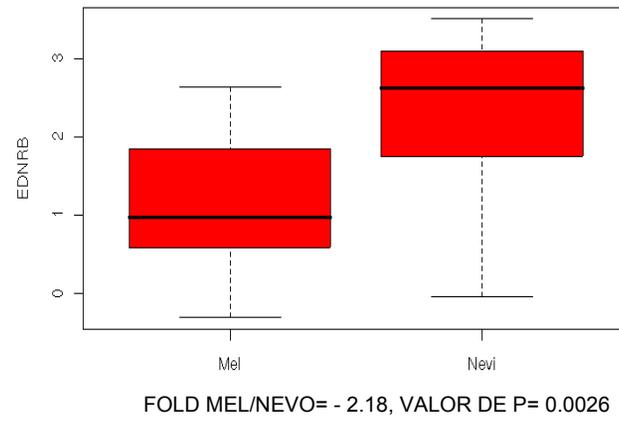
Boxplot for SAMPLE sample label

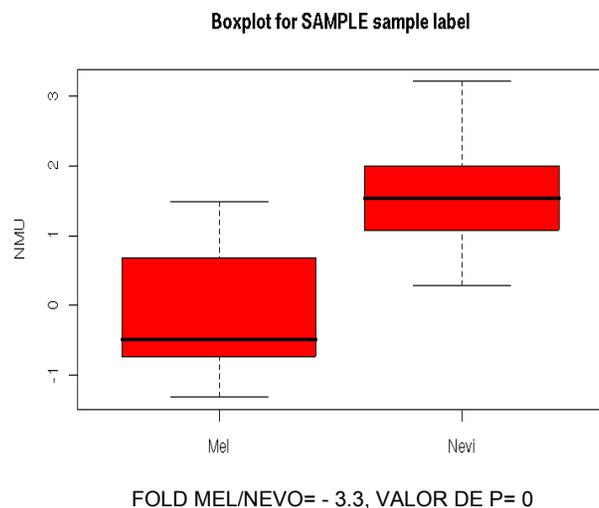


Boxplot for SAMPLE sample label



Boxplot for SAMPLE sample label

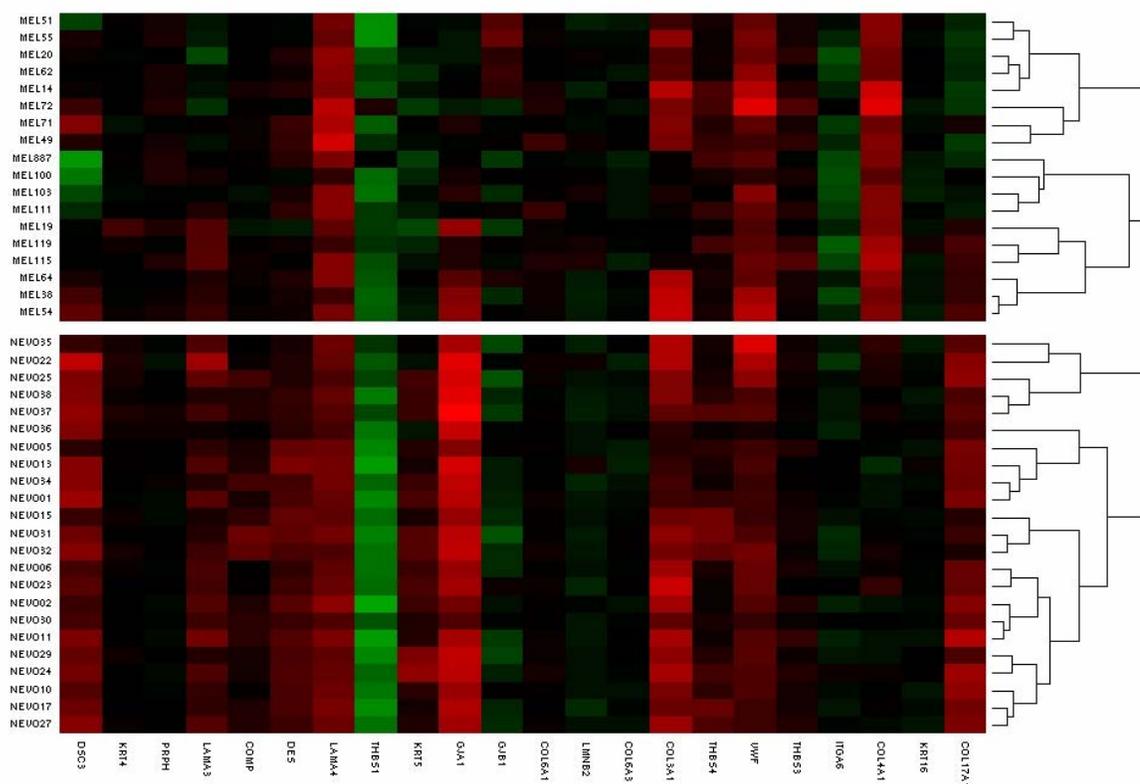




**Legenda:** Boxplot mostrando a distribuição das amostras de nevos e melanomas de acordo com o valor de expressão do gene em relação ao RNA referência (ordenada). O fold e valor de p se referem à diferença de expressão Melanoma/Nevo. Nestes gráficos, o retângulo contém 50% das amostras do conjunto de dados, cuja largura é definida pelos quartis Q1 e Q3, e uma linha secciona o retângulo no valor da mediana. Módulo de desenvolvimento da epiderme – KLK7 e LAMA3, Apoptose e morte celular – STK3 e MDM4, Assinatura metastática – CYR61, Atividade de proteína quinase – STK3 e CDK2, Proliferação celular – MDM4, CDK2, CYR61 e TPX2, Regulação da progressão do ciclo celular – CDK2 e MDM4, Biosíntese de esteróides – FDPS, Junção intercelular – DSC3, Comunicação celular – GJA1, DSC3, COL17A1, COL4A1, KRT5, Adesão celular – POSTN, DSC3, CNTN1, Receptor neuroativo ligante – EDNRB e NMU.

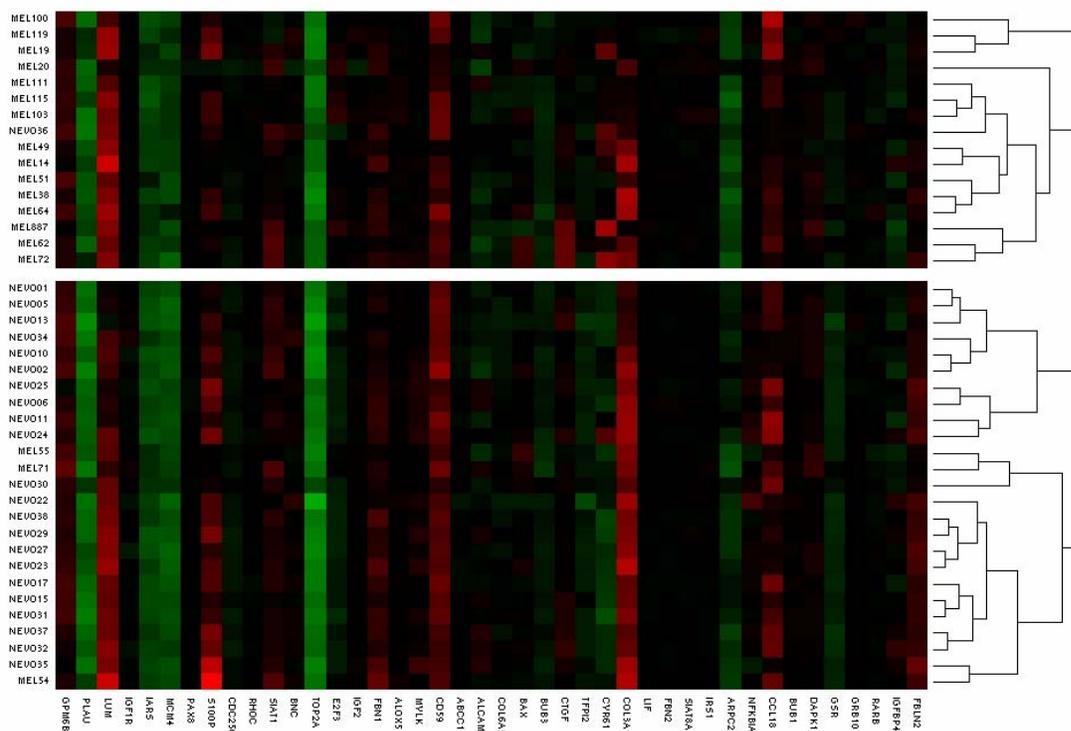
**Figura 15** - Boxplot de genes diferencialmente expressos nos módulos alterados.

Para cada módulo alterado foi feito um agrupamento por SOM (2 grupos), onde se observou uma separação completa entre os tipos de amostras em 04 módulos (comunicação celular [Figura 16], regulação da progressão do ciclo celular, proliferação celular e atividade proteína kinase) e uma separação incompleta entre os tipos de amostras no restante dos módulos, como exemplificado na Figura 17, referente ao módulo de assinatura metastática.



**Legenda:** Agrupamento não-supervisionado de amostras de nevos e melanomas (ordenada), obtido pela análise por SOM (02 grupos), utilizando os genes componentes do módulo de comunicação celular (abcissa). A cor vermelha indica genes com alta expressão, verde indica genes com baixa expressão, e preta intensidade intermediária, em relação ao RNA referência.

**Figura 16** - Agrupamento por SOM do módulo de comunicação celular



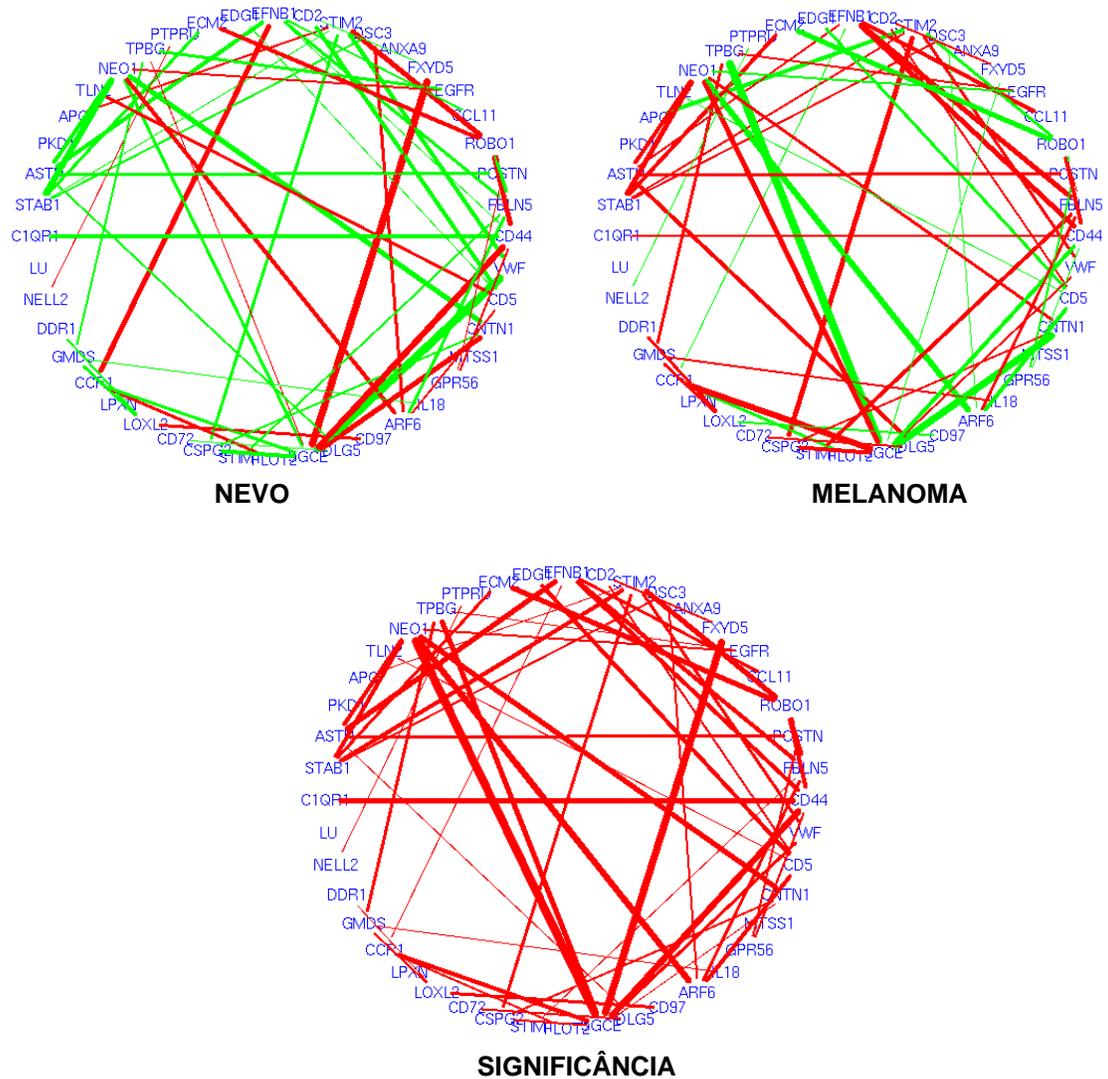
**Legenda:** Agrupamento não-supervisionado de amostras de nevos e melanomas (ordenada), obtido pela análise por SOM (02 grupos), utilizando os genes componentes do módulo de assinatura metastática (abcissa). A cor vermelha indica genes com alta expressão, verde indica genes com baixa expressão, e preta intensidade intermediária.

**Figura 17** - Agrupamento por SOM do módulo de assinatura metastática.

Foram criadas redes de relevância para todos os módulos, que permitiram determinar correlações entre pares de genes com potencial envolvimento na malignização. A correlação é positiva nos casos em que há aumento ou diminuição coordenada na expressão de um par de genes, e negativa quando, à medida que um gene aumenta a expressão, o outro gene diminui sua expressão.

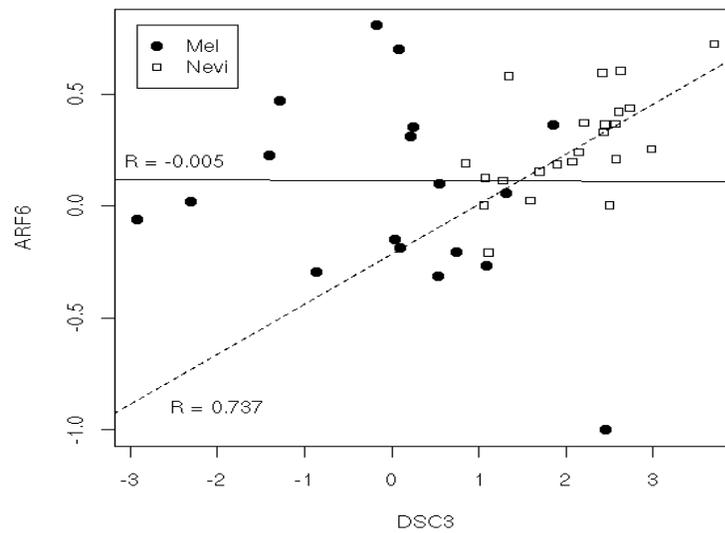
A Figura 18 mostra a rede de relevância pertencente ao módulo de adesão, onde se notam as correlações (ilustradas pelas linhas) entre pares de genes. A primeira rede refere-se aos nevos, a segunda aos melanomas, e a terceira denota a significância, todos com pvalor menor que 0.001. Os pares de genes que apresentam quebra de correlação entre pares de genes quando comparamos nevos com melanomas são aqueles de especial importância, com possível papel na progressão da lesão. Por exemplo, DSC3 x ARF6 (desmocollin x ADP-ribolysation factor 6) possuem correlação positiva nos nevos, que se torna negativa nos melanomas. Esta quebra de correlação pode ser melhor visualizada no gráfico de dispersão ilustrado na Figura 19, onde observa-se que nos nevos o aumento da expressão de DSC3 é acompanhada do aumento da expressão de ARF6, enquanto nos melanomas a expressão de DSC3 é independente da expressão de ARF6.

Na Figura 20 podemos visualizar os gráficos de dispersão de alguns pares do módulo de desenvolvimento da epiderme. E os gráficos referentes a alguns pares de genes consistentes do restante dos módulos alterados podem ser visualizados na Figura 21.



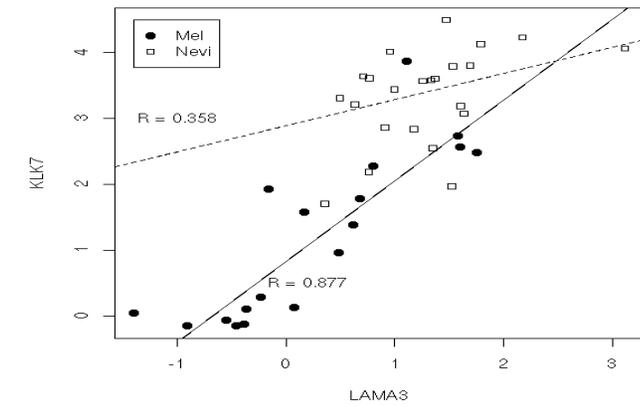
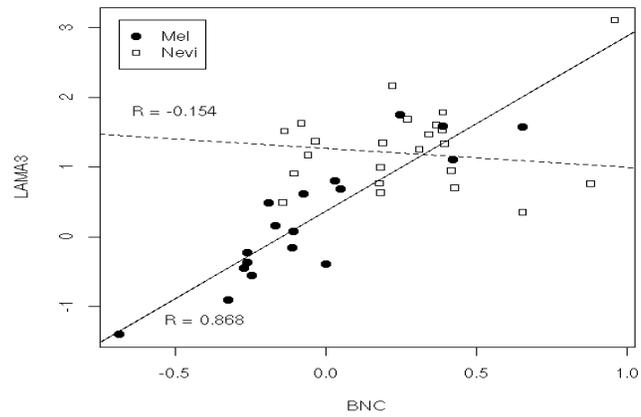
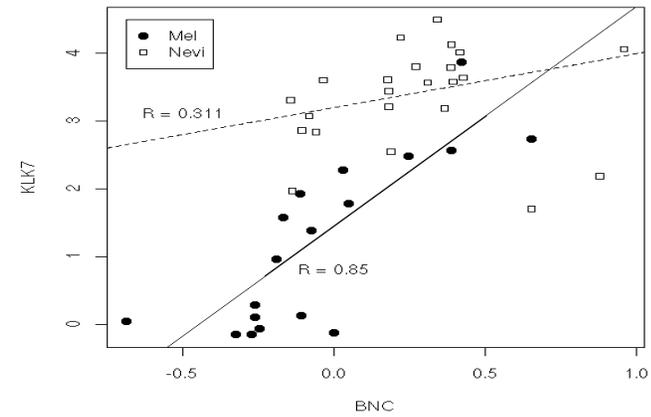
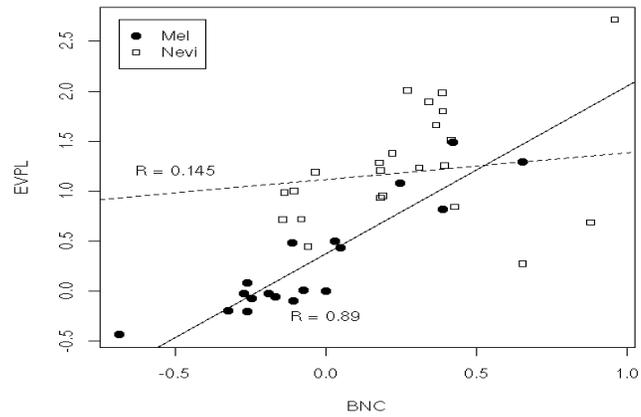
**Legenda:** Grafo da rede de relevância dos genes componentes do módulo de adesão. A primeira rede refere-se aos nevus, a segunda aos melanomas, e a terceira denota significância. A cor vermelha indica correlação positiva, e a cor verde indica correlação negativa. A espessura da linha é proporcional ao valor absoluto da correlação ente os pares de genes, e no último grafo a espessura é proporcional à significância do resultado.

**Figura 18** - Rede de relevância do módulo de adesão



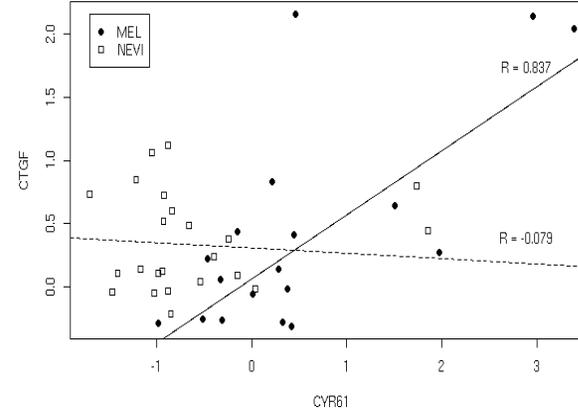
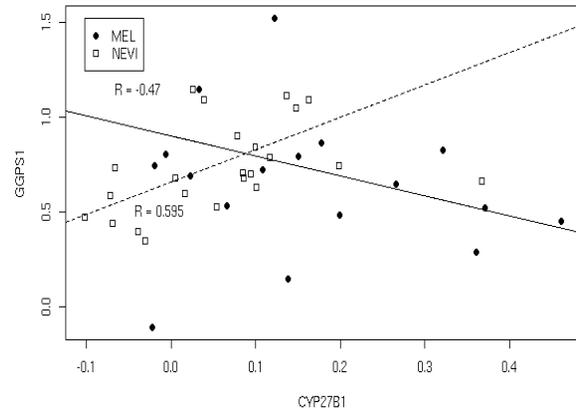
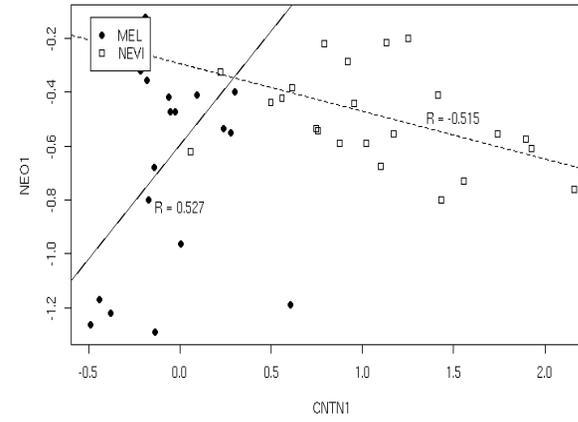
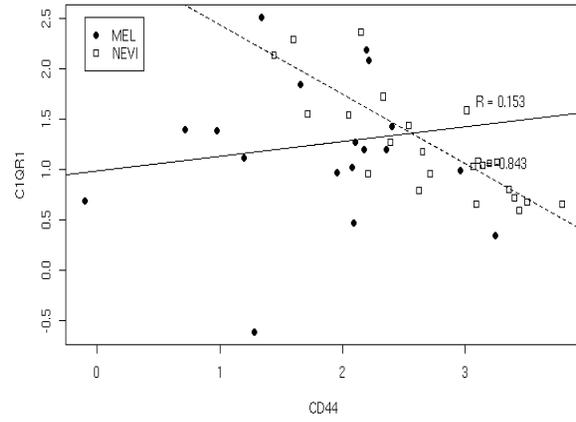
**Legenda:**– Gráfico de dispersão (scatter plot) mostrando a correlação na expressão do par de genes DSC3 e ARF6, onde se nota correlação positiva para este par de genes nas amostras de nevos, e quebra de correlação nas amostras de melanomas. R denota o valor da correlação na expressão entre o par de genes.

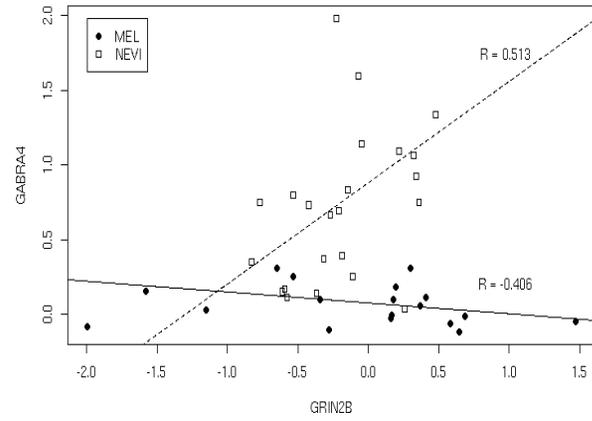
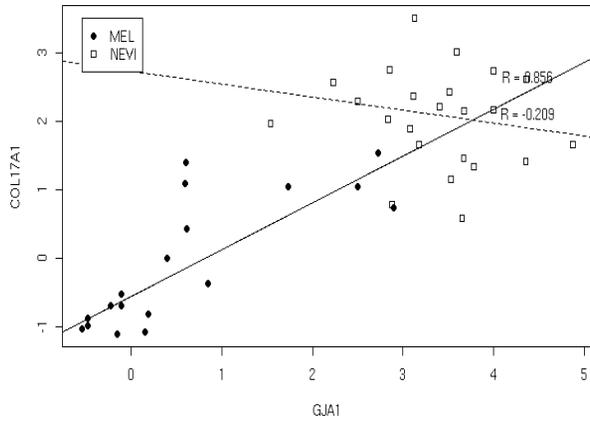
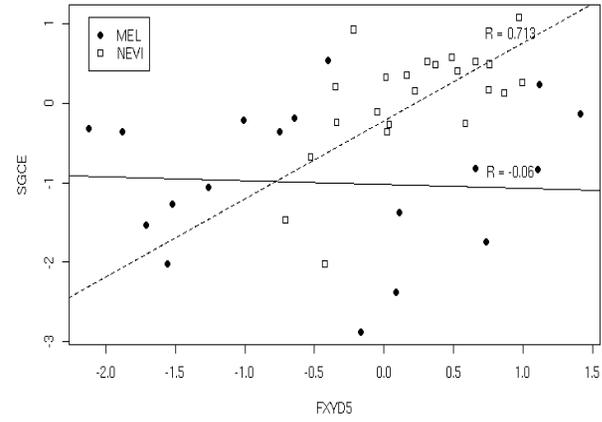
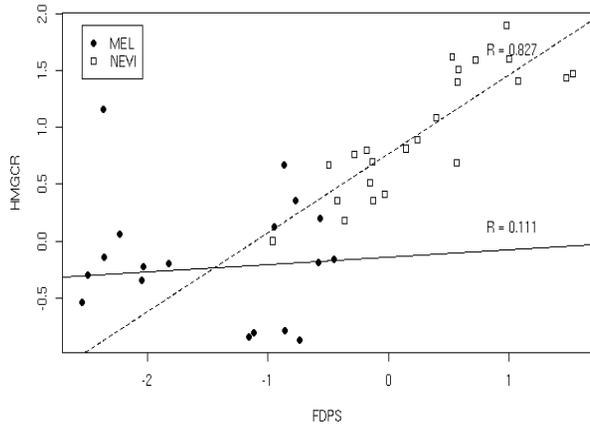
**Figura 19** - Scatter plot da correlação entre DSC3 e ARF6.

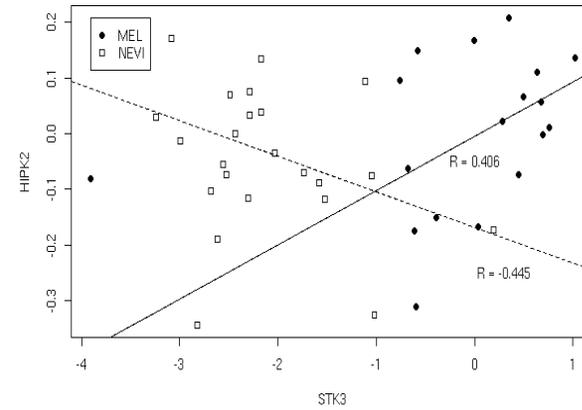
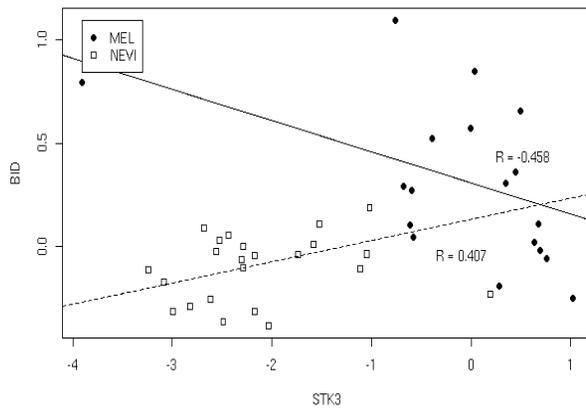
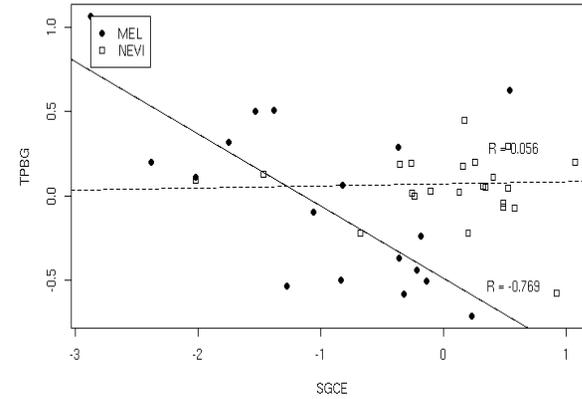
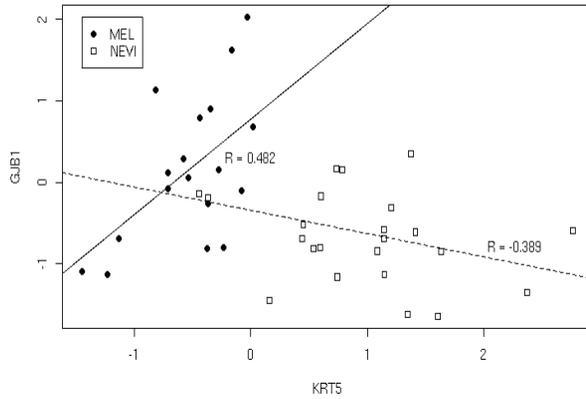


**Legenda:** Gráfico de dispersão (scatter plot) mostrando a correlação na expressão dos pares de genes BNCxEVPL, BNCxKLK7, BNCxLAMA3, LAMA3xKLK7. R denota o valor da correlação na expressão do par de genes.

**Figura 20** - Scatter plot de pares de genes de desenvolvimento da epiderme







**Legenda:** Gráfico de dispersão (scatter plot) mostrando a correlação na expressão dos pares de genes CD44x $C1QR1$ , CNTN1x $NEO1$ , CYP27B1x $GGPS1$ , CYR61x $CTGF$ , FDPSx $HMGCR$ , FXYD5x $SGCE$ , GJA1x $COL17A1$ , GRIN2Bx $GABRA4$ , KRT5x $GJB1$ , SGCEx $TPBG$ , STK3x $BID$ , STK3x $HIPK2$ . R denota o valor da correlação na expressão do par de genes.

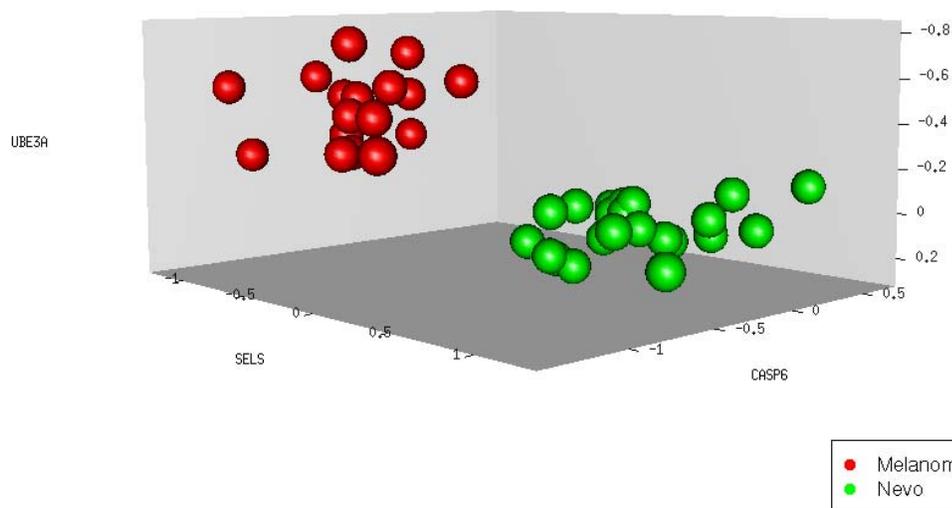
**Figura 21** - Scatter plot de alguns pares de genes de módulos alterados

Já a busca por classificadores foi realizada nos 125 grupos funcionais, e resultou em 510 trios de genes que, quando em combinação, foram capazes de distinguir corretamente nevos e melanomas com 100% de acerto.

A Tabela 8 mostra a relação dos 30 melhores trios construídos pelo Discriminador Linear de Fisher, ordenados pelo SVD (singular value decomposition), cujo valor é proporcional à eficiência do trio, medida através da condensação das nuvens dos 02 grupos no espaço tri-dimensional. O trio UBE3A (ubiquitin protein ligase E3A), SELS (selenoprotein) e CASP6 (caspase 6) está representado na Figura 22.

**Tabela 9** - Melhores trios classificadores.

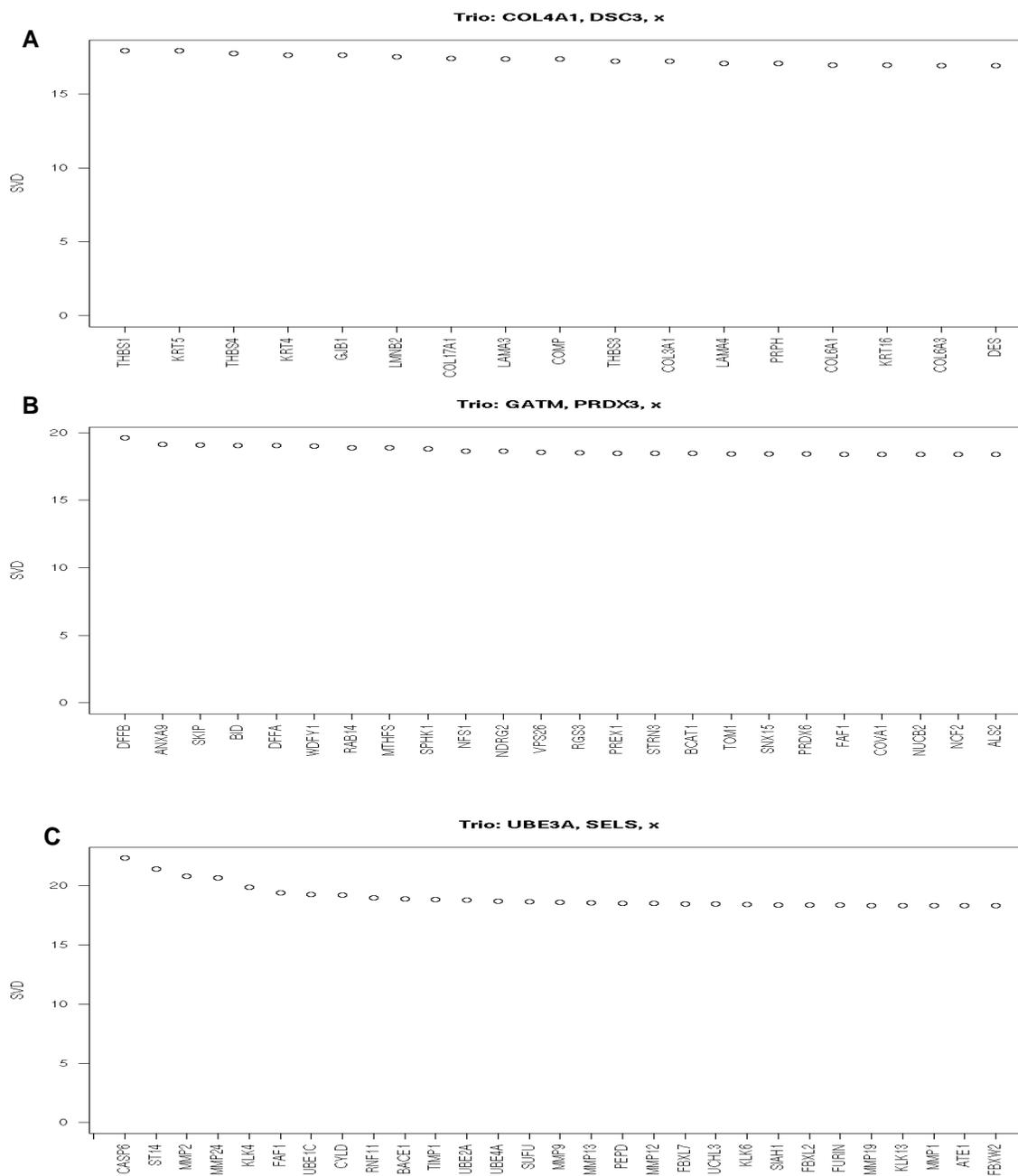
CV	SVD	TRIO
41	22	UBE3A, SELS, CASP6
41	20	UBE3A, SELS, KLK4
41	19	UBE3A, SELS, FAF1
41	19	UBE3A, SELS, CYLD
41	19	UBE3A, SELS, TIMP1
41	19	UBE3A, SELS, MMP13
41	19	UBE3A, SELS, BACE1
41	19	GATM, PRDX3, SKIP
41	19	GATM, PRDX3, NDRG2
41	19	GATM, PRDX3, SPHK1
41	19	GATM, PRDX3, WDFY1
41	18	UBE3A, SELS, FBXL7
41	18	UBE3A, SELS, FBXW2
41	18	UBE3A, SELS, MMP1
41	18	UBE3A, NRP2, STMN2
41	18	UBE3A, NRP2, OSTF1
41	18	COL4A1, DSC3, THBS1
41	18	COL4A1, DSC3, KRT5
41	18	COL4A1, DSC3, GJA1
41	18	COL4A1, DSC3, GJB1
41	18	NFKB2, ATM, PIK
41	18	NFKB2, ATM, RIPK1
41	18	CDC27, CUL1, CUL3
41	18	GATM, PRDX3, FAF1
41	18	GATM, PRDX3, RGS3
41	18	GATM, PRDX3, BCAT1
41	18	GATM, PRDX3, STRN3
41	18	GATM, PRDX3, COVA1
41	18	GATM, PRDX3, NCF2
41	18	CDC27, CUL1, CUL3



**Legenda:** Separação das amostras no espaço tri-dimensional, de acordo com a expressão coordenada do trio classificador UBE3A, SELS, CASP6, do módulo de proteólise.

**Figura 22** - Representação do trio classificador UBE3A, SELS e CASP6.

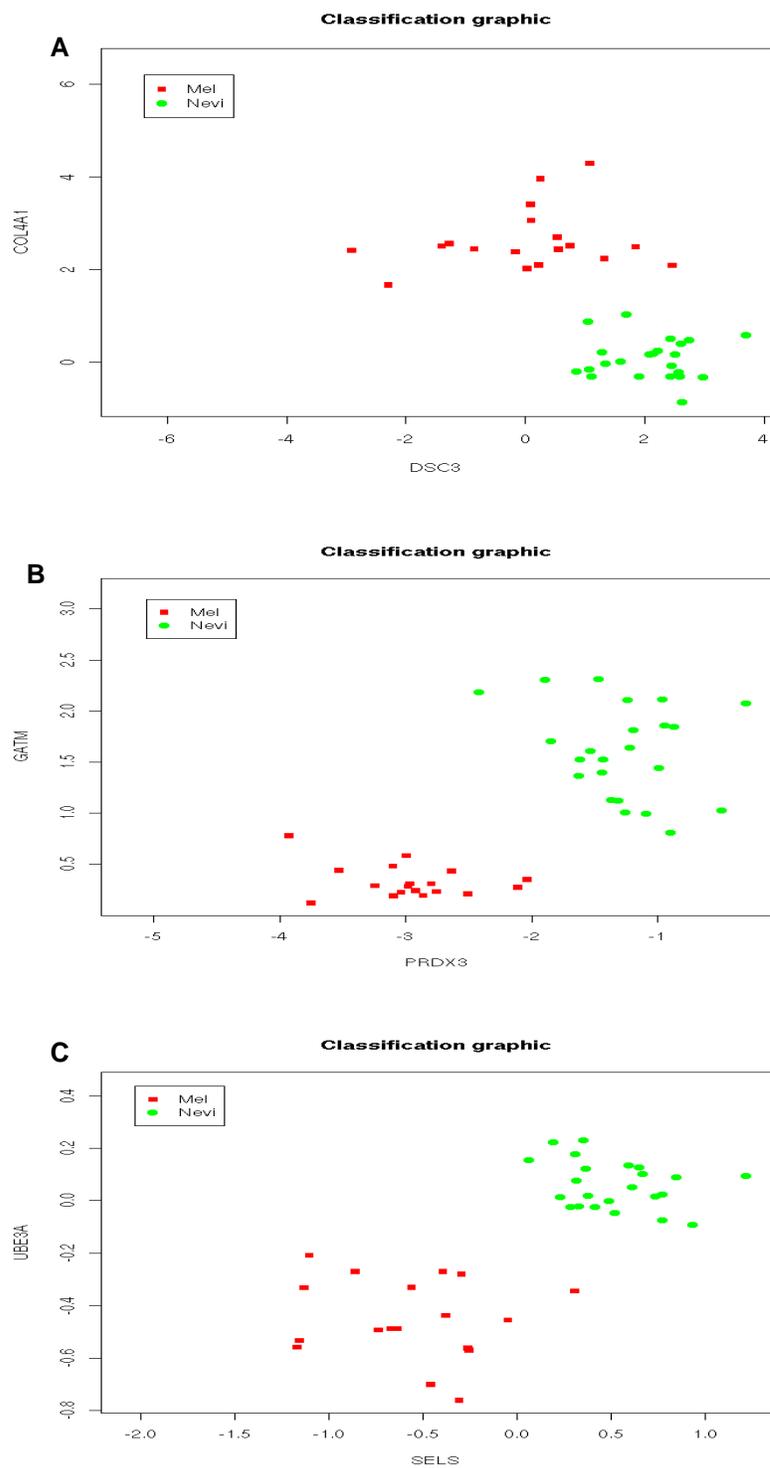
Nesta relação dos melhores trios, podemos observar que três pares de genes se repetem: UBE3A e SELS, GATM (glycine amidinotransferase) e PRDX3 (peroxiredoxin 3), e COL4A (colagen IV, alpha 1) e DSC3 (desmocollin 3). No intuito de estimar o potencial de classificação desses pares, e a contribuição do terceiro gene, foi feita a combinação das duplas de genes com o restante dos genes componentes do módulo (Figura 23). Esses dados (23a, b e c) mostram que, nos trios contendo os pares GATM e PRDX3, e COL4A e DSC3, a contribuição do terceiro gene é mínima, uma vez que o SVD se mantém quase constante em todas as combinações, portanto estas duplas são responsáveis pelo potencial de classificação dos trios. Já no caso de UBE3A e SELS, que possui os maiores SVDs, os genes CASP6, ST14, MMP2 e MMP24 contribuem para o aumento da eficiência do trio (23c).



**Legenda:** Combinação de duplas de genes com os genes restantes dos módulos, na distinção de amostras de nevus e melanomas. A- Genes GATM e PRDX3, módulo de citosol. B- Genes UBE3A e SELS, módulo de proteólise. C – Genes COL4A1 e DSC3, módulo de comunicação celular. No eixo y, está plotado o valor de SVD (eficiência do trio), de acordo com a adição do terceiro gene (eixo x) nas duplas de genes.

**Figura 23** - Análise da eficiência de classificação de duplas de genes.

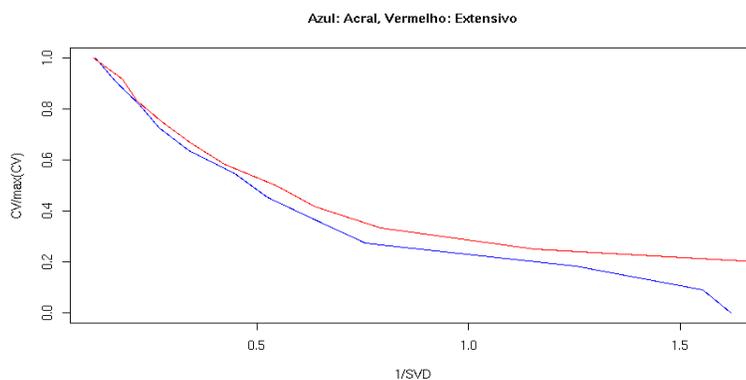
As três duplas de genes foram utilizadas para classificar nevos e melanomas, e as representações gráficas dos pares podem ser visualizadas na Figura 24. De acordo com os gráficos, as três duplas são capazes de separar nevos e melanomas. As duplas GATM x PRDX3 (Figura 24B) e UBE3A x SELS (Figura 24C) apresentaram correlação positiva, uma vez que ambos os genes contidos nas duplas apresentam expressão diminuída nos melanomas. Já no caso da dupla COL4A1 x DSC3, a correlação de expressão destes genes é negativa, uma vez que COL4A1 apresentou maior expressão em melanomas, enquanto DSC3 apresentou maior expressão nos nevos. Desta forma, a razão de expressão COL4A1/DSC3 é maior que 1 em melanomas, e menor que 1 nos nevos, e esse tipo de marcador apresenta a vantagem de não depender de normalizador.



**Legenda:** Representação das amostras de acordo com o padrão de expressão de pares de genes classificadores. A – COL4A1 x DSC3, B- GATM x PRDX3, C- UBE3A x SELS.

**Figura 24** - Análise da eficiência de classificação de duplas de genes.

Dados clínicos e da literatura (BEVONA et al. 2003) apontam para associação entre nevos precursores e melanoma extensivo superficial, e ausência de associação com melanoma acral. Com o intuito de confirmar esse comportamento em nossos dados, buscamos por trios classificadores entre nevos x melanomas acrais e nevos x melanomas extensivo superficiais nos módulos alterados. Os classificadores encontrados com seu respectivo CV e SVD foram plotados num gráfico, como exemplificado na Figura 25, referente ao módulo de motilidade celular, onde se observa a curva de comparação entre melanomas acrais e nevos acima da curva de comparação entre melanomas extensivo superficiais e nevos. Isso se deve a uma maior eficiência dos classificadores da comparação nevo x melanoma acral, como esperado, uma vez que quanto maior a diferença entre 02 conjuntos de dados, melhor será a eficiência do trio, corroborando a idéia de maior chance de nevos precursores na gênese de melanoma extensivo superficial, comparado ao melanoma acral.

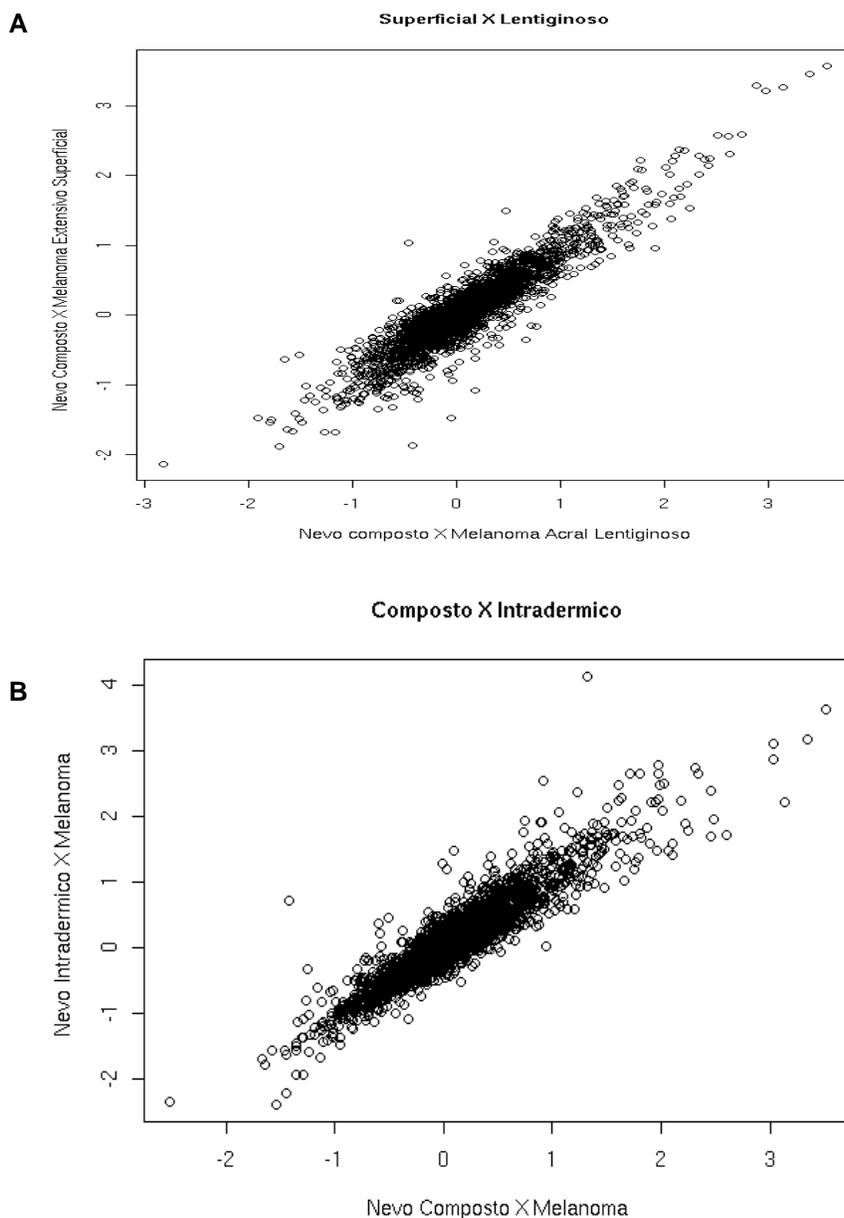


**Legenda:** Gráfico mostrando classificadores na comparação nevo x melanoma extensivo superficial (vermelho), e nevo x melanoma acral (azul). O número de acerto dos classificadores está representado no eixo y (CV/ímax(CV)) e a eficiência (1/SVD) está representada no eixo x.

**Figura 25** - Classificadores entre melanoma extensivo superficial x nevo, e melanoma acral x nevo.

Para entender as alterações moleculares que possam justificar este comportamento, foi feita a comparação nevo composto (05) x melanoma extensivo superficial (07) com nevo composto (05) x melanoma acral lentiginoso (06), e os genes com expressão alterada (fold absoluto > 1) foram plotados num gráfico de dispersão- scatter plot, onde foi feito um ajuste linear dos dados resultando numa reta de aproximação (Figura 26A). Os genes que se localizam nesta reta ou ao seu redor (dentro da região de erro) foram excluídos, de modo que os genes resultantes seriam aqueles menos correlacionados nas 02 comparações, portanto com comportamento diferente nos 02 subtipos de melanomas, como COL4A1, FLOT1 (flotillin 1), FLJ25084 (hypothetical protein FLJ25084), LOC56851 (chromosome 15 hypothetical ATG/GTP binding protein), PPIB (peptidylprolyl isomerase B -cyclophilin B) e HNRPF (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F).

O mesmo tipo de análise foi feito para a comparação nevos compostos totais (5) x melanomas extensivo superficiais com nevos intradérmicos (05 amostras selecionadas de modo a obter equivalência de critérios clínicos com os nevos compostos) x melanomas extensivo superficiais (07), e plotados no gráfico de dispersão (Figura 26B). Esta análise teve o intuito de identificar as diferenças moleculares entre os subtipos de nevos. Dentre os genes com comportamento diferente nas 2 comparações, destacam-se FAD104 (factor for adipocyte differentiation-104), PGD (phosphogluconate dehydrogenase), SFRP2 (secreted frizzled-related protein 2), PAK1IP1 (PAK1 interacting protein 1) e CLCA4 (chloride channel, calcium activated, family member 4) .



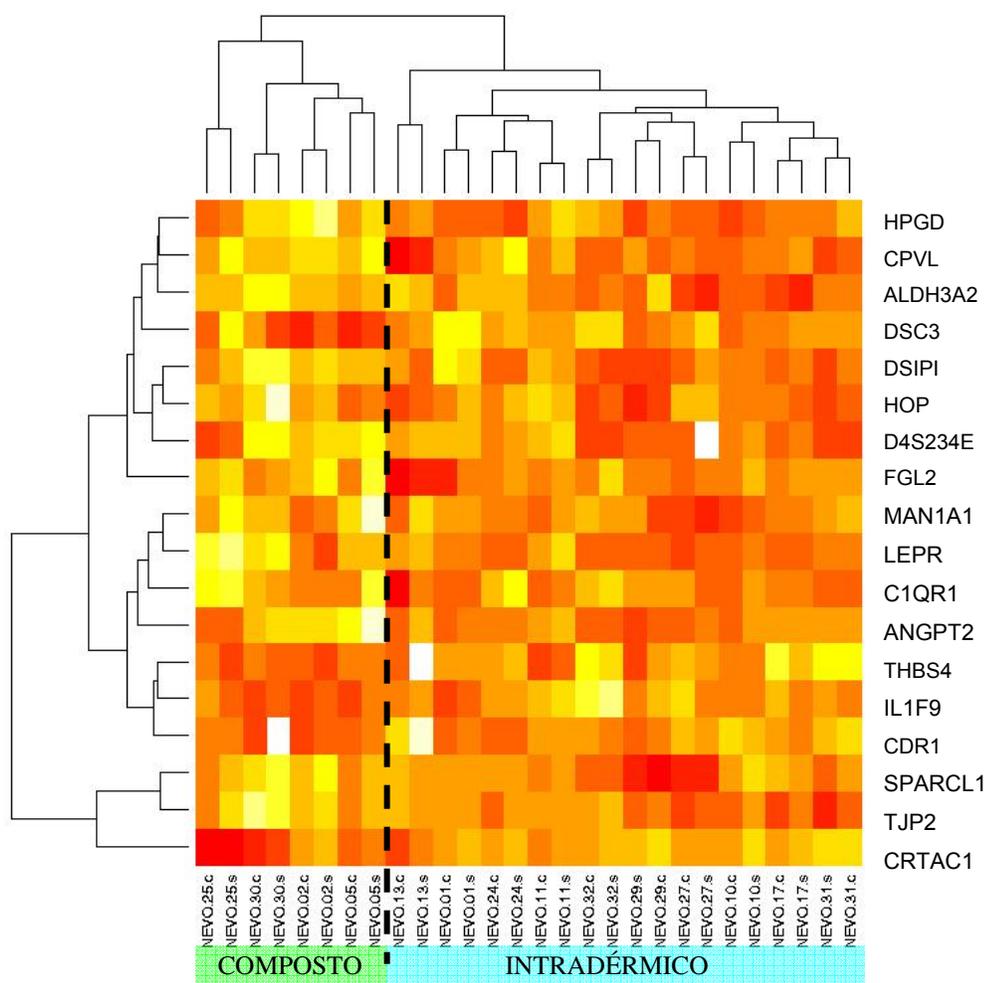
**Legenda:** **A** -Gráfico de correlação entre as comparações Nevo Composto x Melanoma Extensivo superficial com Nevo Composto x Melanoma Acral Lentiginoso. **B**- Gráfico de correlação entre as comparações Nevo Intradérmico x Melanoma com Nevo Composto x Melanoma.

**Figura 26** - Scatter plot da comparação Nevo Composto x Intradérmico e Melanoma Extensivo Superficial x Acral Lentiginoso

Considerando que agrupamentos não-supervisionados baseados na análise de todos os elementos da lâmina não mostraram diferenças significativas entre os subtipos de nevos, outra comparação entre nevos intradérmicos e nevos compostos foi feita através de um programa computacional desenvolvido por Diogo FC Patrão do Laboratório de Bioinformática do Hospital AC Camargo. Este programa possibilita o agrupamento de amostras segundo conjuntos de genes pré-selecionados. Em primeiro momento, foram identificados 13 genes positivamente regulados e 05 genes negativamente regulados ( $p$  valor  $\leq 0.05$  e Fold Change  $\geq 1.5$ ) na comparação entre 10 nevos intradérmicos e 04 nevos compostos (Tabela 9). Este conjunto de genes diferencialmente expressos foi utilizado na construção de um agrupamento hierárquico, e resultou na separação das amostras em 2 braços principais, segundo o subtipo de nevo (Figura 27). Para fins de validação por imuno-histoquímica, foi adquirido anticorpo comercial (R&D Systems) de receptor de leptina (LEPR- fold Intradérmico/Composto 1.644,  $p$ valor 0.025), que se mostrou igualmente positivo nos 02 subtipos de nevos.

**Tabela 10** - Genes diferencialmente expressos entre 10 nevos intradérmicos e 4 nevos compostos (pvalor  $\leq 0.05$ , fold change  $\geq 1.5$ ).

GenName	Annotation	Student	Fold
DSC3	desmocollin 3	0.049000	-1,62
MAN1A1	mannosidase, alpha, class 1A, member 1	0.027000	1,54
HPGD	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	0.011000	1,59
FGL2	fibrinogen-like 2	0.014000	1,68
HOP	homeodomain-only protein	0.043000	1,51
ANGPT2	angiopoietin 2	0.030000	2,29
CPVL	carboxypeptidase, vitellogenic-like	0.000000	1,57
SPARCL1	SPARC-like 1 (mast9, hevin)	0.035000	1,54
C1QR1	complement component 1, q subcomponent, receptor 1	0.029000	1,54
LEPR	leptin receptor	0.025000	1,64
ALDH3A2	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2	0.000000	1,89
D4S234E	DNA segment on chromosome 4 (unique) 234 expressed sequence	0.045000	1,79
CDR1	cerebellar degeneration-related protein 1, 34kDa	0.002000	-1,69
TJP2	tight junction protein 2 (zona occludens 2)	0.007000	1,63
THBS4	thrombospondin 4	0.011000	-1,57
CRTAC1	cartilage acidic protein 1	0.005000	-4,98
IL1F9	interleukin 1 family, member 9	0.001000	-1,59
DSIP1	delta sleep inducing peptide, immunoreactor	0.000000	1,52

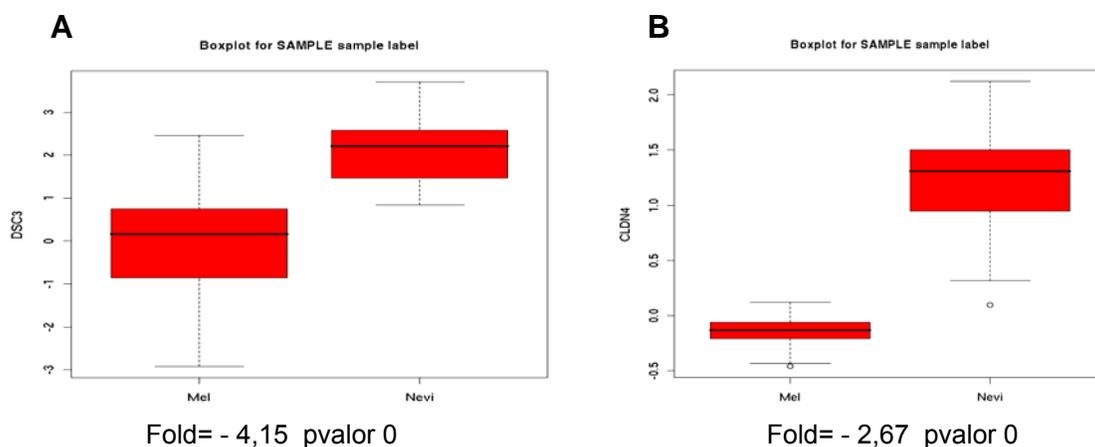


**Legenda:** Cluster Hierárquico construído baseado nos genes diferencialmente expressos entre nevos intradérmicos e compostos, listados na tabela 03. A cor vermelha indica genes positivamente regulados, a cor amarela indica genes negativamente regulados em nevos intradérmicos, e a cor branca indica ausência de leitura em um dos canais. Nevos intradérmicos – 01,10,11,13,17,24,27,29,31, e 32; Nevos compostos - 02, 05, 25 e 30.

**Figura 27** - Agrupamento hierárquico não-supervisionado de nevos intradérmicos e compostos.

## 4.6 VALIDAÇÃO POR RT-PCR

Dentre os genes diferencialmente expressos encontrados, e que compõem os módulos de adesão, junção e comunicação celular, todos reprimidos em melanomas, foram selecionados 02 genes com expressão diminuída em melanoma: DSC3 (Desmocolina 3, fold Melanoma/Nevo= -4,15, pvalor 0) e CLDN4 (Claudina 4, fold Melanoma/Nevo= -2,67, pvalor 0) (Figura 28 A e B) para fins de validação por RT-PCR.



**Legenda:** Boxplot mostrando a distribuição das amostras de nevos e melanomas de acordo com o valor de expressão de DSC3 (A) e CLDN4 (B) em relação ao RNA referência (eixo y).

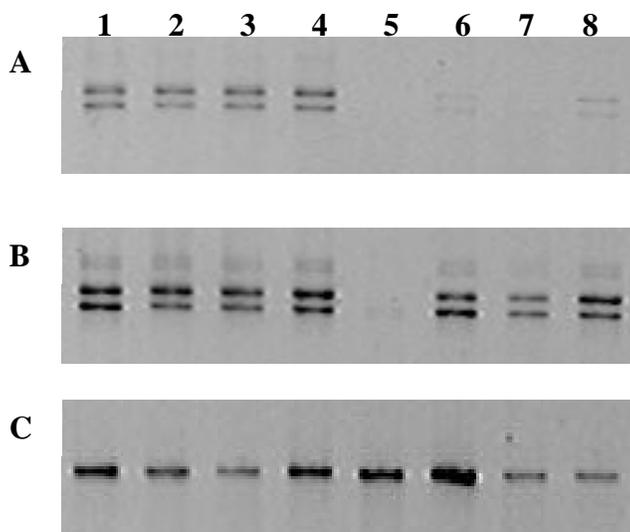
**Figura 28** - Boxplot de DSC3 e CLDN4

A desmocolina 3 é componente das junções desmossômicas promovendo adesão célula-célula, além de contribuir para o posicionamento (estratificação) das células da epiderme (KURZEN et al. 1998). O gene DSC3 possui 02 isoformas, uma constituída pelos 17 éxons do gene, e outra isoforma menor, pela ausência do éxon 16 (43pb). A seqüência resultante do seqüenciamento do clone ORESTES de DSC3 depositado no biochip foi submetido ao alinhamento pelas ferramentas BLASTN (disponível online em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e BLAT (disponível on line em: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>), e ambos resultaram no alinhamento com DSC3 humana. A seqüência depositada no nosso biochip está localizada no éxon 17, comum às 02 isoformas, portanto os iniciadores para RT-PCR foram desenhados nos éxons 15 e 17 de modo a promover a amplificação das 02 isoformas.

Conforme mostra a Figura 29 só é possível observar banda em 3 melanomas após 30 ciclos de amplificação, ao passo que os nevos apresentam bandas com 25 ciclos de amplificação, corroborando o dado obtido por array, de que DSC3 está diminuída (em nível transcricional) nos melanomas.

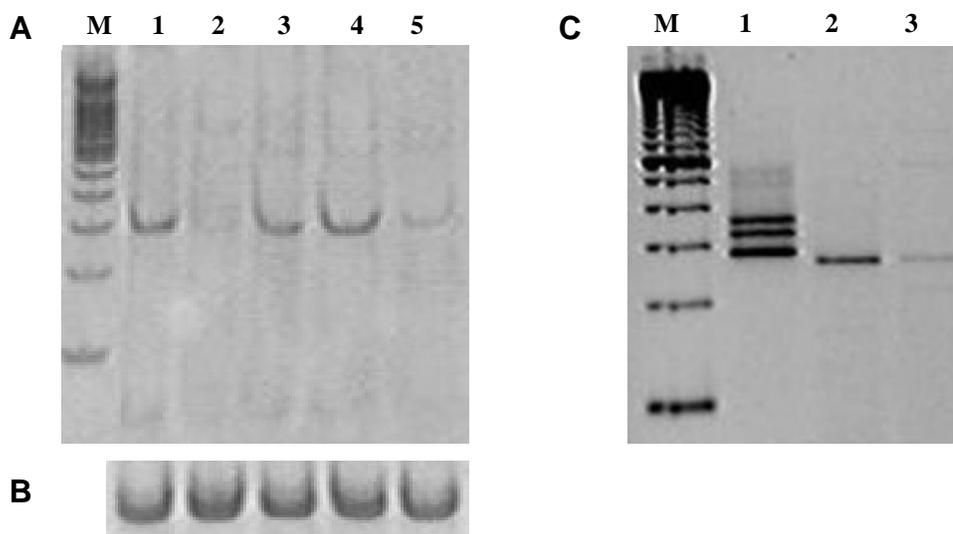
Entretanto, existia possibilidade deste resultado ser falso-positivo em função de RNA de queratinócito contaminante, uma vez que nossa dissecção foi manual e desmocolina 3 é expressa por queratinócitos e está envolvida no processo de diferenciação da epiderme. Para confirmar a expressão deste gene em células melanocíticas, foram também realizados experimentos de RT-PCR

em RNAs obtidos de linhagens de melanoma humano SKMel5, SKMel19, SKMel28, SKMel37 e SKMel188 (gentilmente cedidos por Ana Helena Pagotto), e RNA de cultura primária de queratinócito humano isolado de prepúcio (gentilmente cedido por Dra Lara Termini). A Figura 30A mostra expressão da isoforma menor de DSC3 em 3 das linhagens de melanoma testadas e fraca expressão em 02 das linhagens, após 35 ciclos de amplificação, enquanto a Figura 30C mostra a expressão de 03 isoformas de DSC3 na linhagem de queratinócito, após 25 ciclos de amplificação. Entretanto, a expressão da isoforma maior nas amostras do nosso conjunto de dados ainda poderia ser indicativo de RNA de queratinócito contaminante, e esta hipótese poderia ser avaliada pela utilização de microdissecção por captura a laser.



**Legenda:** Imagem eletroforética em gel de agarose NuSieve das amostras 1-4 (nevus 32, 34, 36 e 38) e 5-8 (melanomas 49,62,111 e 115), submetidos a RT-PCR para DSC3. **A** – 25 ciclos de amplificação, **B** - 30 ciclos de amplificação, **C** – Beta-actina, 25 ciclos de amplificação.

**Figura 29** - Validação por RT-PCR de DSC3



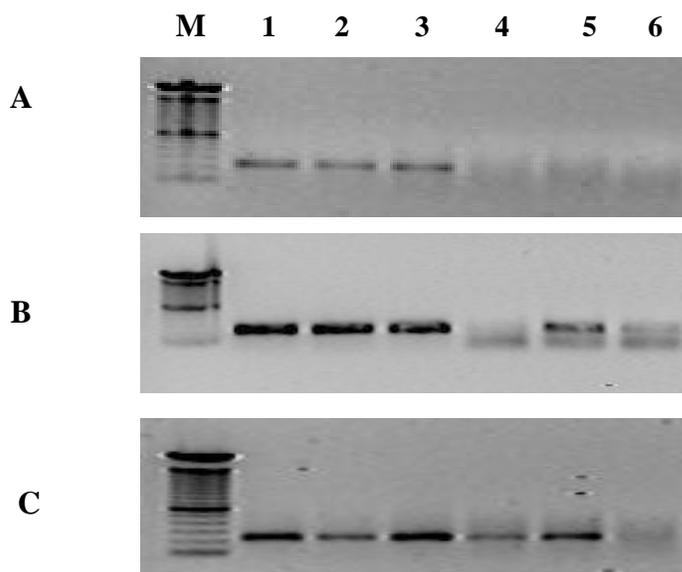
**Legenda:** **A** – Imagem eletroforética em gel de poliacrilamida do produto de RT-PCR de DSC3 de linhagens de melanoma humano. **1**- SKMel 5, **2** - SKMel 19, **3** - SKMel28, **4** - SKMel37, **5** - SKMel188, **M** -100bp ladder; **B** – beta-actina; **C** – Imagem eletroforética em gel de agarose Nusieve do produto de RT-PCR de DSC3. **M** – 100bp ladder, **1**- cultura primária de queratinócito, **2** - linhagem de melanoma SKMel 28, **3** – linhagem de melanoma SKMel 188.

**Figura 30** - RT-PCR de DSC3 em linhagens de melanoma e cultura primária de queratinócito.

Claudina 4 (CLDN4) é uma proteína transmembrana envolvida em adesão célula-célula, sendo o principal componente das junções oclusivas (*tigh junctions*). O gene CLDN4 é constituído por apenas um éxon, fato que dificulta as análises por RT-PCR, pela impossibilidade de detecção de uma possível contaminação com DNA genômico. A alternativa adotada para minimizar esse efeito foi o uso de RNA amplificado, uma vez que a metodologia de amplificação permite o enriquecimento linear da população de RNAs

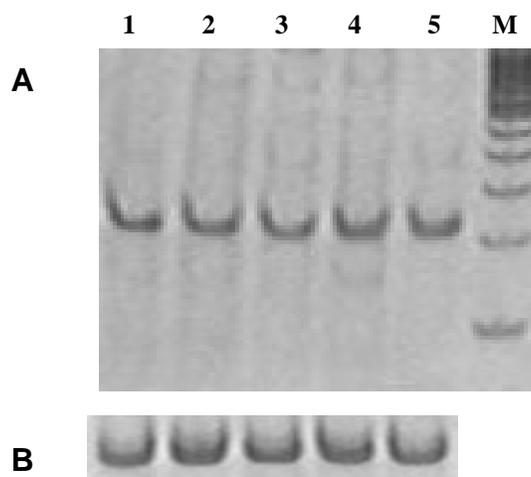
mensageiros, ao mesmo tempo em que dilui a contaminação por DNA genômico. A confiabilidade de dados gerados por RNA amplificado em experimentos de RT-PCR para detecção de translocação cromossômica foi demonstrado recentemente por SCHUMACHER et al. (2004). Como controle de contaminação, foi realizada reação de transcrição reversa sem enzima e posterior PCR para CLDN-4 utilizando aRNA, em que a presença de banda seria indicativo de contaminação por DNA. Nos casos de amostras contaminadas, o tratamento em coluna RNAspin Mini (GE Healthcare) foi eficiente na remoção do DNA.

Conforme pode ser visto na Figura 31, com 30 ciclos de amplificação há presença da banda nos nevus, que não é observada nos melanomas, e com 40 ciclos de amplificação começa a ser visualizada banda nos melanomas, confirmando a diminuição da expressão de CLDN4 nos melanomas. O RT-PCR também foi feito para linhagens de melanoma humano, como descrito para DSC3, e está representada na Figura 32, onde se nota expressão em todas as linhagens.



**Legenda:** Imagem do perfil eletroforético em gel de agarose NuSieve das amostras 1-3 (nevus 32,36 e 38) e 4-6 (melanomas 49,62 e 115), M= 100bp ladder **A** – 30 ciclos de amplificação, **B** - 40 ciclos de amplificação, **C** – Beta-actina, 25 ciclos de amplificação.

**Figura 31** - Validação de CLDN4 por RT-PCR



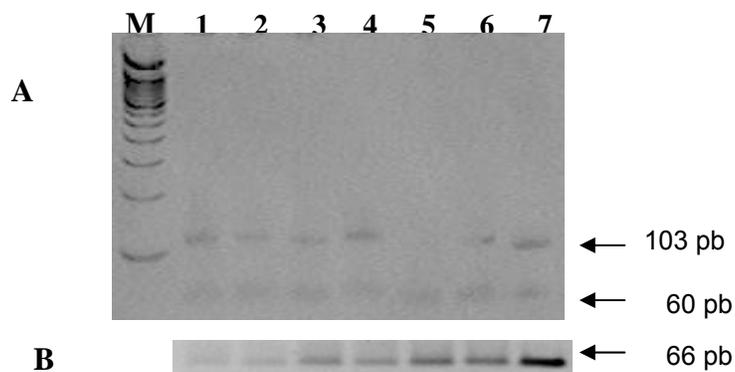
**Legenda:** **A** – Imagem eletroforética em gel de poliacrilamida do produto de RT-PCR de CLDN4 de linhagens de melanoma humano. 1- SKMel 5, 2 - SKMel 19, 3 - SKMel28, 4 - SKMel37, 5 - SKMel188, **M** - 100bp ladder; **B**- Beta-actina.

**Figura 32** - RT-PCR de CLDN4 em linhagens de melanoma

#### 4.6.1 RT-PCR de DSC3 em amostras microdissecadas a laser

A microdissecção por captura a laser foi realizada para 04 amostras de nevos do conjunto de dados (Nevo 31, 32, 34 e 36), dos quais o nevo 36 foi dissecado para melanócitos névicos e para queratinócitos, separadamente. Capturamos cerca de 850 células por amostra, e obtivemos um rendimento médio de 43ng de RNA total, que foi submetido à reação de RT.

Pudemos detectar amplificação da menor isoforma em todas as amostras, e amplificação da isoforma maior em 02 nevos e no queratinócito, como mostrado na Figura 33.



**Legenda:** A - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida do produto de RT-PCR de DSC3 de amostras microdissecadas a laser. B – RT-PCR de beta-actina. M= marcador 100bp, 1 e 2= Nevo 36, 3= Nevo 32, 4= queratinócito do nevo 36, 5= Nevo 34, 6= Nevo 31, 7= controle positivo (nevo 38 dissecado manualmente).

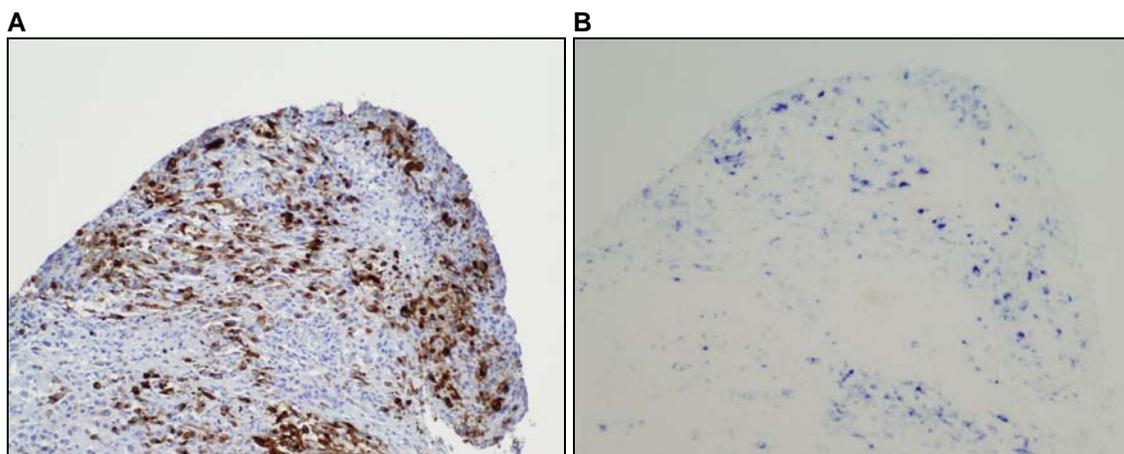
**Figura 33** - RT-PCR de DSC3 em amostras microdissecadas a laser.

#### 4.7 VALIDAÇÃO POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foram feitos testes com métodos alternativos de detecção cromogênica, uma vez que a detecção rotineiramente utilizada, pelo sistema DAB (marrom) pode ser prejudicada durante a leitura da lâmina pelos pigmentos melânicos das lesões melanocíticas. Os testes com o cromógeno BCIP/NBT/INT em condições rotineiras não se mostraram satisfatórios, o Fast Red foi utilizado com sucesso em algumas reações, assim como o Naftol, cuja comparação com o sistema DAB pode ser visualizada na Figura 34.

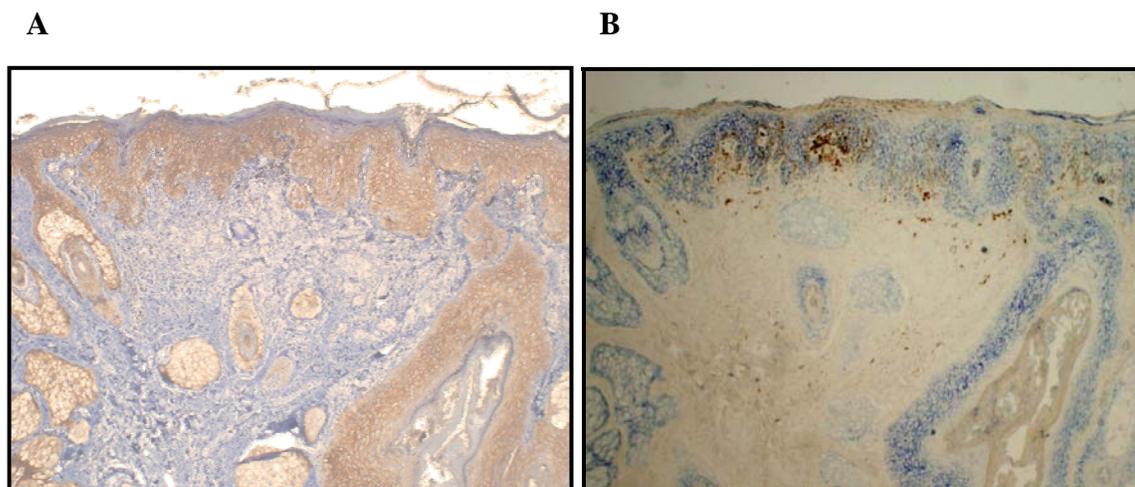
As reações para DSC3 no sistema DAB mostraram fraca coloração citoplasmática nos ninhos névicos, enquanto a epiderme se apresentou fortemente corada na membrana, como mostra a Figura 35. Quando este mesmo corte foi corado pelo sistema Naftol, os ninhos névicos não apresentaram marcação.

Foram feitas reações de imunocitoquímica para DSC3 e CLDN4 em duas das linhagens de melanoma humano (SKMel 28 e SKMel188, Figuras 36 e 37) utilizadas nos experimentos de RT-PCR, para confirmar expressão em células melanocíticas.



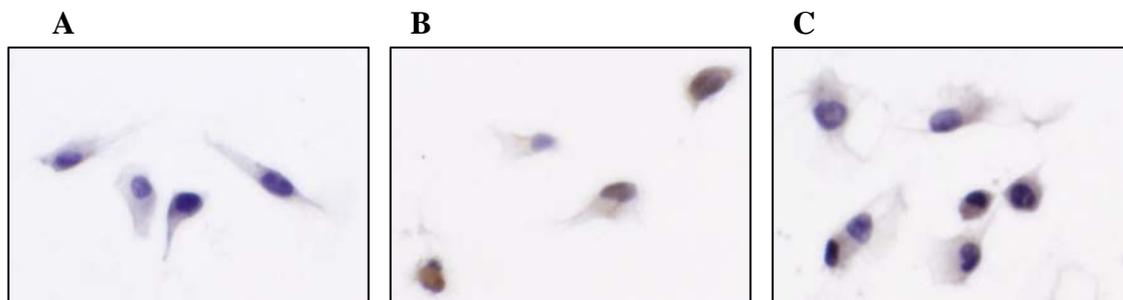
**Legenda:** Imuno-histoquímica de HMB45 em amostra de melanoma pigmentado. **A** – Detecção cromogênica pelo sistema DAB, **B** – Detecção pelo sistema Naftol. AUMENTO 100x.

**Figura 34** - Teste de detecção cromogênica



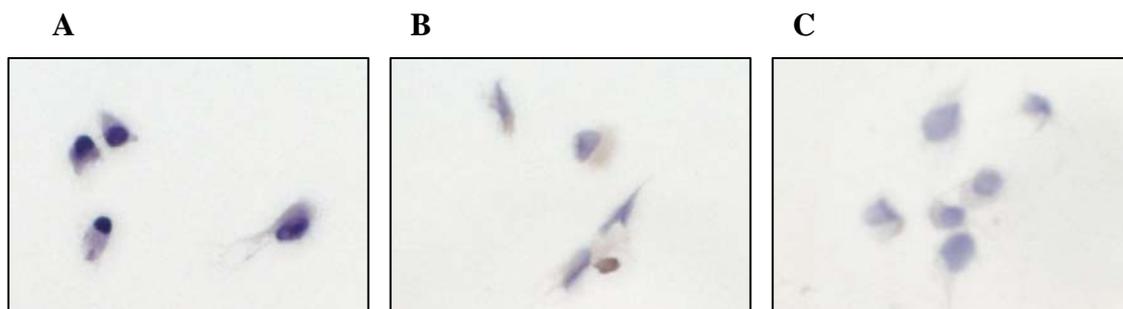
**Legenda:** Imuno-histoquímica de DSC3 em amostra de nevo composto, mostrando fraca marcação nos ninhos névicos no sistema DAB, e ausência de marcação nos ninhos névicos no sistema Naftol. **A**– Detecção pelo sistema DAB, **B** – Detecção pelo sistema Naftol. AUMENTO 100x.

**Figura 35** – Imuno-histoquímica de DSC3 em nevos



**Legenda:** Imunocitoquímica em linhagem de melanoma humano SKMel28. **A** – BSA, **B** – Claudina 4, **C** – Desmocolina 3. AUMENTO 400x.

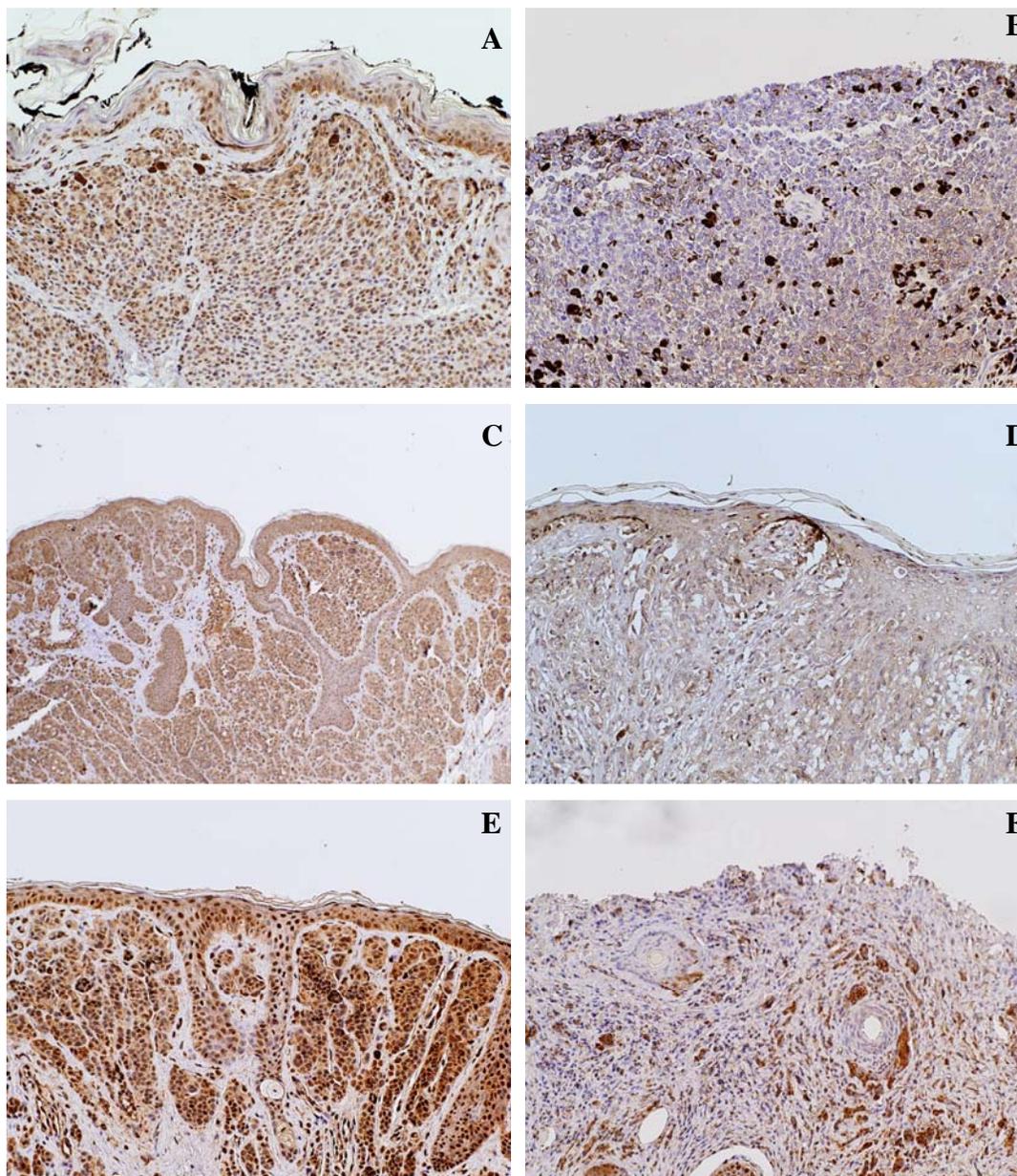
**Figura 36** – Imunocitoquímica de DSC3 e CLDN4 em linhagem SKMel28



**Legenda:** Imunocitoquímica em linhagem de melanoma humano SKMel188. **A** – BSA, **B** – Claudina 4, **C** – Desmocolina 3. AUMENTO 400x.

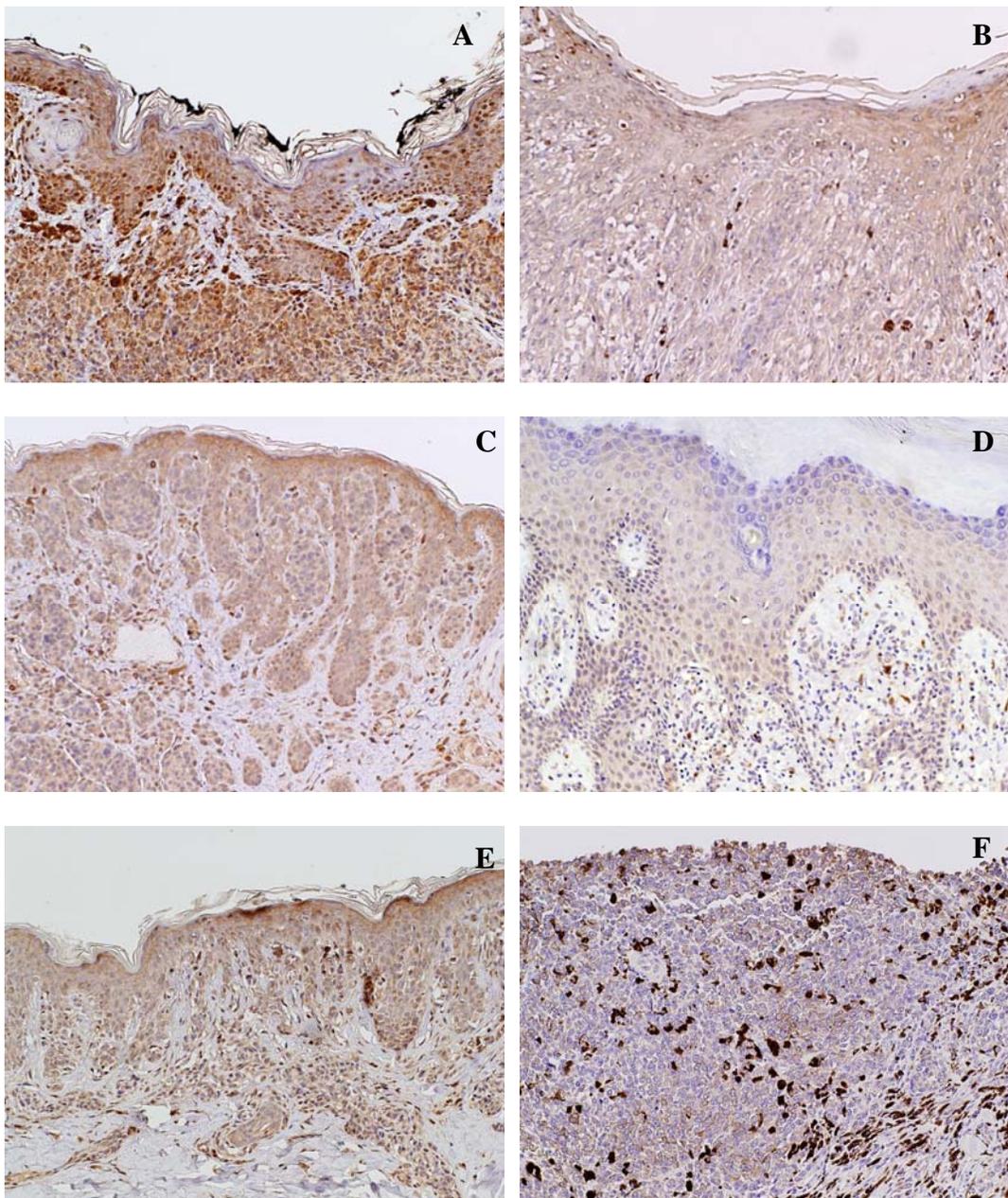
**Figura 37** - Imunocitoquímica de DSC3 e CLDN4 em linhagem SKMel188

As reações de imuno-histoquímica para claudina 4 (CLDN4, Mel/Nevo= - 2.66) se mostraram inconclusivas nos nevos, e resolvemos avaliar claudinas 1, 3, 5, 7 e 11, cujos anticorpos estavam disponíveis no Hospital AC Camargo, ou foram gentilmente cedidos por Dr José Andrés Morgado- Diaz (INCA). Claudinas 1, 3 e 5 foram negativas nos ninhos névicos e nos melanomas, enquanto claudinas 7 e 11 foram positivas em nevos e melanomas, com maior intensidade em nevos (Figuras 38 e 39).



**Legenda:** Imuno-histoquímica de Claudina 7 em nevos (A, C e E ) e melanomas (B, D e F), mostrando marcação mais intensa nos nevos. Sistema DAB, AUM 200x.

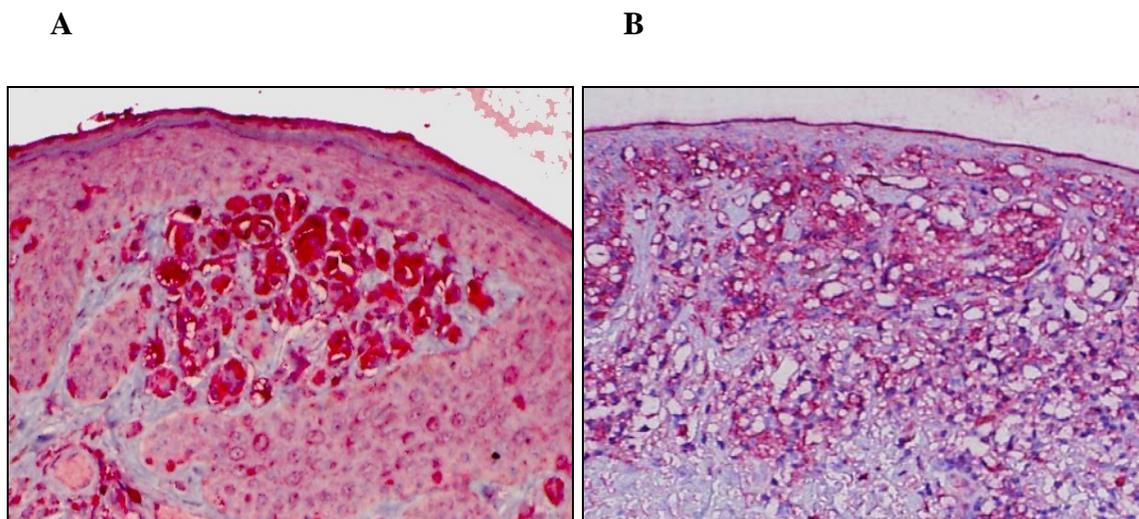
**Figura 38** - Imuno-histoquímica de Claudina 7.



**Legenda:** Imuno-histoquímica de Claudina 11 em nevos (A, C e E ) e melanomas (B, D e F ), mostrando marcação mais intensa nos nevos. AUMENTO 200x

**Figura 39** – Imuno-histoquímica de Claudina 11.

Kalikreína 7 é componente do módulo de diferenciação da epiderme, que teve *status* reprimido em melanoma. Este gene apresentou razão de expressão Melanoma/Nevo= -4.39 e valor de  $p=0$ , e foi selecionado para validação por imuno-histoquímica. As reações para KLK7 foram feitas com a utilização do cromógeno Fast Red, e estão representadas na Figura 40, onde é possível observar a marcação nos ninhos névicos (mais intensa que na epiderme), e uma marcação mais fraca na amostra de melanoma, corroborando o dado obtido pelo array. Já KLK3 e KLK6 (fold Melanoma/Nevo= -1.53,  $p$ valor 0.027) no sistema Naftol e DAB se mostraram negativas em nevos e melanomas.

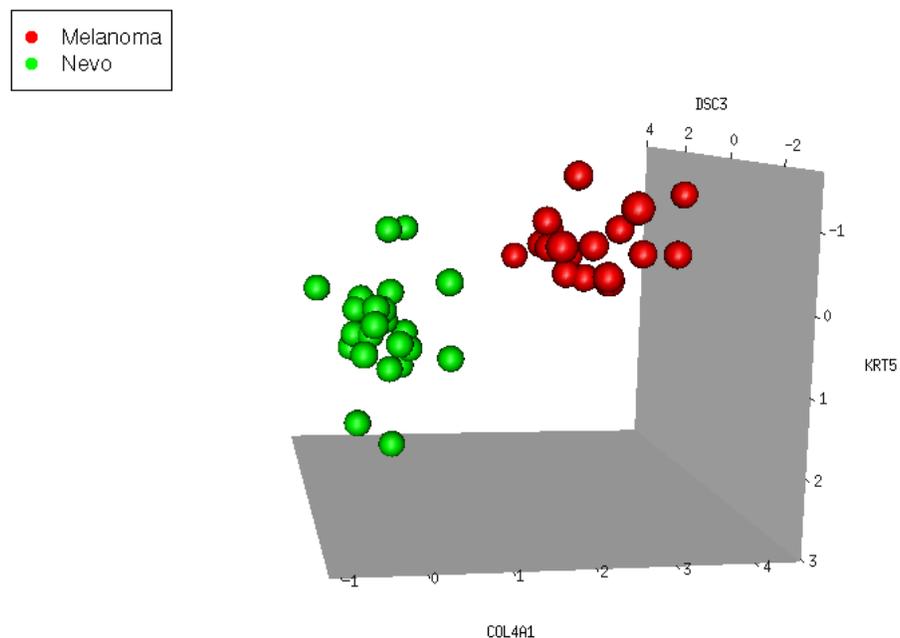


**Legenda:** Imuno-histoquímica de KLK7 no sistema Fast Red, mostrando marcação mais intensa nos ninhos névicos. A- Nevo, B- Melanoma. AUMENTO 400x

**Figura 40** - Validação por imuno-histoquímica de KLK7.

#### 4.7.1 Tentativa de validação do trio classificador COL4A1, DSC3, KRT5

O trio COL4A1, DSC3, KRT5 (Figura 41) foi escolhido para validação por imuno-histoquímica em função da disponibilidade de anticorpos, entretanto as reações para colágeno IV foram negativas nos nevos e melanomas, impossibilitando a validação deste trio. A expressão protéica de queratina 5 foi positiva em 02 nevos, negativa em 4 nevos e negativa em 6 amostras de melanomas.



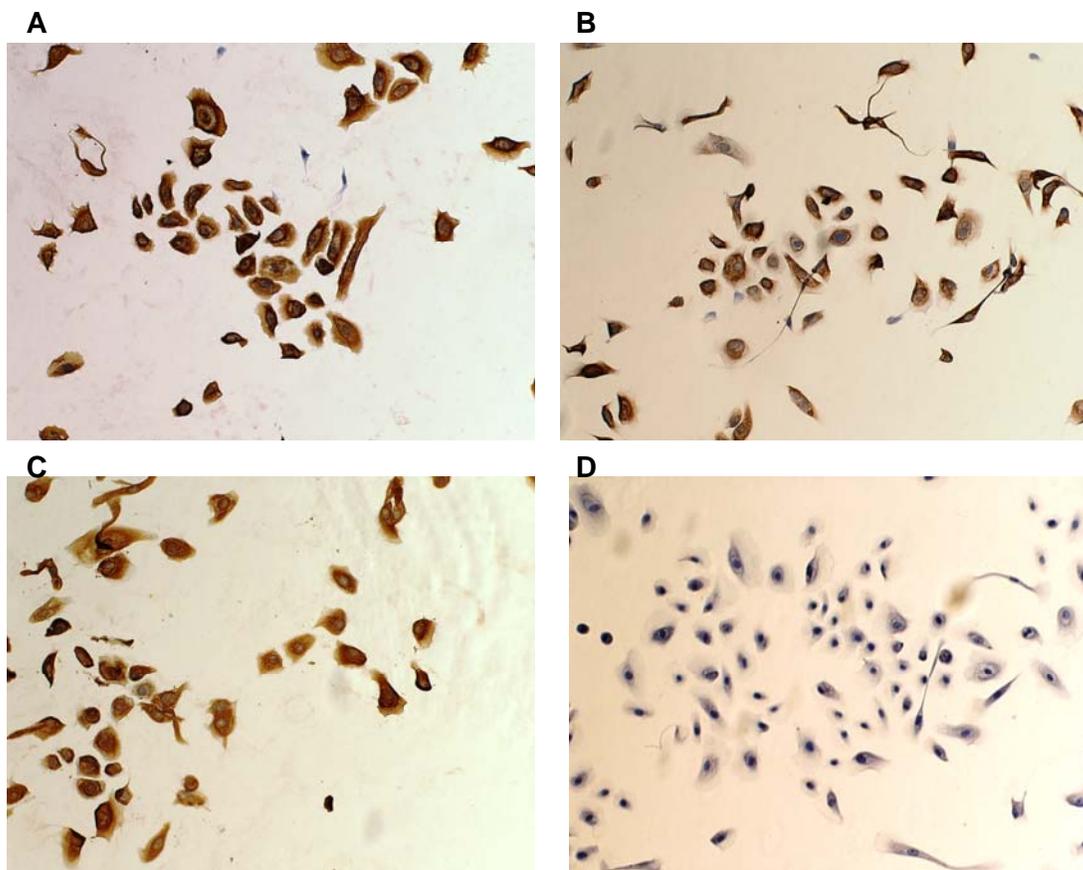
**Legenda:** Separação das amostras no espaço tri-dimensional, de acordo com a expressão coordenada do trio classificador DSC3, KRT5, COL4A1, do módulo de comunicação celular.

**Figura 41** - Representação do trio classificador DSC3, KRT5 e COL4A1.

#### **4.8 ISOLAMENTO DE CÉLULAS DE PREPÚCIO E SUA UTILIZAÇÃO EM EQUIVALENTE ARTIFICIAL DE PELE**

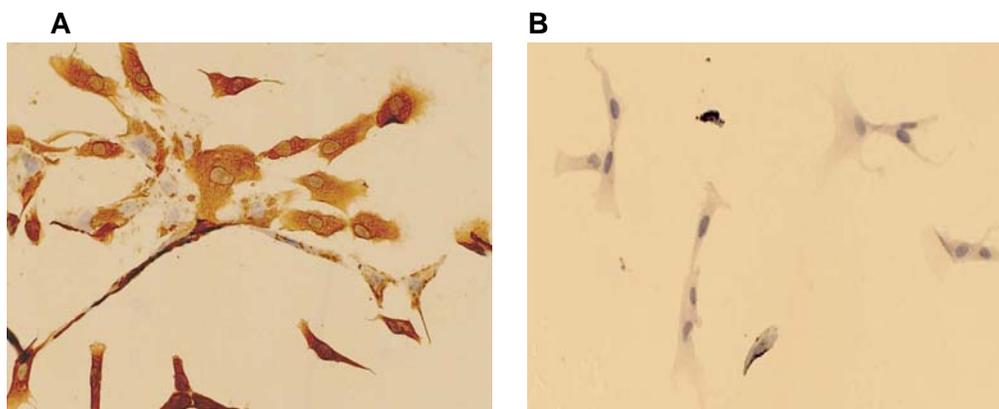
Para a implementação da metodologia de equivalente artificial de pele, obtivemos cultura primária de queratinócito e fibroblasto normal humano, e as células foram avaliadas por imunocitoquímica, com marcadores de queratinócito e fibroblasto (Figuras 42 e 43).

Estas células foram utilizadas na construção de equivalente artificial de pele (Figura 44A) onde a estrutura da pele foi artificialmente reconstituída, e também em presença de linhagem de melanoma humano Mewo (Figura 44B), onde se nota a presença de um tumor na junção dermo-epidérmica e na intraderme. O experimento de imuno-histoquímica de Melan A confirmou a origem melanocítica da lesão (Figura 45), mostrando que este sistema pode ser utilizado para estabelecimento de tumor *in vitro*.



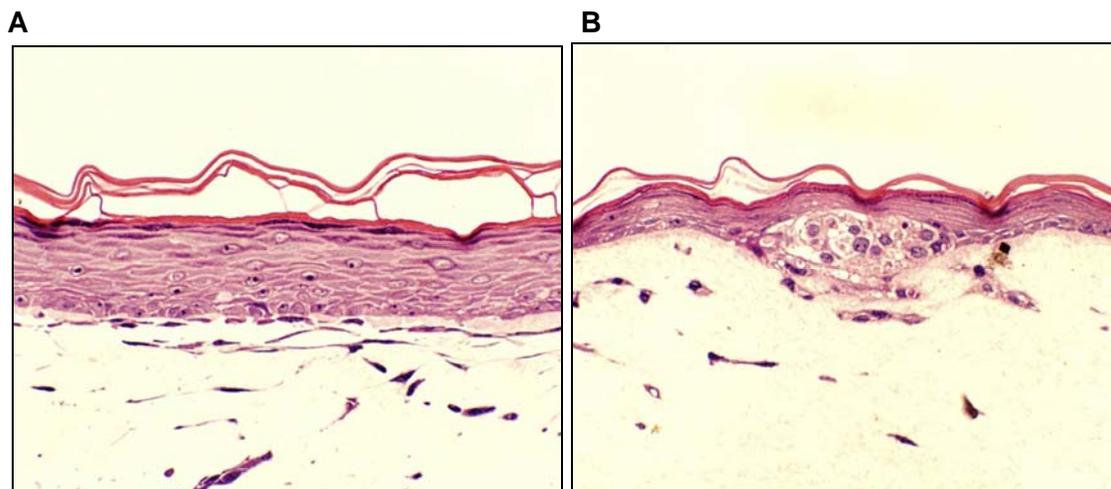
**Legenda:** Imunocitoquímica de queratinócitos cultivados em LabTek. A – citoceratinas de baixo peso molecular, B - citoceratinas de alto peso molecular, C - pool de citoceratinas, D – BSA. AUMENTO 200x.

**Figura 42** – Imuno-histoquímica de queratinócito isolado de prepúcio.



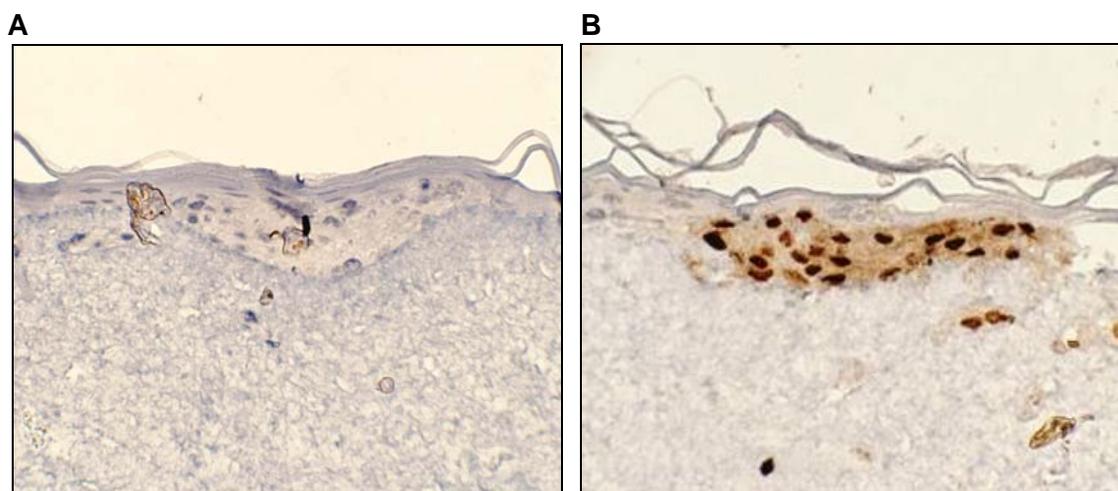
**Legenda:** Imunocitoquímica de fibroblastos cultivados em LabTek. A – vimentina, B – BSA. AUMENTO 400x.

**Figura 43** - Imuno-histoquímica de fibroblasto isolado de prepúcio.



**Legenda:** Coloração HE de equivalente artificial de pele. A –Queratinócito humano normal semeado em matriz de colágeno contendo fibroblasto humano normal. B- Queratinócito humano normal semeado em presença de linhagem de melanoma Mewo em matriz de colágeno contendo fibroblasto humano normal. AUMENTO 400x.

**Figura 44** - Equivalente artificial de pele.



**Legenda:** Imuno-histoquímica de Melan A de equivalente artificial de pele construído com queratinócito e fibroblasto humano normal na presença de linhagem de melanoma humano Mewo. A- BSA, B- Melan A. AUMENTO 400x.

**Figura 45** - Imuno-histoquímica de Melan A.

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo a técnica de *cDNA microarrays* foi adotada para análise das alterações no perfil de expressão gênica entre 23 nevos e 18 melanomas primários.

A casuística inicialmente proposta (30 nevos intradérmicos e 30 nevos compostos) não foi alcançada, embora a exérese de nevos seja uma atividade rotineira no Hospital AC Camargo. Acreditamos que a necessidade de certeza da ausência de atipia na lesão contribuiu para redução do número de casos que se encaixaram no projeto, além da necessidade de suspeita de malignidade para indicação de remoção cirúrgica através dos convênios. Além disso, muitas amostras foram descartadas durante o processo de semi-microdissecção manual devido à pequena quantidade de célula névica na peça cirúrgica.

Houve uma discrepância na amostragem dos subtipos de nevos, com maior frequência de nevos intradérmicos, comprometendo a comparação, embora se tenha feito um esforço na tentativa de coletar nevos compostos, para equilibrar a casuística. Não foi possível comparar os subtipos de nevos de acordo com seu padrão (congenito ou adquirido) pelo comprometimento no poder estatístico em função do baixo número de casos. A comparação entre nevos adquiridos totais com nevos de padrão congênito totais não resultou em genes diferencialmente expressos com significância estatística.

Os nevos juncionais não foram incluídos na casuística por estarem confinados à junção dermo-epidérmica, apresentando baixa quantidade de células névicas para o estudo, e também pela maior chance de contaminação por epiderme durante a dissecação. Já nevos atípicos não puderam ser utilizados por se tratarem de lesões com maior potencial de malignização, que necessitam ser avaliados na sua totalidade pelo Departamento de Anatomia Patológica, para definição do diagnóstico.

Uma das alternativas para a utilização destas amostras seria a técnica de dissecação por captura a laser (LCM – laser capture microdissection – EMMERT-BUCK et al. 1996), entretanto no início do projeto esta metodologia ainda não estava implementada na Instituição, impossibilitando a sua utilização. Além disso, acreditamos que o tumor constitui uma mistura de células tumorais, estroma, células inflamatórias e endoteliais, os quais estabelecem *cross-talk* entre si, e promovem a criação de um micro-ambiente favorável ao desenvolvimento e progressão do tumor, e que a análise isolada das células tumorais obtida por LCM poderia afetar a análise do tumor como um todo. Além disso, a maior parte dos trabalhos de expressão gênica por microarray em melanoma utilizaram amostras dissecadas manualmente (BITTNER et al. 2000; SEYKORA et al. 2003; MIRMOHAMMADSADEGH et al. 2004; BUSAM et al. 2005; DE WIT et al. 2005; HAQQ et al. 2005; NAMBIAR et al. 2005; TALANTOV et al. 2005; JENSEN et al. 2007; WINNEPENINCKX et al. 2006).

Após as hibridações a qualidade dos dados foi verificada e os dados foram normalizados (Figuras 8-11), uma vez que variações dos experimentos de array afetam a medida do nível de expressão gênica através de diferença na eficiência de incorporação e detecção dos fluorocromos, diferença na quantidade inicial das amostras, variabilidade experimental na marcação/hibridação, eventuais falhas na agulha de spotagem e interferência espacial nas diferentes regiões da lâmina. Neste sentido, a proposta da normalização foi minimizar estas variações sistemáticas, de modo que as diferenças biológicas pudessem ser detectadas, além de permitir a comparação do nível de expressão entre todas as lâminas.

Uma vez normalizados, os dados foram utilizados na construção de diferentes agrupamentos não-supervisionados (hierárquico, SOM e K-means) que foram capazes de separar com precisão os nevos dos melanomas primários, indicando a forte diferença no perfil molecular da lesão benigna e maligna (Figuras 12 e 13).

Interessante notar que no agrupamento hierárquico observamos a subdivisão dos nevos em 02 braços principais (Figura 12), sendo o menor braço constituído pelos nevos 01, 13, 22, 27 e 30, lesões provindas de pacientes com nevos múltiplos e/ou atípicos (22, 27, 30) e com antecedentes pessoal (13, 22) ou familiar (13) de melanoma, que poderia indicar um perfil gênico com maior potencial de progressão destas lesões.

A completa separação de nevos e melanomas se deve a um grande número de genes diferencialmente expressos, dentre eles conexina 43, ZNF83 e anexina 8.

Conexina 43(GJA1) é membro da família de proteínas de junção gap envolvida em comunicação célula-célula, e tem expressão diminuída nos melanomas do nosso conjunto de dados. O gene está localizado na região cromossômica 6q21-q23, uma região freqüentemente alterada em melanoma (SU e TRENT 1995) e parece envolvida no crescimento independente de ancoragem em linhagem de melanoma (SU et al. 2000). A perda da expressão de conexina 43 já foi relatada em tumor de mama, e sugere-se que ela seja um gene supressor de tumor (MCLACHLAN 2006).

Outro gene com expressão diminuída em melanoma é o gene ZNF83 (zinc finger protein 83, fold nevo/mel=11.92) mapeado no cromossomo 19q13.3-q13.4 (MARINE et al. 1994), que codifica uma proteína envolvida em regulação transcricional, e portanto, com potencial papel na reprogramação gênica que ocorre durante o processo de malignização.

Nossos dados também mostram a diminuição da expressão de anexina 8. Anexinas são proteínas que se associam a proteínas de membrana com diferentes funções, incluindo controle da estrutura da membrana e transporte de membrana. Dados da literatura mostram diminuição de anexina 6 (KATAOKA et al. 2000) e anexina 7 (FRANCIA et al. 1996) em melanoma, e esses dados em conjunto poderiam sugerir que a perda de anexinas seja um evento importante durante a progressão do melanoma.

Entretanto, análises como clusterização e identificação de genes diferencialmente expressos, embora bastante produtivas, tendem a ignorar informações que poderiam, por exemplo, levar à identificação de processos biológicos nos quais vários genes com alterações quantitativas mínimas estão envolvidos. Nesse sentido, nossos dados foram analisados por módulos biológicos, explorando as idéias originais de SEGAL et al. (2004). Este tipo de análise foi inicialmente utilizada em nosso grupo por GOMES et al. (2005) agrupando os genes em 17 módulos funcionais de acordo com o KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

No nosso trabalho, os genes foram agrupados em um maior número (124) de módulos funcionais de acordo com as anotações disponíveis no GeneDeck e Gene Ontology. Uma vez que a acurácia das informações contidas no GeneDeck e Gene Ontology são dependentes do curador responsável, a categorização dos genes em grupos funcionais por esta metodologia pode conter erros, e por isso os dados devem ser interpretados com cautela. Outra questão importante a ser considerada é quão bem os genes contidos na plataforma representam uma função ou via, visto que alguns módulos possuem um número reduzido de genes. Ainda, acreditamos que a categorização de todos os genes da plataforma em módulos funcionais seja mais produtiva e elucidativa que a seleção de genes isoladamente alterados.

Uma das críticas à análise por módulos funcionais é a falta de uma ferramenta que avalie a interação entre os genes componentes do módulo funcional. Os genes contidos num dado módulo podem ser ativadores ou

inibidores que exercem influência sobre outros genes, mas esta interação não é considerada na análise, que se limita à somatória de genes com aumento ou diminuição transcricional no módulo. Assim, o módulo ativo é entendido como sendo reflexo de uma maior atividade transcricional coordenada de genes, e nos dá indicativos de funções ou vias alteradas em conjuntos de dados. O mapa de módulos funcionais alterados (Figura 14) deve ser melhor explorado, por exemplo, pela avaliação da função dos genes diferencialmente expressos com significância estatística, que permite uma melhor compreensão em relação à contribuição dos genes na ativação ou inibição da via em questão.

Para o módulo de adesão os genes com alteração significativa de expressão foram POSTN (periostin, osteoblast specific factor), FXVD5 (FXVD domain containing ion transport regulator 5), SGCE (sarcoglycan, epsilon), CNTN1 (contactin1), DSC3 (desmocollin3), CD44 (CD44 antigen) e STIM2 (stromal interaction molecule2). Todos apresentaram expressão diminuída em melanomas. A diminuição da expressão de proteínas envolvidas na interação célula-célula e/ou célula-matriz como CD44, DSC3, SGCE e STIM2 poderiam levar à perda ou mudança no potencial de adesão das células, facilitando a invasão dos melanomas. Já POSTN tem sido relatado como supressor de metástase em câncer de bexiga (KIM et al. 2005), mas também está envolvido em invasividade do tumor em carcinoma pulmonar (SASAKI et al. 2001).

No módulo de comunicação celular, colágeno 4 se mostrou aumentado enquanto colágeno17A1, colágeno 3A1, DSC3, GJA1, e KRT5 apresentaram expressão diminuída nos melanomas. Colágeno 4 é componente estrutural

básico da lâmina basal formando o esqueleto para agregação de moléculas como laminina, nidógeno e proteoglicanos. Não há evidência na literatura do aumento da expressão de colágeno 4 em tumores, somente relato da sua diminuição durante a progressão de linfoma (NISHIU et al. 2002). O aumento da expressão de colágeno 4 poderia ser indicativo da capacidade de síntese de lâmina basal por células de melanoma primário, formando uma cápsula protetora que possibilitaria a sobrevivência do tumor no microambiente dérmico. Entretanto, nossa plataforma possui somente o fragmento gênico correspondente à cadeia alfa de colágeno 4, que explicaria a falta de expressão nos nossos ensaios de imuno-histoquímica, ou ainda, uma regulação pós-transcricional, como já relatado por SCHMIDT et al. (1992). Já Colágeno17A1 é componente estrutural de hemidesmosomos em células epiteliais, co-localiza com integrinas e tem papel de adesão de queratinócitos à membrana basal. Uma vez que melanócitos estão alinhados na zona de membrana basal, podemos supor que há expressão de colágeno 17, e que sua perda poderia facilitar a migração, como já observado em queratinócitos (TASANEN et al. 2004).

NMU (Neuromedin U), componente do módulo de receptor neuroativo ligante, é um neuropeptídeo de ampla distribuição e sua expressão está diminuída em melanoma. Sua função não está bem definida, mas tem sido implicada na regulação da contração de músculo liso, pressão e fluxo sangüíneo, transporte de íons, entre outras atividades (BRIGHTON et al. 2004). A diminuição da expressão de NMU já foi relatada em tumor de cabeça e

pescoço (ALEVIZOS et al. 2001) e carcinoma epidermóide de esôfago (YAMASHITA et al. 2002). Já EDNRB (endotelin receptor type B) é crucial para o desenvolvimento do melanócito, promovendo expansão e migração dos seus precursores (LAHAV 2005) e está diminuído em linhagens de melanoma (EBERLE et al. 1999) e tem sido relatado como gene de predisposição a melanoma (SOUFIR et al. 2005).

Nos módulos de morte celular e apoptose, os genes responsáveis pela condição do módulo foram MDM4 (double minute 4 protein) e STK3 (serine threonine kinase3), ambos aumentados em melanomas. MDM4 é um gene anti-apoptótico que, juntamente com MDM2, regula negativamente p53 (FRANCOZ et al. 2006), enquanto STK3 ao contrário, codifica uma proteína kinase pró-apotótica (O'NEILL et al. 2005). Embora o mapa de alteração de módulos mostre estes módulos inibidos em nevos, a avaliação de todos os genes diferencialmente expressos nestes módulos mostrou a diminuição da expressão nos melanomas de um conjunto de genes pró-apoptóticos (PLAGL1 – pleiomorphic adenoma gene-like 1, TNFSF13– tumor necrosis factor superfamily member 13, CASP6 – caspase 6, FASTK – FAST kinase), indicativo de que há um comprometimento do mecanismo de apoptose durante a progressão do melanoma, como já relatado por JENSEN et al. (2007). Assim, melanomas, e não nevos, apresentam inibição destas funções. Este é um exemplo da necessidade de cautela na interpretação dos módulos funcionais.

O gene FDPS (farnesyl diphosphate synthase) do módulo de biosíntese de esteróides codifica uma enzima que produz farnesil difosfato e está

diminuída nos melanomas, e esse dado é controverso ao trabalho de PILARSKY et al. (2004) que encontrou a expressão desse gene freqüentemente aumentado em câncer.

Do módulo de desenvolvimento da epiderme, laminina- $\alpha$ 3 (LAMA3) é componente da membrana basal, codifica a cadeia  $\alpha$ 3 da laminina 5 e teve expressão diminuída em melanoma. Segundo SATHYANARAYANA et al. (2007), LAMA3 também tem expressão diminuída em lesões de pele não-melanocíticas relacionadas a exposição solar, com freqüência de metilação de mais de 30%. Poderíamos imaginar que a diminuição de LAMA3 poderia favorecer o descolamento de melanócitos na junção dermo-epidérmica, portanto facilitando migração.

O gene CYR61 (cysteine-rich, angiogenic inducer 61, fold Mel/Nevo=2.24) do módulo de assinatura metastática codifica uma proteína envolvida em proliferação, diferenciação e angiogênese. KUNZ et al. (2003) mostraram que CYR61 é induzido por hipóxia, e sua expressão é estágio-dependente em células de melanoma, com alta expressão em linhagens mais agressivas.

Os módulos de atividade proteína kinase, proliferação celular e regulação da progressão do ciclo celular apresentam aumento de CDK2 (cyclin dependent kinase 2) e CYR61 em melanoma, corroborando dados da literatura (GEORGIEVA et al. 2001 e KUNZ et al. 2003) além do aumento do gene anti-apoptótico MDM4 e de TPX2 (microtubule-associated protein), envolvido no

ciclo celular. Esses dados apontam para uma maior proliferação em melanomas, como esperado.

O mapa de módulos funcionais nos deu indicativos de funções ou vias com comportamento alterado entre nevos e melanomas, e direcionou a escolha de genes candidatos à validação, particularmente módulos relacionados à adesão, comunicação celular e junção intercelular. Desta forma, o contato célula-célula e célula-matriz parece ser fundamental para a manutenção do nevo como uma lesão benigna, e a perda e estabelecimento de novas interações celulares deve ser um evento crítico na progressão tumoral.

O estudo de módulos funcionais foi complementado pela análise das redes de relevância (Figura 18), que permitiram determinar as interações entre genes componentes dos módulos, através da correlação entre pares de genes. O tipo de informação obtido por esta metodologia pode ser exemplificado pela Figura 20. O gene basonuclein 1 (BNC), do desenvolvimento da epiderme, apresentou correlação positiva com EVPL (envoplakin), laminina 3 (LAMA3) e kalikreína 7 (KLK7) nos melanomas. Basonuclein 1 é um fator de transcrição que promove regulação de proteínas envolvidas em diferentes processos celulares (WANG et al. 2006), portanto poderíamos especular que EVPL, LAMA3 e KLK7 possam ser possíveis genes-alvo de BNC.

Nesse mesmo sentido, o par de genes DSC3 x ARF6 do módulo de adesão (Figura 19) nos levou à hipótese de interação funcional nos nevos, cuja quebra de correlação poderia ter papel relevante no processo de malignização ou metástase. ARF6 é uma GTPase pertencente à superfamília Ras, com

envolvimento em diferentes eventos biológicos, incluindo distribuição e endereçamento de proteínas de membrana, como E-caderina (PALACIOS et al. 2001). Esse dado poderia sugerir um possível papel de ARF6 na localização subcelular de DSC3, conforme mostrado pelos experimentos de imunohistoquímica (DAB), em que observamos uma fraca coloração de DSC3 no citoplasma, e não na membrana, como seria esperado (Figura 35A). Há indícios de que ARF6 possa causar distúrbio de junções aderentes internalizando E-caderina (PALACIOS et al, 2001), e considerando que o estabelecimento de outros complexos juncionais (desmossomos e junções oclusivas) é dependente da adesão via E-caderina (SABE 2003), ARF6 pode indiretamente, perturbar as junções desmossômicas, e a correlação positiva entre ARF6 e DSC3 poderia ser explicado por um mecanismo compensatório. Nos melanomas, a expressão de ARF6 pode estar relacionada ao aumento de potencial invasivo, como já relatado por TAGUE et al. (2004). Esta hipótese poderia explicar a amostra de melanoma que não tem expressão de ARF6 (Figura 19), e é a amostra com menor índice de Breslow (melanoma 71) do nosso conjunto de dados.

A identificação de classificadores moleculares capazes de distinguir duas condições biológicas é uma das aplicações clínicas mais relevantes da metodologia de microarranjos. Nossas análises geraram um total de 510 trios de classificadores capazes de separar com 100% de precisão amostras de nevo benigno e melanoma, e dentre os melhores trios, 3 duplas de genes: GATM e PDX3, COL4A1 e DSC3, e UBE3A e SELS (Figura 24) parecem ter forte poder de distinção das amostras.

Uma vez que a distinção entre nevo benigno e melanoma é feita com precisão pelo exame anátomo-patológico, a relevância do marcador molecular neste caso seria surpreender o nevo em processo de malignização e mudar a conduta clínica, por exemplo, de paciente com nevo múltiplo e atípico. A dupla de classificador COL4A1 x DSC3 seria um candidato, uma vez que possuem correlação negativa, e portanto, independem de normalizador. Entretanto, esses dados precisam ser validados em amostras independentes, e num número maior de casos, uma vez que a acurácia de classificadores moleculares ainda não está bem estabelecida na literatura. Esta metodologia tem sido criticada por não descartar eventual viés que compromete a reprodutibilidade dos resultados (RANSOHOFF 2005). Vale ressaltar que a medida de expressão de RNA não necessariamente reproduz a alteração no nível de proteína, como mostra a tentativa de validação do trio DSC3, COL4A1 e KRT5.

Quando buscamos por trios classificadores entre nevos e melanomas acrais e nevos e melanomas extensivo superficiais, constatamos uma maior eficiência nos classificadores capazes de discriminar melanomas acrais dos nevos, indicando uma maior diferença deste subtipo de melanoma quando comparado aos nevos. Este resultado está de acordo com a idéia de uma menor chance de melanomas acrais surgirem de nevo pré existente.

Dentre os subtipos de nevos, a comparação indireta entre nevos compostos e intradérmicos (scatter plot de comparação, Figura 26A) só foi possível quando utilizamos como parâmetro fold absoluto maior que 1, mostrando que a diferença na expressão de genes entre melanoma x nevo

composto com melanoma x nevo intradérmico é mínima, e portanto as amostras de nevo composto e nevo intradérmico analisadas são muito semelhantes, pelo menos molecularmente.

Outra comparação entre os subtipos de nevos foi realizada em uma análise com 04 nevos compostos e 10 nevos intradérmicos, entretanto a tentativa de validação de um dos genes diferencialmente expresso (receptor de leptina) por imuno-histoquímica não mostrou expressão protéica diferencial entre nevos compostos e intradérmicos, possivelmente por se tratar de uma diferença sutil (fold 1.64). Leptina é uma citocina envolvida no controle do peso corpóreo, e tem sido associado a crescimento tumoral de mama (GONZALEZ et al. 2006) e invasividade e progressão de células de carcinoma renal (HORIGUCHI et al. 2006) e tumor gástrico (ISHIKAWA et al. 2006). Há evidência de que leptina participe do sistema de melanocortina, através da estimulação da expressão de pro-opiomelanocortina, que além de envolvida no processo de biosíntese de melanina em melanócitos, parece mediar sinais de saciedade em neurônios do hipotálamo (SHIMIZU et al. 2007). Poderíamos especular se esse *link* entre leptina e melanocortina é mantida em melanócitos, e se o aumento da expressão do receptor de leptina poderia de alguma forma perturbar a produção de melanina, e participar da gênese de lesões melanocíticas.

Dentre os outros genes diferencialmente expressos (tabela 9), alguns genes positivamente regulados em nevos intradérmicos parecem ter sua expressão modulada ao longo da carcinogênese, como hidroprostaglandina

dehidrogenase15-NAD (HPGD), que é altamente expressa em epitélio normal de cólon e quase perdida em câncer de cólon (YAN et al. 2004), proteína homeodomínio (HOP), que parece ser um supressor tumoral envolvido na diferenciação e é negativamente regulado em carcinoma de hipofaringe (LEMAIRE et al. 2004). A expressão de angiopoietina-2 (ANGPT2) parece ter envolvimento na angiogênese em carcinoma gástrico (ETOH et al. 2001) e câncer de pulmão de não-pequenas células (TAKANAMI 2004). Dentre os genes negativamente regulados em nevos intradérmicos, desmocolina 3 (DSC3) é uma caderina envolvida em adesão via desmossomos negativamente regulada em câncer de mama (KLUS et al. 2001), enquanto trombospondina 4 (THBS4) é uma glicoproteína adesiva envolvida na interação célula-célula e célula-matriz, e está negativamente regulada por hipermetilação em linfoma cutâneo de células T (VAN DOORN et al. 2005). De acordo com estes dados, melanócitos de nevos intradérmicos sofrem uma modulação da expressão gênica em ANGPT2, LEPR, DSC3 e THB4 que poderia favorecer a malignização destas células, enquanto a regulação negativa de HPGD e HOP favoreceria a malignização das células de nevos compostos. Considerando que ambas as análises entre subtipos de nevos foram feitas com um pequeno número de amostras, não permitiram sugerir qual tipo de nevo seria mais propenso à transformação maligna.

Desmocolina 3, além de diferencialmente expressa entre subtipos de nevos, foi responsável pela alteração do módulo de junção intercelular, além de ter contribuído para a inibição dos módulos de comunicação celular e adesão

celular nos melanomas. A diminuição na expressão de desmocolina 3 nos melanomas poderia levar à perda de adesão e ganho de motilidade celular, fatores importantes na progressão tumoral. Entretanto, o fato de desmocolina 3 ser sabidamente expressa em queratinócitos e estar envolvida na diferenciação do epitélio (JENSEN e WHEELLOCK 1996) levantou a possibilidade do dado ser um falso-positivo em função da possível contaminação das amostras por queratinócitos durante a dissecação manual, especialmente nos nevos compostos, que possui componente na junção dermo-epidérmica. A análise de genes diferenciais (Wilcoxon) entre nevos e melanomas foi refeita excluindo nevos compostos e DSC3 permaneceu com expressão diminuída nos melanomas (Fold Melanoma/ Intradérmico = -2,122, valor de  $p=0$ ). Além disso, no trabalho de NAMBIAR et al. (2005), onde cultura de melanócito normal humano foi comparada a melanomas metastáticos, DSC3 também estava diminuída nos tumores, indicando que DSC3 não é um marcador exclusivo de queratinócitos. Ainda, na análise por RT-PCR de RNAs de linhagens de melanomas humanos confirmamos a expressão da isoforma menor de DSC3 em melanomas (Figura 30A), enquanto queratinócitos humanos mostrou expressão de 3 isoformas, uma delas ainda não descrita (Figura 30C). Os experimentos de RT-PCR em amostras de nevos e melanomas mostraram a expressão das 02 isoformas (Figura 29). A isoforma com um RNA maior poderia ser proveniente de RNA de queratinócito contaminante, ocasionando viés na análise. Para resolver essa questão, optamos pela utilização da microdissecação por captura a laser (LCM – laser capture microdissection) em amostras de nevo

emblocadas em parafina, para extração de RNA. A ausência de nevos no banco de tumores e dificuldade na obtenção de novas amostras são fatores que limitaram a utilização de material congelado, cujo RNA é mais íntegro que aquele obtido através de peças emblocadas em parafina. Os resultados de RT-PCR de amostras obtidas por LCM mostraram a expressão das 02 isoformas de DSC3 (Figura 33), corroborando o dado obtido por *microarray* e RT-PCR, e descartando a possibilidade de falso-positivo por contaminação das amostras por queratinócito. O trabalho recentemente publicado por JAEGER et al. (2007) avaliou amostras de melanoma primário e metástases microdissecadas a laser, e DSC3 destacou-se como um dos genes com expressão diminuída nas metástases, reforçando a precisão do nosso dado. Entretanto, a imunohistoquímica de DSC3 foi negativa com Naftol nos nevos (Figura 35A), além da indefinição no sistema DAB (Figura 35B). Uma das explicações seria a diferença no grau de sensibilidade do método de RT-PCR e imunohistoquímica. Outra possibilidade seria a regulação pós-transcricional do mRNA de desmocolina, que leva à ausência da proteína, embora o mRNA esteja presente. Eventos como estabilidade do mRNA, modificação pós-transcricional e degradação protéica são processos que não podem ser avaliados pela metodologia de microarranjos de cDNA. Os experimentos com linhagens de melanoma humano suportam a idéia de sensibilidade diferencial dos métodos, uma vez que a linhagem fracamente positiva na RT-PCR (SKMel188, Figura 37C) foi negativa na imunocitoquímica, enquanto SKMel28, fortemente positiva na RT-PCR foi positiva na imunocitoquímica (Figura 28C) .

Também não foi possível validar por imuno-histoquímica a expressão de claudina-4 em nevos, somente nas linhagens de melanoma, embora a RT-PCR tenha corroborado o dado obtido pelo array (Figura 31). As junções oclusivas estão envolvidas na adesão intercelular, regulando proliferação, diferenciação celular e polarização. A diminuição da expressão de proteínas associadas a junções oclusivas, como claudina-4 segue o raciocínio de que a tumorigênese é acompanhada pela perda da adesão celular, que poderia levar ao descontrole da proliferação e invasividade. Nossa plataforma possui as claudinas 2, 4, 6, 8, 12 e 15, das quais claudina 4 e claudina 12 (fold Melanoma/Nevo=1,76, pvalor 0) foram diferencialmente expressas, e dentre as claudinas avaliadas por imuno-histoquímica (1, 3, 5, 7 e 11), pudemos observar diferença de expressão em claudina 7 (Figura 38) e claudina 11 (Figura 39), ambos com maior intensidade em nevos, como mostrado para claudina 4. Segundo COHN et al. (2005), há perda de expressão proteica de claudina-1 em melanomas metastáticos, quando comparados a nevos comuns, atípicos e melanomas primários. Entretanto, há relatos do aumento da expressão de claudinas em outros tumores (HEWITT et al. 2006). Esses dados controversos poderiam indicar diferenças tecido-específicas na função das claudinas, ou nas diferentes características de cada micro-ambiente tumoral (OLIVEIRA e MORGADO-DIAZ 2007).

Kalikreína 7 apresentou expressão aumentada nos nevos e foi validada por imuno-histoquímica (Figura 40). É uma enzima proteolítica envolvida no processo de descamação do estrato córneo da pele (YOUSEF et al. 2000). Ela

cataliza a degradação das estruturas adesivas (corneodesmosomas) nos queratinócitos. CAUBET et al. (2004) mostraram que KLK7 é capaz de degradar desmocolina 1 e corneodesmosin, que são proteínas componentes dos corneodesmosomas. Dada a capacidade de KLK7 degradar DSC1, podemos especular se KLK7 também teria potencial de degradar DSC3, favorecendo a perda de adesão. Com o intuito de entender melhor o papel da família das kalikreínas na progressão tumoral, foram feitas reações de imuno-histoquímica para KLK3 e KLK6 (cujos anticorpos são comercialmente disponíveis) entretanto não foi detectada expressão proteica destas kalikreínas em nevos e melanomas.

Já o aumento da expressão de KRT5, ainda não descrita como expressa por melanócitos e sabidamente expressa por queratinócitos basais, novamente levantou a possibilidade de contaminação das amostras de nevos com epiderme. Se esta hipótese estivesse correta, esperaria-se expressão aumentada de todas as queratinas presentes na plataforma (KRT4, KRT16, KRT20, KRT24 e KRT7) o que não ocorreu. Além disso o trabalho de JAEGER et al. (2007) mostrou diminuição de KRT10 em melanomas metastáticos dissecados a laser. Nossos dados de imuno-histoquímica mostraram expressão de KRT5 em 2 dos 6 nevos analisados, e ausência de expressão nos melanomas.

A expressão dos genes sabidamente expressos por queratinócitos (desmocolina 3, kalikreína 7, queratina 5, envoplaquina) envolvidos na diferenciação e descamação do epitélio, nos leva à idéia de que a expressão

destes genes permita que o melanócito adquira alguma semelhança com queratinócito, que facilite sua proliferação na junção dermo-epidérmica e permita a extensão ascendente de células névicas para epideme superficial, formando o padrão de nevo juncional, que ao se aprofundar na derme, poderia originar nevo composto ou intradérmico.

A tentativa de isolamento de células provindas de prepúcio foi realizada com sucesso, e pudemos obter cultura primária de queratinócitos e fibroblastos normais (Figuras 42 e 43). Estudos com equivalentes dérmicos utilizam em geral queratinócitos obtidos de circuncisão de recém-nascidos (FLEISCHMAJER et al. 1998; MEIER et al. 2000). O prepúcio coletado foi proveniente de uma criança de 05 anos com fimose. Utilizando estas células, foi possível estabelecer um modelo de equivalente dérmico em nosso laboratório (Figuras 44 e 45), e, apesar de uma menor estratificação da epiderme em função do menor potencial proliferativo, esse modelo poderá ser utilizado para ensaios funcionais dos genes diferencialmente expressos identificados neste trabalho e na tese de doutorado de Waleska K Martins (MARTINS 2007).

## 6 CONCLUSÃO

- 1 Determinamos o perfil de expressão gênica global de amostras de nevo composto, nevo intradérmico e melanoma primário através da técnica de microarranjos de cDNA;
- 2 Comparamos o perfil de genes expressos por nevos com o perfil de genes expressos por melanomas primários utilizando diferentes ferramentas de bio-informática;
- 3 Validamos por RT-PCR os genes Claudina 4 e Desmocolina 3, que codificam moléculas de adesão com expressão diminuída em melanomas. Validamos por imuno-histoquímica Kalikreína 7, e mostramos expressão diferencial das Claudinas 7 e 11;
- 4 Isolamos e estabelecemos cultura primária de queratinócito e fibroblasto humanos, e utilizamos estas células na construção de modelo de equivalente dérmico, o qual poderá ser utilizado em ensaios funcionais no nosso laboratório.

De modo geral, nossos resultados mostram diferenças substanciais na expressão gênica global entre nevos e melanomas, visto que as amostras puderam ser separadas por métodos de agrupamento não supervisionado com base no perfil de expressão de todos os genes. Identificamos 211 genes

diferencialmente expressos entre nevos e melanomas (fold  $\geq 2$ , valor de  $p \leq 0,05$ ), além de 510 trios de classificadores capazes de separar as amostras com 100% de precisão. Treze módulos funcionais mostraram alteração entre nevos e melanomas, e apresentaram redes de relevância com quebra de correlação. Estes dados poderão contribuir para um melhor entendimento da biologia dos nevos e melanomas.

## 7 PERSPECTIVAS

Como todo trabalho que utiliza metodologias em larga escala, este projeto gerou um grande volume de dados que poderá ser melhor explorado por projetos futuros, uma vez que os resultados apresentados aqui representam o passo inicial na tentativa de entender melhor os nevos e sua progressão para melanoma.

Os genes validados por RT-PCR e imuno-histoquímica poderão ser melhor analisados utilizando o modelo de reconstituição dérmica, alterando a expressão desses genes em melanócitos ou melanomas com utilização de vetor de expressão ou a tecnologia de RNAi. As hipóteses geradas pelas redes de relevância poderão ser investigadas por ensaios funcionais, e os classificadores moleculares poderão ser validados em um conjunto de amostras independentes, na tentativa de avaliar sua aplicabilidade.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alevizos I, Mahadevappa M, Zhang X, et al. Oral cancer in vivo gene expression profiling assisted by laser capture microdissection and microarray analysis. **Oncogene** 2001; 20:6196-204.

Bastiaens M, ter Huurne J, Gruis N, et al. The melanocortin-1-receptor gene is the major freckle gene. **Hum Mol Genet** 2001; 10:1701-8.

Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **J Royal Stat Soc** 1995; B57:289-300.

Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H. Cutaneous melanomas associated with nevi. **Arch Dermatol** 2003; 139:1620-4.

Bittner M, Meltzer P, Chen Y, et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. **Nature** 2000; 406:536-40.

Blum A, Rassner G, Garbe C. Modified ABC-point list of dermoscopy: A simplified and highly accurate dermoscopic algorithm for the diagnosis of cutaneous melanocytic lesions. **J Am Acad Dermatol** 2003; 48:672-8.

Braun RP, Saurat JH. Changes even in benign melanocytic nevi. **Arch Dermatol** 2001; 137:228-9.

Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. **Ann Surg** 1970; 172:902-8.

Brighton PJ, Szekeres PG, Willars GB. Neuromedin U and its receptors: structure, function, and physiological roles. **Pharmacol Rev** 2004; 56:231-48.

Busam KJ, Zhao H, Coit DG, et al. Distinction of desmoplastic melanoma from non-desmoplastic melanoma by gene expression profiling. **J Invest Dermatol** 2005; 124:412-8.

Butte AJ, Tamayo P, Slonim D, Golub TR, Kohane IS. Discovering functional relationships between RNA expression and chemotherapeutic susceptibility using relevance networks. **Proc Natl Acad Sci USA** 2000; 97:12182-6.

Camargo AA, Samaia HP, Dias-Neto E, Simao DF, Migotto IA, Briones MR et al. The contribution of 700,000 ORF sequence tags to the definition of the human transcriptome. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:12103-8. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:414.

Caubet C, Jonca N, Brattsand M, et al. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. **J Invest Dermatol** 2004; 122:1235-44.

Chu DH, Haake AR, Holbrook, Loomis CA. The structure and development of skin. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, et al., editors. **Fitzpatrick's dermatology in general medicine**. 6<sup>th</sup> ed. New York: Mcgraw-Hill Medical Publishing Division; 2003. p. 58-88.

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

Chin L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:559-70.

Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. **J Clin Invest** 2005; 115:813-24.

Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. **Nature** 2000; 406:532-5. Erratum in: **Nature** 2001; 411:974.

Clark WH. Tumour progression and the nature of cancer. **Br J Cancer** 1991; 64:631-44.

Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. **Cancer Res** 1969; 29:705-27.

Cohn ML, Goncharuk VN, Diwan AH, Zhang PS, Shen SS, Prieto VG. Loss of claudin-1 expression in tumor-associated vessels correlates with acquisition of metastatic phenotype in melanocytic neoplasms. **J Cutan Pathol** 2005; 32:533-6.

De Fabo EC, Noonan FP, Fears T, Merlino G. Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma. **Cancer Res** 2004; 64:6372-6.

de Wit NJ, Rijntjes J, Diepstra JH, et al. Analysis of differential gene expression in human melanocytic tumour lesions by custom made oligonucleotide arrays. **Br J Cancer** 2005; 92:2249-61.

DeRisi J, Penland L, Brown PO, et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. **Nat Genet** 1996; 14:457-60.

Eberle J, Weitmann S, Thieck O, Pech H, Paul M, Orfanos CE. Downregulation of endothelin B receptor in human melanoma cell lines parallel to differentiation genes. **J Invest Dermatol** 1999; 112:925-32.

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998; 95:14863-8.

Elder D. Tumor progression, early diagnosis and prognosis of melanoma. **Acta Oncol** 1999; 38:535-47.

Eller MS, Ostrom K, Gilchrest BA. DNA damage enhances melanogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA** 1996; 93:1087-92.

Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, et al. Laser capture microdissection. **Science** 1996; 274:998-1001.

Espinosa-de-los-Monteros A, de la Torre JI, Marrero I, Andrades P, Davis MR, Vasconez LO. Utilization of human cadaveric acellular dermis for abdominal hernia reconstruction. **Ann Plast Surg** 2007; 58:264-7.

Esteves GH. **Métodos estatísticos para a análise de dados de cDNA microarray em um ambiente computacional integrado**. São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Instituto de Matemática e Estatística, USP].

Etoh T, Inoue H, Tanaka S, Barnard GF, Kitano S, Mori M. Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma: possible in vivo regulation via induction of proteases. **Cancer Res** 2001; 61:2145-53.

Fernandez EM, Helm KF. The diameter of melanomas. **Dermatol Surg** 2004; 30:1219-22.

Fleischmajer R, Utani A, MacDonald ED, et al. Initiation of skin basement membrane formation at the epidermo-dermal interface involves assembly of laminins through binding to cell membrane receptors. **J Cell Sci** 1998; 111:1929-40.

Francia G, Mitchell SD, Moss SE, Hanby AM, Marshall JF, Hart IR. Identification by differential display of annexin-VI, a gene differentially expressed during melanoma progression. **Cancer Res** 1996; 56:3855-8.

Francoz S, Froment P, Bogaerts S, et al. Mdm4 and Mdm2 cooperate to inhibit p53 activity in proliferating and quiescent cells in vivo. **Proc Natl Acad Sci USA** 2006; 103:3232-7.

Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biol** 2004; 5:R80.

Georgieva J, Sinha P, Schadendorf D. Expression of cyclins and cyclin dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions. **J Clin Pathol** 2001; 54:229-35.

Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. **N Engl J Med** 1999; 340:1341-8.

Gomes LI, Silva RL, Stolf BS, et al. Comparative analysis of amplified and nonamplified RNA for hybridization in cDNA microarray. **Anal Biochem** 2003; 321:244-51.

Gomes LI, Esteves GH, Carvalho AF, et al. Expression profile of malignant and nonmalignant lesions of esophagus and stomach: differential activity of functional modules related to inflammation and lipid metabolism. **Cancer Res** 2005; 65:7127-36.

Gontier E, Cario-Andre M, Lepreux S, et al. Dermal nevus cells from congenital nevi cannot penetrate the dermis in skin reconstructs. **Pigment Cell Res** 2002; 15:41-8.

Gontier E, Cario-Andre M, Vergnes P, Bizik J, Surleve-Bazeille JE, Taieb A. The 'Abtropfung phenomenon' revisited: Dermal nevus cells from congenital nevi cannot activate matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). **Pigment Cell Res** 2003; 16:366-73.

Gontier E, Cario-Andre M, Vergnes P, Lepreux S, Surleve-Bazeille JE, Taieb A. The role of E-cadherin in nevogenesis: an experimental study using epidermal reconstructs. **Exp Dermatol** 2004; 13:326-31.

Gonzalez RR, Cherfils S, Escobar M, et al. Leptin signaling promotes the growth of mammary tumors and increases the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor type two (VEGF-R2). **J Biol Chem** 2006; 281:26320-8.

Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al. **AJCC manual de estadiamento do câncer**. Trad. de D D Rosa. 6th ed. Porto Alegre: Artmed; 2006. Melanoma cutâneo; p.223-31.

Haass NK, Smalley KS, Li L, Herlyn M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Res** 2005; 18:150-9.

Haqq C, Nosrati M, Sudilovsky D, et al. The gene expression signatures of melanoma progression. **Proc Natl Acad Sci USA** 2005; 102:6092-7.

Heck DE, Gerecke DR, Vetrano AM, Laskin JD. Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction. **Toxicol Appl Pharmacol** 2004; 195:288-97.

Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. **BMC Cancer** 2006; 6:186.

Hoek K, Rimm DL, Williams KR, et al. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. **Cancer Res** 2004; 64:5270-82.

Horiguchi A, Sumitomo M, Asakuma J, et al. Increased serum leptin levels and over expression of leptin receptors are associated with the invasion and progression of renal cell carcinoma. **J Urol** 2006; 176:1631-5.

Hsu MY, Meier FE, Nesbit M, et al. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. **Am J Pathol** 2000; 156:1515-25.

Ishikawa M, Kitayama J, Nagawa H. Expression pattern of leptin and leptin receptor (OB-R) in human gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2006; 12:5517-22.

Jaeger J, Koczan D, Thiesen HJ, et al. Gene expression signatures for tumor progression, tumor subtype, and tumor thickness in laser-microdissected melanoma tissues. **Clin Cancer Res** 2007; 13:806-15.

Jensen EH, Lewis JM, McLoughlin JM, et al. Down-Regulation of Pro-Apoptotic Genes is an Early Event in the Progression of Malignant Melanoma. **Ann Surg Oncol** 2007; 14:1416-23.

Jensen PJ, Wheelock MJ. The relationships among adhesion, stratification and differentiation in keratinocytes. **Cell Death Differ** 1996; 3:357-71.

Kaddu S, Smolle J, Zenahlik P, Hofmann-Wellenhof R, Kerl H. Melanoma with benign melanocytic naevus components: reappraisal of clinicopathological features and prognosis. **Melanoma Res** 2002; 12:271-8.

Kanzler MH, Mraz-Gernhard S. Primary cutaneous malignant melanoma and its precursor lesions: diagnostic and therapeutic overview. **J Am Acad Dermatol** 2001; 45:260-76.

Kataoka TR, Ito A, Asada H, et al. Annexin VII as a novel marker for invasive phenotype of malignant melanoma. **Jpn J Cancer Res** 2000; 91:75-83.

Kim CJ, Reintgen DS, Yeatman TJ. The promise of microarray technology in melanoma care. **Cancer Control** 2002; 9:49-53.

Kim CJ, Yoshioka N, Tambe Y, Kushima R, Okada Y, Inoue H. Periostin is down-regulated in high grade human bladder cancers and suppresses in vitro cell invasiveness and in vivo metastasis of cancer cells. **Int J Cancer** 2005; 117:51-8.

Kincannon J, Boutzale C. The physiology of pigmented nevi. **Pediatrics** 1999; 104:1042-5.

Kittler H, Seltenheim M, Dawid M, Pehamberger H, Wolff K, Binder M. Frequency and characteristics of enlarging common melanocytic nevi. **Arch Dermatol** 2000; 136:316-20.

Kiyohara T, Kumakiri M, Kouraba S. Malignant melanoma arising from a small congenital melanocytic naevus. **Acta Derm Venereol** 2003; 83:397-8.

Klus GT, Rokaeus N, Bittner ML, et al. Down-regulation of the desmosomal cadherin desmocollin 3 in human breast cancer. **Int J Oncol** 2001; 19:169-74.

Krengel S. Nevogenesis--new thoughts regarding a classical problem. **Am J Dermatopathol** 2005; 27:456-65.

Kunz M, Moeller S, Koczan D, et al. Mechanisms of hypoxic gene regulation of angiogenesis factor Cyr61 in melanoma cells. **J Biol Chem** 2003; 278:45651-60.

Kurzen H, Moll I, Moll R, et al. Compositionally different desmosomes in the various compartments of the human hair follicle. **Differentiation** 1998; 63:295-304.

Lahav R. Endothelin receptor B is required for the expansion of melanocyte precursors and malignant melanoma. **Int J Dev Biol** 2005; 49:173-80.

Lemaire F, Millon R, Muller D, et al. Loss of HOP tumour suppressor expression in head and neck squamous cell carcinoma. **Br J Cancer** 2004; 91:258-61.

Li G, Herlyn M. Dynamics of intercellular communication during melanoma development. **Mol Med Today** 2000; 6:163-9.

Lichon V, Khachemoune A. Xeroderma pigmentosum: beyond skin cancer. **J Drugs Dermatol** 2007; 6:281-8.

Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature** 2007; 445:843-50.

Maeda K, Hatao M. Involvement of photooxidation of melanogenic precursors in prolonged pigmentation induced by ultraviolet A. **J Invest Dermatol** 2004; 122:503-9.

Makkar HS, Frieden IJ. Congenital melanocytic nevi: an update for the pediatrician. **Curr Opin Pediatr** 2002; 14:397-403.

Marine JC, Bellefroid EJ, Bourguignon C, et al. Assignment of the human ZNF83 (HPF1) zinc finger gene to chromosome 19q13.3-q13.4. **Genomics** 1994; 21:285-6.

Martins WK. **Análise do perfil de expressão gênica de melanomas humanos**. São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Masci P, Borden EC. Malignant melanoma: treatments emerging, but early detection is still key. **Cleve Clin J Med** 2002; 69:529, 533-4, 536-8.

McLachlan E, Shao Q, Wang HL, Langlois S, Laird DW. Connexins act as tumor suppressors in three-dimensional mammary cell organoids by regulating differentiation and angiogenesis. **Cancer Res** 2006; 66:9886-94.

Meier F, Satyamoorthy K, Nesbit M, et al. Molecular events in melanoma development and progression. **Front Biosci** 1998; 3:D1005-10.

Meier F, Nesbit M, Hsu MY, et al. Human melanoma progression in skin reconstructs: biological significance of bFGF. **Am J Pathol** 2000; 156:193-200.

Meireles SB. **Desenvolvimento de um método de diagnóstico molecular para o câncer gástrico baseado na análise do perfil de expressão gênica através da metodologia de cDNA array.** São Paulo; 2003. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Meireles SI, Carvalho AF, Hirata R, et al. Differentially expressed genes in gastric tumors identified by cDNA array. **Cancer Lett** 2003; 190:199-211.

Meireles SI, Cristo EB, Carvalho AF, et al. Molecular classifiers for gastric cancer and nonmalignant diseases of the gastric mucosa. **Cancer Res** 2004; 64:1255-65.

Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa/2006 incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA; 2005.

Mirmohammadsadegh A, Baer A, Nambiar S, Bardenheuer W, Hengge UR. Rapid identification of dysregulated genes in cutaneous malignant melanoma metastases using cDNA technology. **Cells Tissues Organs** 2004; 177:119-23.

Mooi WJ. The dysplastic naevus. **J Clin Pathol** 1997; 50:711-5.

Nambiar S, Mirmohammadsadegh A, Doroudi R, et al. Signaling networks in cutaneous melanoma metastasis identified by complementary DNA microarrays. **Arch Dermatol** 2005; 141:165-73.

Nishiu M, Yanagawa R, Nakatsuka S, et al. Microarray analysis of gene-expression profiles in diffuse large B-cell lymphoma: identification of genes related to disease progression. **Jpn J Cancer Res** 2002; 93:894-901.

O'Neill EE, Matallanas D, Kolch W. Mammalian sterile 20-like kinases in tumor suppression: an emerging pathway. **Cancer Res** 2005; 65:5485-7.

Oliveira SS, Morgado-Diaz JA. Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. **Cell Mol Life Sci** 2007; 64:17-28.

Palacios F, Price L, Schweitzer J, Collard JG, D'Souza-Schorey C. An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration. **EMBO J** 2001; 20:4973-86.

Pavey S, Johansson P, Packer L, et al. Microarray expression profiling in melanoma reveals a BRAF mutation signature. **Oncogene** 2004; 23:4060-7.

Piepkorn M. Melanoma genetics: an update with focus on the CDKN2A(p16)/ARF tumor suppressors. **J Am Acad Dermatol** 2000; 42:705-36.

Pilarsky C, Wenzig M, Specht T, Saeger HD, Grutzmann R. Identification and validation of commonly overexpressed genes in solid tumors by comparison of microarray data. **Neoplasia** 2004; 6:744-50.

Ransohoff DF. Bias as a threat to the validity of cancer molecular-marker research. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:142-9.

Reed JA, Finnerty B, Albino AP. Divergent cellular differentiation pathways during the invasive stage of cutaneous malignant melanoma progression. **Am J Pathol** 1999; 155:549-55.

Rhodes AR. Common acquired nevocytic nevi and the fourth dimension. **Arch Dermatol** 2000; 136:400-5.

Rigel DS, Friedman RJ. The rationale of the ABCDs of early melanoma. **J Am Acad Dermatol** 1993; 29:1060-1.

Riley PA. Melanogenesis and melanoma. **Pigment Cell Res** 2003; 16:548-52.

Sabe H. Requirement for Arf6 in cell adhesion, migration, and cancer cell invasion. **J Biochem** 2003; 234:485-9.

Sá BCS, Rezza GG. Os critérios dermatoscópicos. In: Rezza GG, Sá BCS, Never RI, editores. **Atlas de dermatoscopia aplicada**. São Paulo: Lemar; 2004. p.23-32.

Sasaki H, Dai M, Auclair D, et al. Serum level of the periostin, a homologue of an insect cell adhesion molecule, as a prognostic marker in nonsmall cell lung carcinomas. **Cancer** 2001; 92:843-8. Erratum in: **Cancer** 2002; 95:2580.

Sathyanarayana UG, Moore AY, Li L, et al. Sun exposure related methylation in malignant and non-malignant skin lesions. **Cancer Lett** 2007; 245:112-21.

Schmidt C, Pollner R, Poschl E, Kuhn K. Expression of human collagen type IV genes is regulated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. **FEBS Lett** 1992; 312:174-8.

Schumacher JA, Jenson SD, Elenitoba-Johnson KS, Lim MS. Utility of linearly amplified RNA for RT-PCR detection of chromosomal translocations: validation using the t(2;5)(p23;q35) NPM-ALK chromosomal translocation. **J Mol Diagn** 2004; 6:16-21.

Segal E, Friedman N, Koller D, Regev A. A module map showing conditional activity of expression modules in cancer. **Nat Genet** 2004; 36:1090-8.

Serrone L, Hersey P. The chemoresistance of human malignant melanoma: an update. **Melanoma Res** 1999; 9:51-8.

Seykora JT, Jih D, Elenitsas R, Horng WH, Elder DE. Gene expression profiling of melanocytic lesions. **Am J Dermatopathol** 2003; 25:6-11.

Shimizu H, Inoue K, Mori M. The leptin-dependent and -independent melanocortin signaling system: regulation of feeding and energy expenditure. **J Endocrinol** 2007; 193:1-9.

Skender-Kalnenas TM, English DR, Heenan PJ. Benign melanocytic lesions: risk markers or precursors of cutaneous melanoma? **J Am Acad Dermatol** 1995; 33:1000-7.

Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiol Rev** 2004; 84:1155-228.

Soufir N, Meziani R, Lacapere JJ, et al. Association between endothelin receptor B nonsynonymous variants and melanoma risk. **J Natl Cancer Inst** 2005; 97:1297-301.

Stolf BS. **Identificação de marcadores moleculares para o câncer de tireóide por cDNA microarrays**. São Paulo; 2003. [Tese de Doutorado-Instituto de Química, USP].

Stolf BS, Santos MM, Simao DF, et al. Class distinction between follicular adenomas and follicular carcinomas of the thyroid gland on the basis of their signature expression. **Cancer** 2006; 106:1891-900.

Su YA, Trent JM. Genetics of Cutaneous malignant melanoma. **Cancer Control** 1995; 2:392-7.

Su YA, Bittner ML, Chen Y, et al. Identification of tumor-suppressor genes using human melanoma cell lines UACC903, UACC903(+6), and SRS3 by comparison of expression profiles. **Mol Carcinog** 2000; 28:119-27.

Tague SE, Muralidharan V, D'Souza-Schorey C. ADP-ribosylation factor 6 regulates tumor cell invasion through the activation of the MEK/ERK signaling pathway. **Proc Natl Acad Sci USA** 2004; 101:9671-76.

Takanami I. Overexpression of Ang-2 mRNA in non-small cell lung cancer: association with angiogenesis and poor prognosis. **Oncol Rep** 2004; 12:849-53.

Talantov D, Mazumder A, Yu JX, et al. Novel genes associated with malignant melanoma but not benign melanocytic lesions. **Clin Cancer Res** 2005; 11:7234-42.

Tamayo P, Slonim D, Mesirov J, et al. Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96:2907-12.

Tasanen K, Tunggal L, Chometon G, Bruckner-Tuderman L, Aumailley M. Keratinocytes from patients lacking collagen XVII display a migratory phenotype. **Am J Pathol** 2004; 164:2027-38.

Tavazoie S, Hughes JD, Campbell MJ, Cho RJ, Church GM. Systematic determination of genetic network architecture. **Nat Genet** 1999; 22:281-5.

Urso C, Giannotti V, Reali UM, Giannotti B, Bondi R. Spatial association of melanocytic naevus and melanoma. **Melanoma Res** 1991; 1:245-9.

van Doorn R, Zoutman WH, Dijkman R, et al. Epigenetic profiling of cutaneous T-cell lymphoma: promoter hypermethylation of multiple tumor suppressor genes including BCL7a, PTPRG, and p73. **J Clin Oncol** 2005; 23:3886-96.

Virador VM, Muller J, Wu X, et al. Influence of alpha-melanocyte-stimulating hormone and ultraviolet radiation on the transfer of melanosomes to keratinocytes. **FASEB J** 2002; 16:105-7.

Walter SD, Ashbolt R, Dwyer T, Marrett LD. Do larger people have more naevi? Naevus frequency versus naevus density. **Int J Epidemiol** 2000; 29:1025-30.

Wang E, Miller LD, Ohnmacht GA, et al. Prospective molecular profiling of melanoma metastases suggests classifiers of immune responsiveness. **Cancer Res** 2002; 62:3581-6.

Wang J, Zhang S, Schultz RM, Tseng H. Search for basonuclin target genes. **Biochem Biophys Res Commun** 2006; 348:1261-71.

Wilson JL, Dollard SC, Chow LT, Broker TR. Epithelial-specific gene expression during differentiation of stratified primary human keratinocyte cultures. **Cell Growth Differ** 1992; 3:471-83.

Winnepenninckx V, Lazar V, Michiels S, et al. Gene expression profiling of primary cutaneous melanoma and clinical outcome. **J Natl Cancer Inst** 2006; 98:472-82.

Worret WI, Burgdorf WH. Which direction do nevus cells move? Abtropfung reexamined. **Am J Dermatopathol** 1998; 20:135-9.

Yamashita K, Upadhyay S, Osada M, et al. Pharmacologic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Cell** 2002; 2:485-95.

Yan M, Rerko RM, Platzer P, et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase, a COX-2 oncogene antagonist, is a TGF-beta-induced suppressor of human gastrointestinal cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004; 101:17468-73.

Yousef GM, Scorilas A, Magklara A, Soosaipillai A, Diamandis EP. The KLK7 (PRSS6) gene, encoding for the stratum corneum chymotryptic enzyme is a new member of the human kallikrein gene family - genomic characterization, mapping, tissue expression and hormonal regulation. **Gene** 2000; 254:119-28.