

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA EM MELANOMAS HUMANOS

WALESKA KERLLEN MARTINS

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Luiz Fernando Lima Reis

Co-Orientador: Dr. Alex Fiorini de Carvalho

São Paulo

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Martins, Waleska Kerllen

Análise do perfil de expressão gênica em melanomas humanos / Waleska Kerllen Martins – São Paulo, 2007.

147p.

Tese (doutorado) - Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Dr. Luiz Fernando Lima Reis

Descritores: 1. MELANOMA MALIGNO. 2. EXPRESSÃO GÊNICA. 3. ANÁLISES MICROARRAY. 4. MÓDULOS FUNCIONAIS. 5. REDES DE RELEVÂNCIA.

DEDICATÓRIA

Ao querido Diego, minha eterna inspiração

Ao meu amado Pedro, pelo amor incondicional

A todos que se dedicam plenamente à pesquisa científica

A todos pacientes que contribuíram para este trabalho

Aos queridos amigos Alíne, Chamberleín, Mariana e

Sarah pela dedicação, presença e amizade

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a todos que acreditaram neste trabalho e que estão aqui a me prestigiar e apoiar!!

Agradeço a Deus pela força, intuição e luz divina. Em especial, a Inácio pela presença amiga e ajuda nas horas mais difíceis.

Ao meu orientador Dr. Luiz Fernando Lima Reis pelo apoio, auxílio e, principalmente, por ter acreditado em mim. Agradeço imensamente a oportunidade de trabalhar ao seu lado durante estes sete anos. Foi um grande aprendizado para toda vida!

Ao meu co-orientador Dr. Alex Fiorini que além de me auxiliar sempre, é um amigo muito especial.

Ao LABRI, uma mistura que dá certo – assistentes, iniciantes, mestres, doutores e funcionários, todos trabalhando em plena harmonia. Nesta turma encontramos: Adriana, Aline, Ana Coló, Ana Helena, Andréa, Bianca, Chamberlein, Graziela, Juliana, Kátia (recém chegada), Mariana, Mariana Marques (ex-labriana), Letícia, Nair, Patrícia, Regina (ex-labriana), Sarah, Vladimir e Tatiana. Agradeço o apoio, as conversas animadas e alegres - um bálsamo na hora do desânimo e cansaço. Além da contribuição científica nas reuniões e seminários, claro!

Em especial, agradeço a Nair, minha companheira do início ao fim! Obrigada querida Nairzinha pela força, ajuda e amizade!!!

À equipe do microarray facility pela competência, colaboração e, principalmente, preciosa amizade: Chamberlein, Mariana Marques, Sarah e Alex.

Não posso deixar de mencionar o antigo LABRI, o reduto de muitos mineiros – Adriana (Dri), Alex, Aristóbolo, Beatriz (Biazinha, única paulistana), Eduardo Abrantes, Eduardo Pires, Elaine, Luciana (Lulú), Ludmila, Sibebe, Susana, Valéria e, Sávio e Katiana (mascotes da virologia). Mestres e doutores que me inspiraram a dar continuidade na minha formação acadêmica e científica. Com seu carinho, atenção e amizade foram cruciais na minha adaptação tanto no

ILPC quanto em Sampa. Posso dizer que esta turma labriana era minha família, mas como todas as outras se distanciam à medida que a vida toma outros rumos. Desta fase labriana, ficaram as fotos, as lembranças e muitas saudades. Além da minha eterna gratidão. Jamais me esquecerei de vocês.

Agradeço também àqueles que fizeram e fazem parte da turma da Virologia (Dra. Luiza, Ana Lepique, Andréa, Aline, Henrique, Joãozinho, Karina, Katiana, Lara, Laura, Paulinho, Sávio, Zezão e Tatiana), e da Biologia Molecular (Dra. Annamaria, Ana Cristina, Ana Paula, Daniel, Érico, Fabiana, Fabrício, Felícia, Lillian, Maria Cristina, Newton, Raphael, Ricardo Moura e Valéria), pelo apoio, sugestões e agradabilíssimo convívio.

Ao grupo LGEA – Aderbal, Ellen, Elisa, Jane, Louise, Nádia, Maria Cristina, Mariana, Mey, Paulo, Sabrina e Thiago, pelo convívio alegre e amizade. Em especial à Dra. Dirce, pela oportunidade e confiança.

Deixo aqui minha eterna gratidão a todos que, além de me ajudarem muito, foram grandes companheiros durante o desenvolvimento do trabalho, auxiliando-me no processo de coleta, confecção das lâminas e reações de imunohistoquímica – Myuki, Carlinhos, Severino, Sueli e Ivan. Além, também, daquelas que cuidam tão bem das nossas vidrarias e autoclavações – Isabel e Léia.

Ao Departamento de Anatomia Patológica, em especial ao Dr. Gilles Landman pela colaboração, interesse e dedicação. Agradeço, também, à Dra. Isabela Cunha sempre disposta a me ajudar. Obrigada pelo carinho e amizade!

A todos do Instituto Ludwig pela convivência harmoniosa e participação constante, seja opinando durante as reuniões de quarta-feira ou nas gostosas conversas nos corredores do ILPC. Aos funcionários pelo apoio técnico e administrativo. À Dra. Luiza Villa e ao Dr. Ricardo Brentani pela oportunidade de desenvolver este projeto no ILPC, e pela grande contribuição e dedicação à pesquisa científica.

Ao Dr. Rogério Izar e Dr. Otávio Machado do Departamento de Oncologia Cutânea do Hospital A. C. Camargo por contribuírem no planejamento desse trabalho e por possibilitarem a coleta das amostras de melanoma. À equipe de médicos (Dr. Eduard Brechtbuhl, Dra. Débora Castanheira e Dr. João P.

Duprat), residentes e enfermeiros que também participaram deste processo de coleta.

Aos pesquisadores do IME-USP, Eduardo Jordão Neves e Roberto Hirata por realizarem as análises estatísticas e computacionais dos dados de microarray. Em especial a Gustavo Esteves que além de ser um admirável pesquisador, é um amigo muito especial. Obrigada pelas análises, paciência, paciência e paciência! Você me ensinou muito.

À Dra. Helena Brentani e Luiz Paulo do Laboratório de Biologia Computacional do Hospital A. C. Camargo pela análise da qualidade das lâminas de cDNA microarray.

À pós-graduação da Fundação Antônio Prudente - seus diretores, docentes e funcionários pela grande contribuição à pesquisa científica. Em especial à coordenadora Ana Maria Kuniari e a secretária Luciana pelo auxílio e competência.

À Biblioteca da Fundação Antônio Prudente pelo acervo e auxílio nas pesquisas bibliográficas, em especial Sueli pela ajuda na elaboração da versão final da tese.

À FAPESP pela bolsa concedida e suporte financeiro para o desenvolvimento desse projeto.

Aos amigos Landa, Paulinho, Kátia, Raquelzinha, Luciana Franca e Monia, mesmo longe, são sempre presentes. Obrigada pelo carinho e amizade!

À minha amiga Luciana que além de me apoiar muito no momento mais difícil de minha vida, ajudou-me com seu exemplo e dedicação, inspirando-me a realizar este trabalho da melhor forma possível.

Aos amigos Sarah, João, Biazinha, Mariana (“Meu bebê”), Bruno, Chamberlein, Susan, Graziela, Aline, Valéria, Alex e Dri. Vocês são mais que amigos para mim constituem minha “família paulistana”. Obrigada pelo carinho, dedicação e auxílio nas horas mais difíceis..... Eu simplesmente não conseguiria sem o carinho e amor de vocês. Muito obrigada meus querido(a)s !!!!

Nesta família paulistana, destaco Sarah e João Cláudio. Amigos especiais que me confortam sempre, abrindo o seu lar e corações. Uma preciosa amizade para

toda vida! Neste amável e doce lar temos, também, Dadá, Madú e João Pedro cujo carinho me conforta nas horas saudosas.

A “Alyne” amiga e mãezona dos alunos do tio Lú, cuja dedicação, cuidado e carinho nos aliviam nas horas mais desesperadoras.

A Maria, Pedro, Ricardo, Regina, Vivi, Rodrigo e Milena. Obrigada pelo carinho e apoio. Em especial às queridas Má e Regina, pelo amor e atenção.

Aos meus pais, irmãs e irmão pelo carinho, compreensão, paciência, dedicação e apoio. Vocês fazem parte desta história, e obrigada pelo amor incondicional.

Em especial à minha mãe e querida irmã Waldileny, exemplos de sabedoria e altruísmo. Mesmo com estes 600 km a nos distanciar, cativam-me sempre com sua presença, amor e inestimável dedicação.

Às minhas amadas Samantha e Sarah. Vocês são a alegria da Madrinha!

Às minhas admiráveis Vivian, tia Mara e tia Edith, mineirinhas de garra e determinação, sempre interessadas e dispostas a me ajudar.

Ao meu inesquecível Diego. Obrigada pelo amor e lição de vida. Você foi, e é a minha inspiração!

E por último, mas não menos importante, ao meu maridinho Pedro. Obrigada pelo apoio silencioso, gentil e terno. O seu amor me deu muita força para prosseguir quando a vontade era simplesmente de desistir.

RESUMO

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

O melanoma cutâneo é a principal causa de morte por câncer de pele no Brasil, apresentando como principais fatores etiológicos e de predisposição a exposição à radiação UV e, as alterações genéticas e epigenéticas. Um modelo aceito para o processo tumorigênico do melanoma cutâneo é a transformação contínua dos melanócitos normais à displasia melanocítica, e por último ao melanoma maligno. Os eventos moleculares que explicam este processo têm sido parcialmente caracterizados, e somente um limitado número de genes foi identificado como sendo importantes na iniciação e progressão do melanoma. Dentre estes se destacam aqueles envolvidos na regulação do ciclo celular, apoptose, transdução de sinal, adesão celular, e digestão de matriz extracelular. Neste projeto, determinamos o perfil de expressão gênica em amostras de melanomas primários e metastáticos. Ao empregar a metodologia de busca de módulos funcionais descrita por SEGAL et al. (2003; 2004) identificamos alguns módulos funcionais que apresentaram mudança de estado de ativação com significância estatística ($p \leq 0,05$), segundo o grupo de melanoma: desenvolvimento da epiderme; atividade de peptidase; comunicação celular; adesão celular; receptor neuroativo ligante e assinatura metastática. Além disso, através da abordagem hipóteses baseadas em dados, identificamos milhares de pares de genes funcionalmente relacionados que apresentaram significativa quebra de correlação segundo o grupo de melanoma. Dentre estes destacamos aqueles presentes nos módulos funcionais desenvolvimento da epiderme - *KLK7 (Kallikrein-7 precursor) x LAMA3 (Laminin, alpha 3)*; *KLK7 x EVPL (Envoplakin)*; *KLK7 x BNC (Basonuclin 1)* e *KLK7 x SCEL (Sciellin)*; atividade de peptidase - *KLK6 (Kallikrein-6 precursor) x KLK13 (Kallikrein-13 precursor)*; comunicação celular - *COL3A1 (Collagen, type III, alpha 1) x COL6A3 (Collagen, type VI, alpha 3)*; adesão celular - *GPR56 (G protein-coupled receptor 56) x POSTN (Periostin precursor)* e assinatura

metastática - *LUM* (*Lumican precursor*) x *COL6A3* e *IGFBP4* (*Insulin-like growth factor-binding protein 4*) x *IGF2* (*Insulin-like growth factor-2*). E finalmente, a partir das redes de relevância baseadas no processo de “descamação da epiderme” e no “sistema IGF” propusemos: 1) um mecanismo de transposição da lâmina basal ou de migração intra-epidérmica modulado, principalmente, por kalicreínas e por suas proteases-inibidoras; e 2) um mecanismo de sobrevivência e proliferação modulado por *IGFBP4* e por suas serina-proteases reguladoras (KLKs e MMPs).

SUMMARY

Martins, WK. [Analysis of gene expression profiling in human melanoma]. São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Cutaneous melanoma is the leading cause of skin cancer death in occidental countries, having as major etiological and predisposing factors the exposition to UV radiation, and genetic and epigenetic susceptibility. The tumorigenesis of melanoma is explained by a continuous malignant transformation, from normal melanocytes to melanocytic displasia and melanoma. The underlying molecular events that explain malignant melanoma genesis have been only partially characterized, and only a small number of genes have been identified as playing key roles in melanoma initiation and progression. Among these, some cell cycle regulators, apoptotic, signal transduction, cell adhesion, and matrix digestion genes have been demonstrated to be deregulated in this neoplasm. In current project, we determined the gene expression profiling in primary and metastatic human melanoma disease. We improved the methodology developing by SEGAL et al. (2003; 2004) to stablish some functional maps which demonstrated significant alteration ($p \leq 0,05$) when primary and metastatic disease were compared: epidermis development; peptidase activity; cell communication; cell adhesion; neuroactive ligand receptor and metastatic signature. Furthermore, we determined according to relevance networks concept pair of genes functionally related that showed significant alteration in your correlations coefficients when primary and metastatic disease were compared. Among these we report those related to epidermis development - *KLK7 (Kallikrein-7 precursor) x LAMA3 (Laminin, alpha 3)*; *KLK7 x EVPL (Envoplakin)*; *KLK7 x BNC (Basonuclin 1)* and *KLK7 x SCEL (Sciellin)*; peptidase activity - *KLK6 (Kallikrein-6 precursor) x KLK13 (Kallikrein-13 precursor)*; cell communication - *COL3A1 (Collagen, type III, alpha 1) x COL6A3 (Collagen, type VI, alpha 3)* cell adhesion - *GPR56 (G protein-coupled receptor 56) x POSTN (Periostin precursor)* and metastatic signature - *LUM (Lumican precursor) x COL6A3* and *IGFBP4 (Insulin-like growth factor-binding protein 4) x IGF2 (Insulin-like growth factor-2)*. And

finally, we proposed two biological processes for melanoma progression that were based on epidermis desquamation and IGF system relevance networks.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1 | Constituição da pele | 5 |
| Figura 2 | Classificação histológica do melanoma cutâneo | 9 |
| Figura 3 | Fases da progressão histológica da transformação maligna | 10 |
| Figura 4 | Classificação TNM para o melanoma cutâneo - AJCC 2002 | 15 |
| Figura 5 | Fluxograma da metodologia empregada | 24 |
| Figura 6 | Esquema da amplificação <i>in vitro</i> | 28 |
| Figura 7 | Gráficos do tipo <i>box-plot</i> apresentando as medianas das razões de intensidade (R e G) dos 48 <i>subarrays</i> que compõem as lâminas ILPC - 4.8K 02 | 50 |
| Figura 8 | MA-plot das razões de intensidade (R e G) referente à réplica do experimento controle para um melanoma primário | 51 |
| Figura 9 | Gráfico Ms (réplica do experimento controle com inversão dos corantes) versus Mm (experimento controle) de um conjunto de dados não-normalizado referente a um melanoma metastático | 53 |
| Figura 10 | <i>Scatter-plot</i> entre os valores de <i>background</i> local (R e G) para a amostra de melanoma metastático IM 04, experimento controle | 54 |
| Figura 11 | Gráfico Ms (réplica do experimento controle com inversão dos corantes) versus Mm (experimento controle) para um melanoma metastático após a normalização dos dados pelo método de LOWESS | 54 |
| Figura 12 | Variação no estado de ativação dos módulos funcionais entre melanomas primários e metastáticos | 56 |
| Figura 13 | Gráficos <i>box-plot</i> mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (<i>KLK7</i> e <i>LAMA3</i>) que contribuíram na classificação do módulo desenvolvimento da epiderme segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow | 59 |
| Figura 14 | Gráficos <i>box-plot</i> mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (<i>EMP1</i> e <i>CTGF</i>) que contribuíram na classificação do módulo desenvolvimento da epiderme segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow | 60 |

- Figura 15** Gráficos *box-plot* mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*KLK6* e *KLK13*) que contribuíram na classificação do módulo atividade de peptidase segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow 61
- Figura 16** Gráficos *box-plot* mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*C1R* e *DPP4*) que contribuíram na classificação do módulo atividade de peptidase segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow 62
- Figura 17** Gráficos *box-plot* gerados com base na intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*COL3A1*; *DSC3*; *LAMA3* e *VWF*) que contribuíram na classificação do módulo comunicação celular segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow 63
- Figura 18** Gráficos *box-plot* gerados com base na intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*COL4A1*; *COL17A1* e *THBS1*) que contribuíram na classificação do módulo comunicação celular segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow 64
- Figura 19** Gráficos *box-plot* mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*COL3A1*; *DSC3*; *LAMA3* e *VWF*) que contribuíram na classificação do módulo comunicação celular segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow 65
- Figura 20** Gráficos *box-plot* mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*COL4A1*; *COL17A1* e *THBS1*) que contribuíram na classificação do módulo comunicação celular segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow 66
- Figura 21** Gráficos *box-plot* gerados com base na intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*DSC3*; *FBLN5*; *GPR56* e *VWF*) que contribuíram na classificação do módulo adesão celular segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow 67

- Figura 22** Gráficos *box-plot* gerados com base na intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*CIQR1*; *FXVD5* e *POSTN*) que contribuíram na classificação do módulo adesão celular segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow 68
- Figura 23** Gráficos *box-plot* mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*DSC3*; *FBLN5*; *GPR56* e *VWF*) que contribuíram na classificação do módulo adesão celular segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow 69
- Figura 24** Gráficos *box-plot* mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*CIQR1*; *FXVD5* e *POSTN*) que contribuíram na classificação do módulo adesão celular segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow 70
- Figura 25** Gráficos *box-plot* mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*GPR35* e *GRIN2B*) que contribuíram na classificação do módulo receptor neuroativo ligante segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow 71
- Figura 26** Gráficos *box-plot* mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*NMU* e *P2RX1*) que contribuíram na classificação do módulo receptor neuroativo ligante segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow 72
- Figura 27** Gráficos *box-plot* gerados com base na intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*CCLI8*; *CTGF*; *FBNI* e *S100P*) que contribuíram na classificação do módulo assinatura metastática segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow 73
- Figura 28** Gráficos *box-plot* gerados com base na intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*IGFBP4*; *LUM*; *PLAU* e *SIATI*) que contribuíram na classificação do módulo assinatura metastática segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow 74

| | | |
|------------------|--|-----|
| Figura 29 | Gráficos <i>box-plot</i> mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (<i>CCL18</i> ; <i>CTGF</i> ; <i>FBN1</i> e <i>SI00P</i>) que contribuíram na classificação do módulo assinatura metastática segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow | 75 |
| Figura 30 | Gráficos <i>box-plot</i> mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (<i>IGFBP4</i> ; <i>LUM</i> ; <i>PLAU</i> e <i>SIATI</i>) que contribuíram na classificação do módulo assinatura metastática segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow | 76 |
| Figura 31 | Rede de relevância para o módulo desenvolvimento da epiderme | 78 |
| Figura 32 | Rede de relevância para o módulo atividade de peptidase | 79 |
| Figura 33 | Rede de relevância para o módulo comunicação celular | 80 |
| Figura 34 | Rede de relevância para o módulo adesão celular | 81 |
| Figura 35 | Rede de relevância para o módulo receptor neuroativo ligante | 82 |
| Figura 36 | Rede de relevância para o módulo assinatura metastática | 83 |
| Figura 37 | Mudanças na correlação entre pares de genes do módulo funcional desenvolvimento da epiderme | 92 |
| Figura 38 | Mudanças na correlação entre <i>KLK6</i> x <i>KLK13</i> em melanomas primários (círculos fechados) e melanomas metastáticos (quadrados abertos) | 94 |
| Figura 39 | Mudanças na correlação entre <i>COL3A1</i> x <i>COL6A3</i> em melanomas primários (círculos fechados) e melanomas metastáticos (quadrados abertos) | 95 |
| Figura 40 | Mudanças na correlação entre <i>POSTN</i> x <i>GPR56</i> em melanomas primários (círculos fechados) e melanomas metastáticos (quadrados abertos) | 96 |
| Figura 41 | Mudanças na correlação entre <i>COL6A3</i> x <i>LUM</i> em melanomas primários (círculos fechados) e melanomas metastáticos (quadrados abertos) | 97 |
| Figura 42 | Mudanças na correlação entre <i>IGF2</i> x <i>IGFBP4</i> em melanomas primários (círculos fechados) e melanomas metastáticos (quadrados abertos) | 98 |
| Figura 43 | Expressão das isoformas a e b de <i>DSC3</i> em nevos melanocíticos, melanomas cutâneos primários e metastáticos | 100 |

| | | |
|------------------|---|-----|
| Figura 44 | Análise da expressão gênica e protéica de galectina-3 em melanomas cutâneos | 102 |
| Figura 45 | Escore médio da marcação citoplasmática de galectina-3 em melanomas cutâneos primários e metastáticos | 103 |
| Figura 46 | Expressão gênica e protéica de kaliceína-7 em melanomas cutâneos | 106 |
| Figura 47 | Expressão gênica e protéica de kaliceína-7 em melanomas cutâneos, segundo o índice de Breslow | 107 |
| Figura 48 | Rede de relevância baseada no processo de descamação da epiderme | 114 |
| Figura 49 | Papel de KLK7 na descamação da epiderme e, invasão e migração das células de melanoma primário | 115 |
| Figura 50 | Rede de relevância baseada no sistema IGF | 121 |
| Figura 51 | Mecanismo regulatório de IGF em melanomas humanos | 123 |

LISTA DE TABELAS E QUADROS

| | | |
|-----------------|--|-------|
| Tabela 1 | Função dos genes que contribuíram significativamente para a classificação dos módulos funcionais ($p \leq 0,05$) | 57-8 |
| Tabela 2 | Associação da imunoreatividade citoplasmática de galectina-3 e o índice de Breslow | 104 |
| Quadro 1 | Módulos funcionais identificados na lâmina ILPC - 4.8K 02 | 39-40 |
| Quadro 2 | Características demográficas e clínicas dos melanomas primários | 47 |
| Quadro 3 | Características demográficas e clínicas dos melanomas metastáticos | 48 |
| Quadro 4 | Rede de relevância desenvolvimento da epiderme, segundo a função biológica e mudança de correlação | 84 |
| Quadro 5 | Rede de relevância atividade de peptidase, segundo a função biológica e mudança de correlação | 85 |
| Quadro 6 | Rede de relevância comunicação celular, segundo a função biológica e mudança de correlação | 86 |
| Quadro 7 | Rede de relevância adesão celular, segundo a função biológica e mudança de correlação | 87 |
| Quadro 8 | Rede de relevância receptor neuroativo ligante, segundo a função biológica e mudança de correlação | 88 |
| Quadro 9 | Rede de relevância assinatura metastática, segundo a função biológica e mudança de correlação | 89 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| ADORA1 | Adenosine A1 receptor |
| ADRB1 | Beta-1 adrenoreceptor |
| AGTR2 | Angiotensin II receptor, type 2 |
| AJCC-2002 | American Joint Committee on Cancer 2002 |
| AKT | v-akt murine thymoma viral oncogene |
| AKT2 | V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2 |
| ALOX5 | Arachidonate 5-lipoxygenase |
| ATGR1 | Angiotensin II receptor, type 1 |
| ATM | Ataxia telangiectasia mutated |
| BAD | BCL2-antagonist of cell death |
| BAX | BCL2-associated X protein |
| BCL2 | B-cell CLL/lymphoma 2 |
| BCL2A1 | BCL2-related protein A1 |
| BNC | Basonuclin 1 |
| B-RAF | B-Raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase |
| BSA | Bovine serum albumin |
| C1QR | Complement component 1, q subcomponent, receptor 1 |
| C1R | Complement component 1, r subcomponent |
| CASP6 | Caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase |
| CCL18 | Chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated) |
| CCL3 | Chemokine (C-C motif) ligand 3 |
| CCND1 | Cyclin D1 |
| CCR1 | Chemokine (C-C motif) receptor 1 |
| CDC25B | Cell division cycle 25 homolog B |
| CDC25C | Cell division cycle 25 homolog C |
| CDH3 | Cadherin 3, type 1, P-cadherin |
| CDK4 | Ciclin dependent kinase-4 |
| CDKN2A | Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A |
| CDSN | Corneodesmosin |
| COL17A1 | Collagen, type XVII, alpha 1 |
| COL3A1 | Collagen, type III, alpha 1 |
| COL4A1 | Collagen, type IV, alpha 1 |

| | |
|------------------|---|
| COL6A3 | Collagen, type VI, alpha 3 |
| CREB | cAMP responsive element binding protein |
| CTGF | Connective tissue growth factor |
| CTNND2 | Catenin delta 2 |
| CXCL1 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha |
| CXCL10 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 |
| CYR61 | Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61 |
| DAP | DapF diaminopimelate epimerase, <i>Bacillus subtilis</i> |
| DAPK1 | Death-associated protein kinase 1 |
| DEPC | Diethyl pyrocarbonate |
| DPP4 | Dipeptidylpeptidase 4 |
| DSC1 | Desmocollin 1 |
| DSC3 | Desmocollin 3 |
| E2F3 | E2F transcription factor 3 |
| ECM2 | Extracellular matrix protein 2 precursor |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic Acid, Disodium Salt, Dihydrate |
| EMP1 | Epithelial membrane protein 1 |
| EVPL | Envoplakin |
| FBLN2 | Fibulin 2 |
| FBLN5 | Fibulin 5 |
| FBN1 | Fibrillin 1 (Marfan syndrome) |
| FLJ11151I | Hypothetical protein FLJ11151 |
| FXYD5 | FXYD domain-containing ion transport regulator 5 |
| GPD1 | Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 |
| GPM6A | Glycoprotein M6A |
| GPR35 | G protein-coupled receptor 35 |
| GPR51 | G protein-coupled receptor 54 |
| GPR56 | G protein-coupled receptor 56 |
| GRB10 | Growth factor receptor-bound protein 10 |
| GRIN2B | Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B |
| GSR | Glutathione reductase |
| GSTT1 | Glutathione S-transferase theta 1 |
| HBP17 | FGF-binding protein |
| HEI10 | Human enhancer of invasion 10 |

| | |
|-----------------|---|
| HLA-DQB1 | Major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1 |
| HLA-DQB2 | Major histocompatibility complex, class II, DQ beta 2 |
| HPS1 | Hermansky-Pudlak syndrome 1 |
| IGF1R | Insulin-like growth factor receptor-1 |
| IGF2 | Insulin-like growth factor-2 |
| IGF2R | Insulin-like growth factor receptor-2 |
| IGFBP2 | Insulin-like growth factor-binding protein 2 |
| IGFBP4 | Insulin-like growth factor-binding protein 4 |
| IGFBP6 | Insulin-like growth factor-binding protein 6 |
| IGFBP7 | Insulin-like growth factor-binding protein 7 |
| IGFBPs | Insulin-like growth factor-binding proteins |
| IKZF5 | IKAROS family zinc finger 5 - Pegasus |
| IL-10R | Interleukin 10 receptor, alpha |
| ITGA1 | Integrin α 1 |
| ITGB1 | Integrin β 1 |
| ITGB3 | Integrin β 3 |
| KITLG | KIT ligand |
| KLK13 | Kallikrein-13 precursor |
| KLK6 | Kallikrein-6 precursor |
| KLK7 | Kallikrein-7 precursor |
| KLK8 | Kallikrein 8 (neuropsin/ovasin) |
| KLKs | Kallikreins |
| KTR5 | keratin 5 |
| LAMA3 | Laminin, alpha 3 |
| LGALS3 | Galectina 3 |
| LOWESS | Locally Weighted Scatter-plot Smoothing |
| LUM | Lumican precursor |
| LYS | trnY-Lys tRNA, <i>Bacillus subtilis</i> |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase |
| MAPK6 | Mitogen-activated protein kinase 6 |
| MAPK7 | Mitogen-activated protein kinase 7 |
| MEK2 | Mitogen-activated protein kinase kinase 2 |
| MITF | Microphthalmia-associated transcription factor |
| MMP10 | Matrix metalloproteinase-10 |
| MMP12 | Matrix metalloproteinase-12 |

| | |
|----------------|--|
| MMP27 | Matrix metalloproteinase-27 |
| MMP9 | Matrix metalloproteinase-9 |
| NELL2 | NEL-like protein 2 |
| NFκB | Nuclear factor NF-kappa-B |
| NGF | Neural growth factor |
| NMU | Neuromedin U |
| ORESTES | Open Reading frame ESTs |
| P2RX1 | Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1 |
| PAX8 | Paired box protein Pax-8 |
| PBS | Solução salina tamponada com fosfato a 0,10mMol/L pH 7.2 |
| PCDH1 | Protocadherin 1 |
| PDGFRA | Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide |
| PHE | trnD-Phe tRNA, <i>Bacillus subtilis</i> |
| PKA | Protein kinase, cAMP-dependent, |
| PKD1 | Polycystic kidney disease 1 |
| PLAU | Plasminogen activator, urokinase |
| POSTN | Periostin precursor |
| PRLR | Prolactin receptor precursor |
| PTEN | Phosphatase and tensin homolog |
| RAB32 | RAB32, member RAS oncogene family |
| RAF-1 | V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1 |
| RAS | GTPase Ras precursor |
| RBP1 | Retinol binding protein 1, cellular |
| RGP | Radial Growth Phase |
| RHO C | Ras homolog gene family, member C |
| ROS | Reactive oxygen species |
| RT-PCR | Reverse transcription – polymerase chain reaction |
| S100A2 | S100 calcium binding protein A2 |
| S100P | S100 calcium binding protein P |
| SAGE | Serial Analysis of Gene Expression |
| SARS | Seryl-tRNA synthetase |
| SCCE | Stratum corneum chymotryptic enzyme |
| SCEL | Sciellin |
| SCF | Stem cell factor |
| SDC4 | Syndecan 4 |

| | |
|---------------|--|
| SDS | Sodium dodecyl sulfate salt |
| SIAT1 | ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1 |
| SMART | Switch Mechanism At the 5' end of RNA Templates |
| SPP1 | Secreted phosphoprotein 1- osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1 |
| SSC | Sodium chloride (3,0 Mol/L); Trisodium citrate (0,3 Mol/L) pH 7.0 |
| STIM2 | Stromal interaction molecule 2 precursor |
| THBS1 | Thrombospondin 1 |
| THBS4 | Thrombospondin 4 |
| THR | trnB-Thr tRNA, <i>Bacillus subtilis</i> |
| TIFF | Tagged Information File Format |
| TMP21 | Transmembrane protein Tmp21 |
| TNM | Tumor-Node-Metastasis |
| TRP | trnD-Trp tRNA, <i>Bacillus subtilis</i> |
| TYRP-1 | Tyrosinase-related protein 1 |
| TYRP-2 | Tyrosinase-related protein 2 |
| UCHL3 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3 |
| VCL | Vinculin |
| VGP | Vertical Growth Phase |
| VWF | Von Willebrand factor |
| WNT5A | Wingless-type MMTV integration site family, member 5A) |

ÍNDICE

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 | O câncer | 1 |
| 1.2 | Estudando o melanoma cutâneo | 2 |
| 1.2.1 | Conhecendo a pele e seus principais constituintes | 2 |
| 1.3 | O melanoma cutâneo | 7 |
| 1.3.1 | Epidemiologia | 7 |
| 1.3.2 | Etiologia | 8 |
| 1.3.3 | Diagnóstico, estadiamento clínico e prognóstico | 14 |
| 1.3.4 | Análise da expressão gênica em melanomas cutâneos humanos | 17 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 22 |
| 3 | OBJETIVOS | 23 |
| 3.1 | Objetivos específicos | 23 |
| 4 | METODOLOGIA | 24 |
| 4.1 | Pacientes e amostras | 25 |
| 4.2 | Coleta das amostras e validação histopatológica | 25 |
| 4.3 | Extração do RNA total | 26 |
| 4.4 | Amplificação do RNA mensageiro e referência | 27 |
| 4.5 | Construção da lâmina de <i>cDNA microarray</i> | 31 |
| 4.6 | Marcação do RNA amplificado | 32 |
| 4.7 | Hibridização | 34 |
| 4.8 | Digitalização das imagens e quantificação | 35 |
| 4.9 | Normalização dos dados | 36 |
| 4.10 | Análise dos dados | 37 |
| 4.10.1 | Genes diferencialmente expressos | 38 |
| 4.10.2 | Determinação de Módulos Funcionais | 38 |
| 4.10.3 | Construção e análise de redes de relevância | 42 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.10.4 | Validação dos dados de expressão gênica | 43 |
| 5 | RESULTADOS | 46 |
| 5.1 | Amostras de melanomas humanos | 46 |
| 5.2 | Qualidade dos dados | 49 |
| 5.3 | Análises dos dados | 55 |
| 5.3.1 | Módulos funcionais | 55 |
| 5.3.2 | Redes de relevância | 77 |
| 5.3.3 | Validação dos dados de expressão gênica | 98 |
| 6 | DISCUSSÃO | 108 |
| 6.1 | Amostras de melanoma | 108 |
| 6.2 | Qualidade dos dados | 109 |
| 6.3 | Módulos funcionais e redes de relevância | 109 |
| 6.3.1 | A importância das kalicreínas no melanoma humano | 109 |
| 6.3.2 | Comunicação e adesão celular | 116 |
| 6.3.3 | Assinatura metastática | 118 |
| 6.4 | Validação dos dados de expressão gênica | 124 |
| 6.4.1 | Desmocolina-3 | 124 |
| 6.4.2 | Galectina-3 | 124 |
| 6.4.3 | Kalicreína-7 | 126 |
| 7 | CONCLUSÃO | 127 |
| 8 | REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA | 128 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER

O câncer se caracteriza por um crescimento celular anormal e desordenado que persiste mesmo após a suspensão do evento inicial da transformação maligna e que resiste aos eventos reguladores da proliferação celular, como a apoptose (IGNEY e KRAMMER 2002).

Segundo o proposto por HANAHAN e WEINBERG, em 2000, a malignização celular se manifesta à medida que essas seis essenciais habilidades são adquiridas: 1) autoproiferação; 2) escape aos mecanismos inibitórios do crescimento celular; 3) perda de senescência celular; 4) evasão à apoptose; 5) sustentação da angiogênese e linfangiogênese; 6) evasão tecidual e metástase (HANAHAN e WEINBERG 2000).

Ao longo da progressão do melanoma cutâneo, destacam-se além das aquisições consideradas anteriormente, aquelas relativas à “assinatura metastática *seed-soil*” (CHAMBERS et al. 2002) e à plasticidade celular (MANIOTIS et al. 1999; HESS et al. 2001; HENDRIX et al. 2001, 2002, 2003).

1.2 ESTUDANDO O MELANOMA CUTÂNEO HUMANO

Embora outros tumores sejam responsáveis pela elevada mortalidade por câncer no mundo, o melanoma cutâneo em estágio mais avançado se destaca pela sua elevada resistência terapêutica e mau prognóstico. O que reafirma a relevância de estudá-lo seja quanto aos aspectos clínicos, histopatológicos ou moleculares.

Assim, como principais alvos de estudo temos: 1) os mecanismos envolvidos no balanço coordenado da manutenção da homeostase celular; 2) as comunicações extracelulares, intracelulares e intercelulares dos melanomas; 3) a combinação das alterações genéticas (somáticas ou germinativas) e epigenéticas; e 4) as análises do perfil de expressão gênica entre melanomas primários e metastáticos.

Para uma melhor discussão sobre os aspectos biológicos, histopatológicos e moleculares do melanoma cutâneo, apresentaremos a seguir alguns princípios básicos sobre a pele e seus constituintes. Além de discutirmos sobre alguns aspectos que delineiam a transformação maligna do melanoma cutâneo.

1.2.1 Conhecendo a pele e seus principais constituintes

Pele

A pele é constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a **epiderme**, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a **derme**. Abaixo em continuidade com a derme encontra-se a hipoderme caracterizada por um tecido conjuntivo frouxo que pode conter muitas células adiposas, constituindo o

panículo adiposo. Embora não faça parte da pele, a hipoderme serve de união com os órgãos subjacentes (JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004).

A epiderme é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. A matriz extracelular é escassa e consiste, principalmente, de uma fina camada denominada **lâmina basal** que se situa subjacente ao epitélio. As células mais abundantes nesse epitélio são os queratinócitos. No entanto, a epiderme apresenta ainda três tipos celulares distintos – os melanócitos, as células de langerhans e as de Merkel (JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004).

A espessura e a estrutura da epiderme variam com o local estudado, sendo mais espessa e complexa na palma das mãos e na planta dos pés. Nessas regiões atinge a espessura de 1,5 mm e apresenta vista da derme para a superfície, cinco camadas:

- Camada basal – constituída por células prismáticas ou cubóides, basófilas conectadas à lâmina basal através de junções célula-matriz promovidas por integrinas, constituindo hemidesmossomas e contatos focais que se conectam, respectivamente, aos filamentos de queratina e de actina. Nessa camada encontram-se células-tronco responsáveis pela contínua renovação do epitélio epidérmico.
- Camada espinhosa – formada por queratinócitos cubóides ou ligeiramente achatados, os quais se mantem unidos através de junções célula-célula moduladas por interações homofílicas via E-caderinas e desmossomas que se conectam, respectivamente, aos filamentos de actina e de queratina.
- Camada granulosa – formada por queratinócitos poligonais achatados, núcleo central e citoplasma granuloso e basófilo. Essas células apresentam

os grânulos lamelares que contêm discos lamelares formados por camadas lipídicas envoltos por membrana.

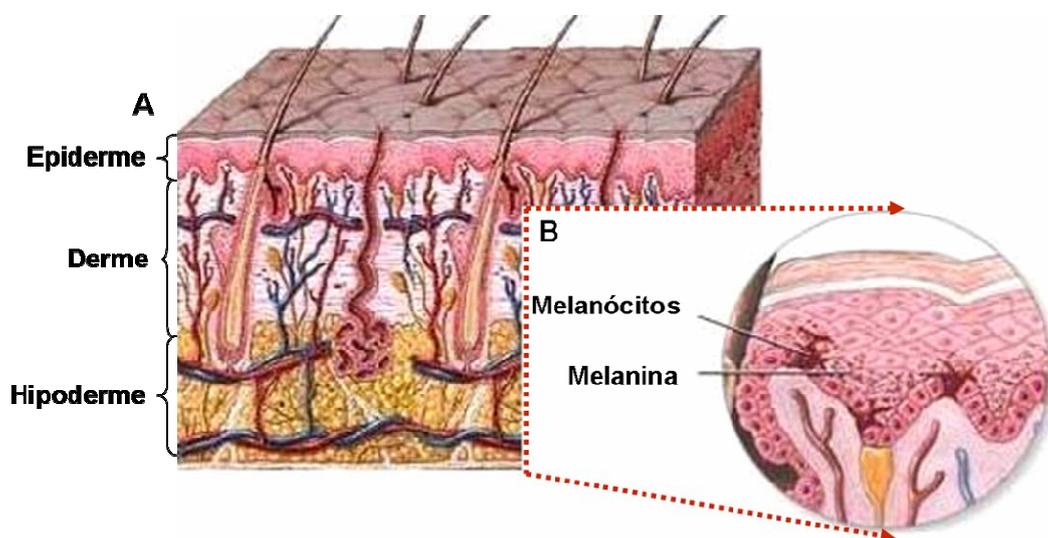
- Camada lúcida – mais evidente na pele espessa e constituída por uma delgada camada de queratinócitos achatados, eosinófilos e translúcidos, cujos núcleos e organelas citoplasmáticas foram digeridos por enzimas lisossomais.
- Camada córnea – apresenta espessura variável e é constituída por queratinócitos achatados, mortos e sem núcleo, e cujo citoplasma apresenta-se repleto de queratina. Representa o último estadió de diferenciação dos queratinócitos, os quais foram transformados em células sem vida e que descamam continuamente (JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004).

A pele fina ao contrário da espessa não apresenta as camadas granulosa e lúcida, apresentando ainda uma camada córnea muito reduzida (JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004).

A derme é constituída por um tecido conjuntivo cuja espessura varia de acordo com a região observada, atingindo um máximo de 3,0 mm na planta do pé. Sua superfície externa é irregular, observando-se saliências, **as papilas dérmicas** que acompanham as reentrâncias correspondentes da epiderme (JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004).

A derme é formada por duas camadas, de limites pouco distintos: a papilar (superficial) e a reticular (mais profunda). A camada papilar é fina, constituída por tecido conjuntivo frouxo que forma as papilas dérmicas. Nesta camada foram descritas fibrilas especiais de colágeno que se inserem por um lado na lâmina

basal e pelo outro penetram profundamente na derme. A camada reticular é mais espessa, constituída por tecido conjuntivo denso. Ambas as camadas contêm muitas fibras elásticas responsáveis em parte pela elasticidade da pele. Além dos vasos sanguíneos e linfáticos, dos nervos, de folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004).



Legenda: Esquema da pele apresentando suas três camadas (A) e a localização dos melanócitos na epiderme, em maior aumento (B).

Fonte: Adaptação de *Medline Plus, Medical encyclopedia* (2004).

Figura 1 – Constituição da pele.

Melanócitos

Os melanócitos são derivados da crista neural embrionária, sendo responsáveis pela fotoproteção da pele, através da produção do pigmento melanina que protege os queratinócitos adjacentes e as demais células epidérmicas do dano celular que a radiação solar provoca. Os melanócitos se encontram na

junção dermo-epidérmica estando conectados, através de hemidesmossomas, à lâmina basal onde representam 10% da população celular total (Figura 1B).

Os melanócitos apresentam terminações dendríticas que os conectam a queratinócitos das camadas basal e espinhosa compondo a unidade pigmentar epidérmica. Esta interação melanócito-queratinócito é mediada por moléculas de adesão específicas, conexinas (HSU et al. 2000a), E-caderina (GUMBINER 2000) e desmogleínas. A interação via E-caderina, por exemplo, apresenta um papel crítico no controle dos melanócitos pelos queratinócitos (TANG et al. 1994; HSU et al. 1996, 2000a e b; LI et al. 2002).

De acordo com a revisão de SOENGAS e LOWE em 2003, os melanócitos são dependentes de BCL2 para sobreviverem, cuja expressão é estimulada pelos fatores de crescimento NGF (*Neural growth factor*) (ZHAI et al. 1996) e SCF (*Stem cell factor*) (KAWAGUCHI et al. 2001) secretados por queratinócitos. O fator SCF se liga ao seu receptor c-Kit com conseqüente transativação do fator de transcrição MITF (*Microphthalmia-associated transcription factor*) responsável pela ativação da transcrição dos genes: 1) *TYRP-1 (Tyrosinase-related protein 1)* e *TYRP-2 (Tyrosinase-related protein 2)* responsáveis pela proliferação e diferenciação dos melanócitos (KAWAGUCHI et al. 2001); 2) e do fator antiapoptótico *BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2)* (MCGILL et al. 2002).

Ao longo da transformação maligna dos melanócitos, ocorrem alterações nas comunicações intercelulares que conferem às células de melanoma habilidade de superar os sinais antiproliferativos, migrando assim para sítios à distância ou locoregionais (LI et al. 2003).

Uma das principais alterações é a perda progressiva de E-caderina (DANEN et al. 1996; HSU et al. 1996; LI et al. 2001). Além disso, a reprogramação das moléculas de adesão em células de melanoma (expressão de N-caderina, Mel-CAM e β 3-integrinas) contribui para a produção de sinais de sobrevivência: inativação de PTEN e ativação constitutiva de AKT (*v-akt murine thymoma viral oncogene*), NF κ B e da via RAS/RAF/MAPK. Estes sinais de sobrevivência, além de promoverem proliferação e invasão, suprimem os mecanismos intrínseco e extrínseco de morte programada (SOENGAS e LOWE 2003).

A expressão de N-caderina é uma das responsáveis pela agregação homofílica entre células de melanoma e fibroblastos, e também, células endoteliais da derme, implicando em migração e extravasamento para a circulação sanguínea (HSU et al. 2000a, 200b; LI et al. 2001).

1.3 O MELANOMA CUTÂNEO

1.3.1 Epidemiologia

O melanoma cutâneo é um câncer epidêmico nos Estados Unidos e países ocidentais, onde sua incidência tem aumentado drasticamente por décadas, a uma taxa de aproximadamente 5% ao ano (STADELMANN et al. 1998; TUCKER e GOLDSTEIN 2003).

Segundo as estimativas de incidência de câncer no Brasil, foram previstos, para 2006, 2.710 casos novos em homens e 3.050 em mulheres. As maiores taxas

estimadas em homens e mulheres encontram-se na região Sul (Ministério da Saúde 2005).

Nos países desenvolvidos, a sobrevida média estimada em cinco anos é de 73%, enquanto que, para os países em desenvolvimento, a sobrevida média é de 56%. A média mundial estimada é de 69% (Ministério da Saúde 2005).

1.3.2 Etiologia

Origem

O melanoma cutâneo se origina da transformação maligna dos melanócitos, podendo ser classificado em quatro subtipos: extensivo superficial; nodular; lentigo maligno; e acral lentiginoso, os quais apresentam distintas características histopatológicas, clínicas e biológicas. Esta subclassificação baseia-se, primariamente, na localização anatômica e nos padrões de crescimento, conforme revisado por CHUDNOVSKY et al. em 2005, Figura 2.

O melanoma cutâneo pode se originar de lesões precursoras (nevus displásicos e atípicos), ou mais freqüentemente sem associação com doença pré-maligna (CHUDNOVSKY et al. 2005). Cerca de 8-12% dos melanomas têm características hereditárias, (FOUNTAIN et al. 1990), enquanto 18% a 35% são produtos da transformação de um nevo pré-existente (NEWTON et al. 1993; BRUCE e BRODLAND 2000).

| | Subtipos | Freqüências | Sítios | Características |
|---|---------------------------------|--------------------|--|--|
|  | Extensivo superficial | 70% | Tronco  Pernas  | RGP, 1 - 5 anos |
|  | Nodular | 10 – 25% | Tronco  Pernas  | RGP, 6 - 18 meses |
|  | Acral lentiginoso | 5% | Palmas, solas e unhas | Não se associa à exposição solar crônica; afeta todas as etnias; representa 30 – 70% dos melanomas em negros |
|  | Lentigo maligna melanoma | <1% | Cabeça e pescoço de idosos | Associa-se à exposição solar crônica RGP, 3 - 15 anos |

Fonte: Adaptação de CHUDNOVSKY et al. (2005).

Figura 2 - Classificação histológica do melanoma cutâneo.

O processo tumorigênico do melanoma cutâneo

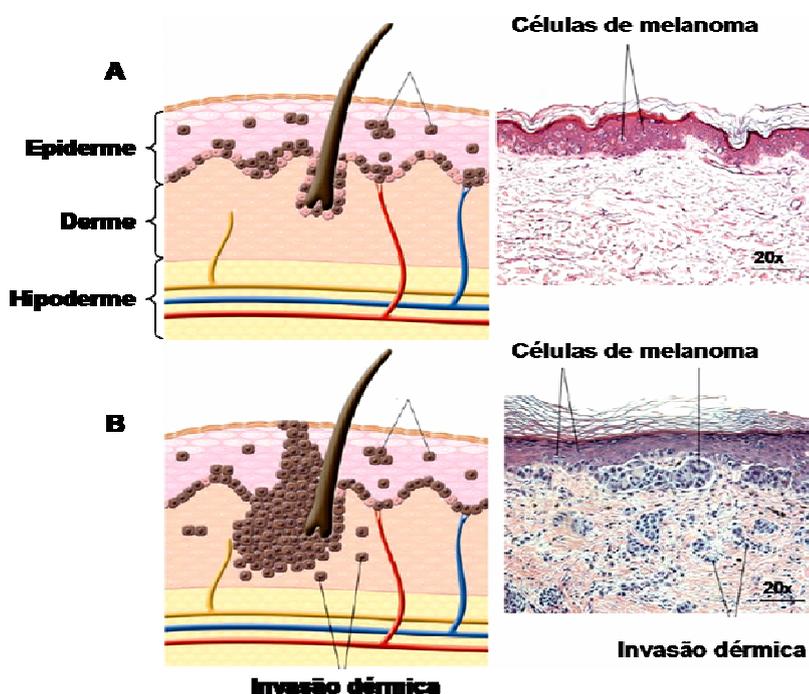
Um modelo aceito para o processo tumorigênico do melanoma cutâneo é a transformação contínua dos melanócitos normais à displasia melanocítica, e por último ao melanoma maligno (HUSSEIN 2004).

A lesão benigna designada como nevo melanocítico comum representa a etapa inicial do curso da proliferação melanocítica. Nesta fase, células névicas proliferam ao longo da junção dermo-epidérmica constituindo uma hiperplasia melanocítica juncional estável e persistente.

Havendo aquisição e acúmulo de alterações genéticas que culminem para atipia e displasia celular, as células névicas prosseguem para a segunda etapa da progressão melanocítica definida como displasia melanocítica. Esta fase representa o início do processo da transformação maligna dos melanócitos, apesar do crescimento celular ainda ser limitado e controlado.

Contudo, uma vez adquirida autonomia parcial do crescimento celular representada pela habilidade de proliferar independentemente e indefinidamente, melanócitos displásicos se transformam em células de melanoma em fase de crescimento radial - RGP (*Radial Growth Phase*).

A etapa subsequente da progressão do melanoma RGP para uma fase freqüentemente mais invasiva, definida como fase de crescimento vertical - VGP (*Vertical Growth Phase*) representa a etapa mais crucial da progressão tumoral do melanoma cutâneo. Durante esta transição células de melanoma VGP adquirem maior capacidade autoproliferativa, de sobrevivência e de invasão, conforme podemos visualizar na Figura 3. E a extensão desta autonomia do crescimento celular direciona a trajetória do melanoma primário, progredindo para o estadiu mais avançado da progressão melanocítica definido como melanoma metastático.



Legenda: (A) Melanoma *in situ* RGP; (B) Melanoma maligno VGP.

Fonte: CHUDNOVSKY et al. (2005).

Figura 3 - Fases da progressão histológica da transformação maligna.

Fatores de risco

Vários fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma já foram descritos, incluindo sensibilidade à luz solar; pele clara e do tipo I; cabelos e olhos claros; tendência a sardas; história familiar de melanoma; nevo displásico; aumento do número de nevos atípicos; nevo congênito e imunossupressão (*American Academy of Dermatology*). Embora a exposição solar seja considerada o principal fator etiológico para o melanoma cutâneo, o risco associado a este tumor não está completamente definido (RIVERS 2004; RAGER et al. 2005).

Queimaduras, especialmente na infância (WHITEMAN et al. 2001), e exposição intermitente aumentam o risco para o melanoma cutâneo, porém exposições cumulativas e ocupacionais parecem não aumentar este risco (HELFAND E KRAGES 2003). Há indícios de que a exposição ocupacional de alguma forma proteja contra o melanoma (ELWOOD e JOPSON 1997; HAKANSSON et al. 2001).

Estes achados sugerem que fatores que direcionam o desenvolvimento do melanoma variam de acordo com o fenótipo e condições ambientais experimentadas pelo indivíduo (RIVERS 2004).

Radiação solar

A luz solar é composta por um espectro contínuo de radiação eletromagnética - infravermelho visível (400-700 nm) e ultravioleta (200-400 nm). Os comprimentos de onda mais nocivos e carcinogênicos são os que cobrem quase todo o espectro da radiação ultravioleta (UV): UVA (320-400 nm) e UVB (280-320 nm) (JHAPPAN et al. 2003). Contudo, o papel exato destes no processo

de malignização não é totalmente conhecido, embora haja dados na literatura indicando a sua importância:

1. ativação de receptores tirosina-quinases (RTKs) com consequente ativação de ambas as vias RAS/RAF/MAPK quinase (DEVARY et al. 1992; RADLER-POHL et al. 1993) e PI3K/AKT (WAN et al. 2001);
2. ativação do receptor MC1R (SUZUKI et al. 1999; ROUZAUD et al. 2005) com consequente ativação de AMP-cíclico que irá ativar PKA/CREB (BUSCA e BALLOTTI 2000) que medeia a transcrição do fator *MITF* responsável por modular melanogênese e resistência à apoptose (GILCHREST e ELLER 1999). Além disso, há ativação também da via RAS/B-RAF/MAPK quinase (BUSCA et al. 2000).
3. provoca lesões diretas na molécula de DNA UVB-dependentes: formação de dímeros de pirimidina (fotoproducto 6-4 e dímeros ciclobutano de timina ou citosina); e lesões indiretas UVA-dependentes: produção de oxigênio reativo – ROS e radicais livres (JHAPPAN et al. 2003).

A exposição solar se apresenta como fator iniciador do processo de tumorigênese, principalmente para indivíduos com histórico familiar de melanoma ou com fenótipo considerado de risco (propensão a nevo e sardas; nevo atípico e displásico; pele clara e do tipo I; cabelos e olhos claros). No entanto, para indivíduos com melanócitos com baixa tendência a se desenvolver dentro de um nevo, esta passa a ser o principal promotor de malignização e desenvolvimento do melanoma cutâneo (RIVERS 2004).

De forma sucinta, teríamos, então, dois processos para o desenvolvimento do melanoma: um relacionado ao grau de exposição solar e outro relacionado à instabilidade melanocítica (RIVERS 2004).

De fato, melanomas associados à exposição crônica solar, freqüentemente, apresentam neoplasmas contíguos, tais como ceratoses, e se desenvolvem mais tarde em decorrência de aberrações cromossômicas UV-induzidas (CURTIN et al. 2005).

A transformação maligna sem associação à exposição crônica solar pode ser explicada, ou por mutações em *B-RAF* (*B-Raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*) juntamente com depleção de *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*); ou por mutações somente no proto-oncogene *N-RAS*. Todavia, em melanomas acrais, não-UV associados, são mais freqüentes ampliações dos genes *CCND1* (*Cyclin D1*); *CDK4* (*Ciclin dependent kinase-4*) e deleção de *CDKN2A* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) (CURTIN et al. 2005).

Além destas alterações associadas ou não à radiação UV, há uma infinidade de alterações genéticas (SHANLEY et al. 1995; DEGEN et al. 1996; SMITH-SORENSEN e HOVIG et al. 1996; ZUO et al. 1996; GULDBERG et al. 1997; TENG et al. 1997; SAUTER E HERLYN 1998; SOUFIR et al. 1998; AITKEN et al. 1999; STRANGE et al. 1999; PALMER et al. 2000; AUROY et al. 2001; KENNEDY et al. 2001; DAVIES et al. 2002; BISHOP et al. 2002; HEWITT et al. 2002; SHAHBAZI et al. 2002; CHIN 2003; SNOO e HAYWARD 2005) e epigenéticas (ESTELLER et al. 2000; SPUGNARDI et al. 2003;

FURUTA et al. 2004; HOON et al. 2004) que se integram na progressão melanocítica.

Para muitas das alterações associadas ao melanoma cutâneo, variações no nível de expressão de vários genes já foram identificadas (SAUTER E HERLYN 1998; SLOMINSKI et al. 1998, 2001; HALPERN e ALTMAN 1999; BITTNER et al. 2000; WANG e MARINCOLA 2000; NEWELL-PRICE et al. 2001; CARR et al. 2003; MIRMOHAMMADSADEGH et al. 2004; SMITH et al. 2004; WEERARATNA et al. 2004; NAMBIAR et al. 2004; HAQQ et al. 2005; WINNEPENNINCKX et al. 2006).

1.3.3 Diagnóstico, estadiamento clínico e prognóstico

Diagnóstico

O diagnóstico é baseado quanto à presença de melanócitos atípicos proliferando ao longo da junção dermo-epidérmica. A abordagem consenso para se avaliar uma lesão macroscopicamente é a triagem dermatoscópica (NACHBAR et al. 1994).

Em casos de suspeita de malignização, remove-se a lesão através de biópsias excisionais ou incisionais, as quais são analisadas histopatologicamente. Após a confirmação do diagnóstico, determinar-se o estadiamento e o plano de seguimento clínico (MASCI e BORDEN 2002; NEVES et al. 2003; TOVO et al. 2003).

Estadiamento clínico

O estadiamento do melanoma cutâneo é regido por critérios de análise clínica e histopatológica estabelecidos pelo comitê americano AJCC-2002 (*American Joint Committee on Cancer 2002*) (BALCH et al. 2000, 2001a, 2001b).

A fim de praticidade, reprodutibilidade e aplicabilidade, o protocolo AJCC-2002 adotou algumas normas, as quais baseadas na classificação TNM (*Tumor-Node-Metastasis*) são capazes de estratificar a evolução clínica e histopatológica do melanoma cutâneo em diferentes níveis de estádios - 0 ao IV, Figura 4 (BALCH et al. 2000, 2001b).

| Classificação T | | |
|------------------------|---|---|
| T1 | ≤ 1,0 mm | a: sem ulceração ou Clark I/II b: com ulceração ou Clark IV/V |
| T2 | 1,01 - 2,0 mm | a: sem ulceração b: com ulceração |
| T3 | 2,01 - 4,0 mm | a: sem ulceração b: com ulceração |
| T4 | > 4,0 mm | a: sem ulceração b: com ulceração |
| Classificação N | | |
| N1 | 1 linfonodo | a: micro metástase b: macro metástase |
| N2 | 2 a 3 linfonodos | a: micro metástase b: macro metástase c: metástases em trânsito/nódulos satélites <i>SEM metástase linfonodal</i> |
| N3 | ≥ 4 linfonodos; ou a combinação de metástase em trânsito/nódulos satélites | <i>COM metástase linfonodal</i> |
| Classificação M | | |
| M1 | À distância em pele, tecido subcutâneo ou linfonodos | LDH sérico normal |
| M2 | Pulmão | LDH sérico normal |
| M3 | Outros órgãos viscerais | LDH sérico normal |
| | Quaisquer metástases à distância | LDH sérico elevado |

Fonte: BALCH et al. (2001b).

Figura 4 - Classificação TNM para o melanoma cutâneo - AJCC 2002.

Prognóstico

Dentre os fatores de prognósticos mais importantes para o melanoma cutâneo localizado, destacam-se a espessura do tumor (T) dada pelo índice de Breslow (BRESLOW 1970) e a presença ou ausência de ulceração (BALCH et al. 2001b).

A espessura do tumor é medida em milímetros da camada granulosa da epiderme até a célula de melanoma mais profunda na derme (BRESLOW 1970). O aumento da espessura do tumor está associado com pior sobrevida (BALCH et al. 2001b). Embora o nível Clark, definido por Wallace Clark (1969) e citado por Balch (BALCH et al, 2001b p.3639), tenha sido muito usado no estadiamento do melanoma, atualmente, é considerado um fator preditivo somente para melanomas finos ($\leq 1,0\text{mm}$), Figura 4.

O nível de Clark corresponde à profundidade da invasão do melanoma na derme em cinco níveis: I) melanoma confinado à epiderme sem invasão da derme papilar; II) invasão da derme papilar, porém com pequeno número de células de melanoma atingindo a interface entre a derme papilar e reticular; III) comprometimento de toda a derme papilar até a transição com a derme reticular sem, porém invadí-la; IV) invasão da derme reticular e V) invasão da hipoderme.

A ulceração, determinada histopatologicamente, é definida como ausência de epiderme intacta, recobrimdo uma significativa porção do tumor primário. Um dado importante é que a ulceração diminui a sobrevida em todas as categorias de espessura, tratando-se do único fator preditivo capaz de modificar o prognóstico de pacientes com doença linfonodal positiva (BALCH et al. 2001a, 2001b; 2003; HOMSI et al. 2005).

Um dos fatores que preconiza um prognóstico ruim para o melanoma é a sua capacidade metastática, porém os mecanismos relacionados a esta habilidade ainda não foram totalmente esclarecidos. Como estes tumores metastáticos não apresentam subclasses histopatológicas fixas e bem definidas (CARR et al. 2003), estes são considerados excelentes alvos de estudo de expressão gênica diferencial, possibilitando a identificação de marcadores moleculares correlacionados às metástases.

1.3.4 Análise da expressão gênica em melanomas cutâneos humanos

Prévias análises de transcriptomas de melanomas cutâneos têm contribuído grandemente para o melhor entendimento da sua progressão. Há vários trabalhos na literatura que já identificaram, através da análise do perfil de expressão gênica, alguns possíveis candidatos a marcadores de prognóstico e, ou diagnóstico, ou mesmo alvos terapêuticos.

Para isso, muitas técnicas têm sido empregadas, desde técnicas mais simples às mais robustas: *Northern Blot*; *RT-PCR* (*Reverse transcription – polymerase chain reaction*); *Real Time PCR*; *SAGE* (*Serial Analysis of Gene Expression*); *SMART* (*Switch Mechanism At the 5'end of RNA Templates*) e *Microarrays* de oligonucleotídeos e de cDNA's

Dos trabalhos empregando ensaio de *Real Time PCR* quantitativo, destaca-se o estudo da expressão de antígenos associados à diferenciação de melanoma – *TYRP-1*; *TYRP-2*; *MLANA* (*Melan-A*). Este trabalho demonstrou que a expressão elevada dos genes *TYRP-1* e *TYRP-2* apresentava correlação estatisticamente

significativa com a sobrevida de pacientes com doença avançada (TAKEUCHI et al. 2003).

Dos poucos estudos utilizando SAGE, destaca-se o trabalho publicado por Weeraratna e colaboradores em 2004. Os resultados obtidos neste estudo corroboram com prévias análises por *microarrays*, confirmando a importância da sinalização celular modulada pelo cálcio intracelular, pelos receptores acoplados à proteína G e pela família Wnt/Frizzled (BITTNER et al. 2000). Nesta biblioteca de SAGE, um dos genes mais significativamente expresso foi o gene regulador de cálcio *p94* (*Calpain 3*). Através da análise por imuno-histoquímica foi demonstrado que *p94* move-se do núcleo de células névicas para o citoplasma de células de melanoma, sugerindo a ativação da sua proteinase intracelular (WEERARATNA et al. 2004).

Além de WEERARATNA et al. (2004) e SMITH et al. (2004) estabeleceram o padrão de expressão dos seguintes transcritos: *ATM* (*Ataxia telangiectasia mutated*), *HEI10* (*Human enhancer of invasion 10*), *PKD1* (*Polycystic kidney disease 1*), *IL-10R* (*Interleukin 10 receptor, alpha*), e de *FLJ111511* (*Hypothetical protein FLJ11151*) em nevus e melanomas malignos.

Da imensa informação gerada através de *microarrays* destacamos os genes *WNT5A* (*Wingless-type MMTV integration site family, member 5A*); *RHO C* (*Ras homolog gene family, member C*); *ITGB1* (*Integrin β 1*); *ITGB3* (*Integrin β 3*) e *ITGA1* (*Integrin α 1*); *SDC4* (*Syndecan 4*); *VCL* (*Vinculin*) cuja alteração na expressão pode contribuir principalmente no aumento de motilidade e potencial de invasão em melanomas humanos (BITTNER et al. 2000; CLARK et al. 2000; WEERARATNA et al. 2002).

MCGILL et al. (2002) usando *arrays* de oligonucleotídeos para identificar alvos transcricionais para o fator MITF mostraram regulação do gene anti-apoptótico *BCL2* por MITF.

Analisando o perfil de expressão de metástases de melanomas e melanócitos primários, Mirmohammadsadegh e colaboradores observaram aumento da expressão de *GRB10* (*Growth factor receptor-bound protein 10*) e diminuição dos genes pró-apoptóticos *BAX* (*BCL2-associated X protein*) e *BAD* (*BCL2-antagonist of cell death*), e das glutationas envolvidas na desintoxicação e redução do *stress* celular *GSTT1* (*Glutathione S-transferase theta 1*) e *GSR* (*Glutathione reductase*) (MIRMOHAMMADSADEGH et al. 2004).

Ainda, em outro estudo de análise de expressão gênica, Nambiar e colaboradores identificaram dentre os genes mais diferencialmente expressos, cuja expressão estava aumentada em pelo menos duas vezes em metástases de melanomas cutâneo: *AKT2* (*V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2*); *B-RAF*; *RAF-1* (*V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1*); *GRB10*; *MEK2* (*Mitogen-activated protein kinase kinase 2*); *MAPK6* (*Mitogen-activated protein kinase 6*); *MAPK7* (*Mitogen-activated protein kinase 7*); *E2F3* (*E2F transcription factor 3*); *c-met* e *CDC25C* (*Cell division cycle 25 homolog C*); ou pelo menos duas vezes menos expressos: *DSC1* (*Desmocolin 1*) e *DSC3* (*Desmocolin 3*); *CTNND2* (*Catenin delta 2*); *PCDH1* (*Protocadherin 1*); *IGF1R* (*Insulin-like growth factor receptor-1*); *IGF2* (*Insulin-like growth factor-2*); *IGFBP2* (*Insulin-like growth factor-binding protein 2*), *IGFBP4* (*Insulin-like growth factor-binding protein 4*); *IGFBP6* (*Insulin-like growth factor-binding protein 6*); *DAPK1* (*Death-associated protein kinase 1*) (NAMBIAR et al. 2005).

Em um esforço de se entender melhor a transformação maligna dos melanócitos, Haqq e colaboradores, usando *microarrays* com 20.862 cDNAs, examinaram assinaturas moleculares de conhecidas passagens do modelo de progressão tumoral do melanoma cutâneo, de lesões benignas ao melanoma primário e metastático. Na análise de expressão diferencial entre as fases radial e vertical de uma mesma lesão primária, mostraram perda de expressão dos genes *MMP10* (*Matrix metalloproteinase 10*) e *CDH3* (*Cadherin 3, type 1, P-cadherin*) durante a transição da fase de crescimento radial para vertical.

Além disso, identificaram um grupo de genes relacionados à diferenciação melanocítica - *GPM6A* (*Glycoprotein M6A*); *CCL18* (*Chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)*); *MLANA*; *TYRP-1*; à transformação maligna - *CXCL1* (*Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)*); *CDC25B* (*Cell division cycle 25 homolog B*); *SARS* (*Seryl-tRNA synthetase*); *CCL3* (*Chemokine (C-C motif) ligand 3*); *CXCL10* (*Chemokine (C-X-C motif) ligand 10*); *BCL2A1* (*BCL2-related protein A1*); *RAB32* (*RAB32, member RAS oncogene family*); *SPP1* (*Secreted phosphoprotein 1- osteopontin, bone sialoprotein 1, early T-lymphocyte activation 1*); dentre outros). Identificaram também um grupo de genes cuja expressão foi perdida ao longo da metastatização - *IGFBP7* (*Insulin-like growth factor-binding protein 7*); *HLA-DQB1* (*Major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1*); *S100A2* (*S100 calcium binding protein A2*); *RBP1* (*Retinol binding protein 1, cellular*); *GPD1* (*Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1*); *LUM* (*Lumican precursor*); *HPS1* (*Hermansky-Pudlak syndrome 1*); *TMP21* (*Transmembrane protein Tmp21*); *COL6A3* (*Collagen, type VI, alpha 3*); *IKZF5* (*IKAROS family zinc*

finger 5 - Pegasus); ALOX5 (Arachidonate 5-lipoxygenase); COL3A1 (Collagen, type III, alpha 1); KITLG (KIT ligand); PDGFRA (Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide); FBLN2 (Fibulin 2); HLA-DQB2 (Major histocompatibility complex, class II, DQ beta 2) (HAQQ et al. 2005).

2 JUSTIFICATIVA

Apesar da viabilização de programas de educação e orientação sobre o risco da exposição solar, o melanoma cutâneo continua sendo um problema de saúde pública. E isto se reflete no aumento de sua incidência a uma taxa de aproximadamente 5% ao ano (STADELMANN et al. 1998; TUCKER e GOLDSTEIN 2003).

Embora haja grandes esforços científicos de caráter epidemiológico e clínico, muitas questões relativas aos paradigmas biológicos do melanoma cutâneo humano permanecem, ainda, em discussão. E é neste contexto que este projeto pretendeu contribuir. A partir do estudo do estado de ativação ou inativação de módulos funcionais indicamos vias ou processos biológicos que possam estar relacionados à progressão do melanoma primário para o seu estadio mais agressivo, o metastático. Além de construir, também, redes de relevância, seguindo o conceito de hipóteses baseadas em dados, para os módulos funcionais avaliados.

3 OBJETIVOS

Analisar o perfil de expressão gênica em melanomas humanos por *cDNA microarrays*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Determinar o perfil da expressão gênica em tumores primários e metastáticos de melanoma cutâneo, utilizando-se a tecnologia de *cDNA microarrays*;
- 2.** Determinar módulos funcionais alterados segundo o grupo de melanoma;
- 3.** Construir redes de relevância entre genes funcionalmente relacionados.

4 METODOLOGIA

As amostras de melanomas foram devidamente processadas conforme o fluxograma a seguir:

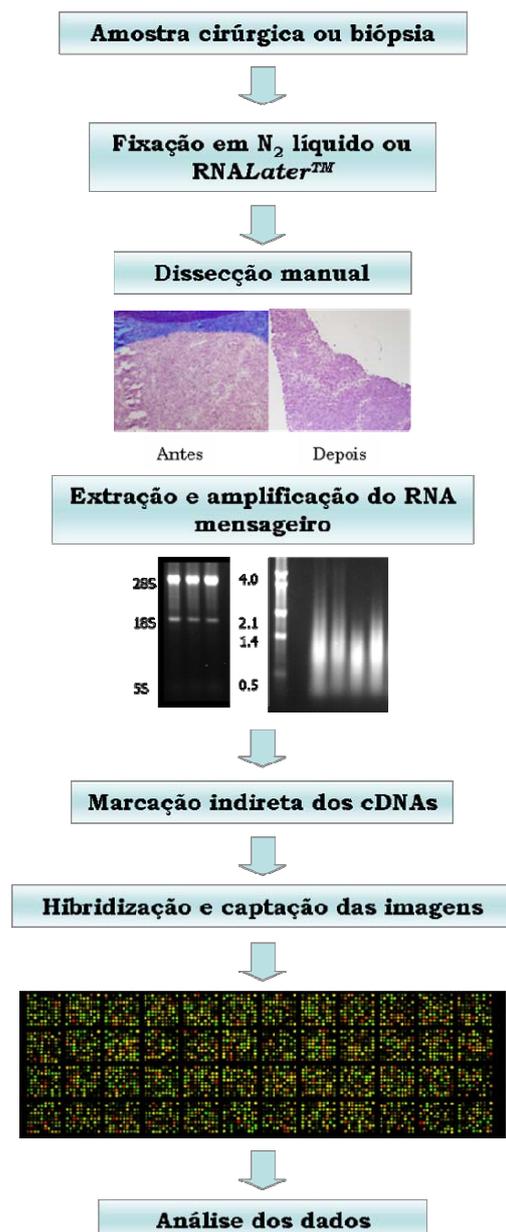


Figura 5 – Fluxograma da metodologia empregada.

4.1 PACIENTES E AMOSTRAS

Pacientes atendidos no Departamento de Oncologia Cutânea do Hospital A. C. Camargo foram convidados a participar deste estudo, aprovado pela comissão de Ética em Pesquisa do Hospital A. C. Camargo. Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento, também, aprovado pela comissão de Ética em Pesquisa do Hospital A. C. Camargo - protocolo nº 567/04, em 27 de janeiro de 2004. O anonimato dos pacientes foi garantido pela codificação numérica, seguindo o sugerido por GRIZZLE et al. (1999).

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS E VALIDAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

As amostras foram obtidas cirurgicamente sem comprometimento dos exames anatomopatológicos e fixadas em *RNA LaterTM* (Ambion, EUA), conforme o proposto por FLORELL et al., em 2001; ou ainda, congeladas em nitrogênio líquido.

Antes de serem processadas, todas as amostras foram submetidas à confirmação histopatológica. Esta validação visa não somente a confirmação do diagnóstico, mas também a avaliação da amostra quanto à presença de necrose, infiltrado inflamatório, estroma, epiderme e tecido adiposo. Pelo fato do melanoma cutâneo apresentar algumas limitações relevantes, tais como o elevado índice de necrose, como também a própria histologia da pele (contigüidade da

epiderme e estroma), optamos por manter um critério mínimo de 60% do tecido tumoral em todas as amostras.

Para a análise descritiva da amostragem foi utilizado o pacote estatístico para Windows - SPSS 13.0.

4.3 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

Para a extração do RNA total utilizamos o kit *RNEasy Midi KitTM* (Qiagen, EUA) que nos possibilitou a extração livre do pigmento melanina, conforme sugerido por KYVERIS et al. em 2002.

A avaliação da quantidade e grau de pureza do RNA total extraído foi efetuada em espectrofotômetro (GeneQuant, Clamart Cedex, França), onde se detecta absorbâncias a 230nm, 260nm e 280nm. As amostras consideradas como ótimas e livres de contaminantes prejudiciais à técnica de amplificação *in vitro* apresentaram razão 260/280 (entre 1.8 e 2.1) e razão 230/260 (entre 1.6 -2.1).

A qualidade do RNA total foi avaliada pela integridade dos RNAs ribossomais 28S e 18S, após o fracionamento eletroforético de 1,0 µg de RNA total, sob condições desnaturantes, em gel de agarose 1,0% (p/v) corado com brometo de etídio (0,15 µg/mL). Apenas aquelas amostras que apresentaram uma proporção dos transcritos ribossomais 28S/18S maior que um (BITTNER et al. 2003) foram utilizadas neste estudo, Figura 5.

4.4 AMPLIFICAÇÃO DO RNA MENSAGEIRO E REFERÊNCIA

A técnica de amplificação linear foi baseada na amplificação do RNA poly A⁺ pela T7-RNA polimerase, descrito por GOMES et al. (2003). Sucintamente, esta técnica permite que o sítio de ligação da T7-RNA polimerase seja incorporado à porção 5' dos *ds*-cDNAs por iniciadores oligo-dTs durante a reação de transcrição reversa (Figura 6). Estes iniciadores contêm 15 a 24 timinas em sua extremidade 3', e cerca de 39 nucleotídeos relativos ao promotor bacteriano do fago T7 em sua porção 5' (VAN GELDER et al. 1990; PHILLIPS et al. 1996).

Esta técnica foi modificada empregando-se o *primer* oligo dT(24)-T7 [5' GGC CAG TGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGG CGG T (24) 3'] (BAUGH et al. 2001) na reação de transcrição ao invés do *primer* oligo dT(15)-T7 [5' AAA CGA CGG CCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGC T (15) 3'] usualmente utilizado nos trabalhos de WANG et al. (2000); GOMES et al. (2003). Esta alteração proporcionou um rendimento de 1.000 - 2.000 vezes em apenas um ciclo de amplificação, o que outrora era conseguido com somente dois ciclos.

No entanto, para amplificar o RNA referência empregamos o oligo dT(15)-T7, com conseqüente utilização de dois ciclos de amplificação (WANG et al. 2000; GOMES et al. 2003).

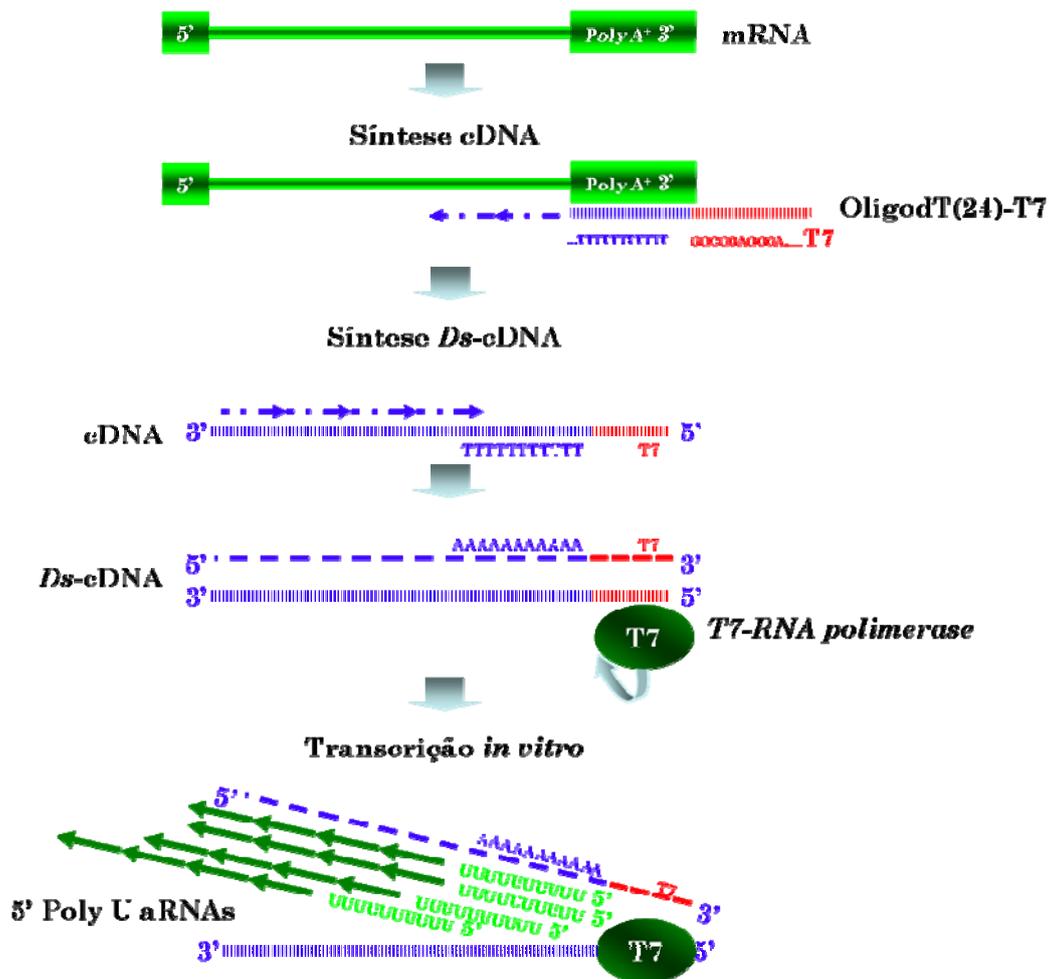


Figura 6 - Esquema da amplificação *in vitro*.

Resumidamente, 100 – 500 ng/ μ L do *primer* oligo dT(24)-T7 (*Integrated DNA technologies*, EUA) foi adicionado a 1,0 - 3,0 μ g de RNA total, a um volume final de 8,1 μ L de reação. O RNA total foi, então, desnaturado a 70°C por 10 minutos. Para aumentar a eficácia de anelamento do oligo dT(24)-T7 à porção 3' do mRNA, diminuimos a temperatura em banho de gelo por 5 minutos. Esta região promotora do fago bacteriano foi incorporada à extremidade 5' dos cDNAs pela reação de transcrição reversa em presença de 1X de *First-Strand Buffer*

(*SuperScript™ II Reverse Transcriptase*, Invitrogen, EUA), 3,0 mMol/L de $MgCl_2$ (*ImProm-II™ Reverse Transcription System*, Promega, EUA), 10,0 mMol/L de *Dithiotreitol* (DTT; *SuperScript™ II Reverse Transcriptase*; Invitrogen), 1,0 mMol/L de mix-dNTPs (Eppendorf, EUA), 1,0 U/ μ L de *RNasin* (*RNasin® Plus RNase Inhibitor*, Promega, EUA) e 1,0 μ L de *RTase* (*ImProm-II™ Reverse Transcription System*, Promega, EUA). Para maior eficiência da síntese do cDNA a reação foi incubada a 25°C por 5 minutos; 42°C por 2 horas; seguido de aquecimento a 75°C por 15 minutos para desnaturação das enzimas empregadas.

A segunda fita do cDNA foi sintetizada em presença de 1X de *Second-Strand Buffer* (Invitrogen, EUA); 0,2 mMol/L de mix-dNTPs (Eppendorf, EUA); 0,012U/ μ L de *RNase H* (Invitrogen, EUA); 0,10 U/ μ L de *E. coli* DNA ligase (Invitrogen, EUA); e 0,30 U/ μ L de *DNA Polymerase I* (Invitrogen, EUA). A reação de síntese do *ds*-cDNA foi efetuada por 2 horas a 16°C. Após este tempo, adicionamos 0,10 U/ μ L de *T4-DNA Polymerase* (Invitrogen, EUA), seguido de incubação a 16°C por 10 minutos. Após a síntese dos *ds*-cDNAs, tanto o RNA ribossômico quanto as enzimas foram degradados em solução alcalina (EDTA a 0,0714 Mol/L e NaOH a 0,29 Mol/L) sob aquecimento a 75°C por 20 minutos. Para ajuste do pH do produto anterior, adicionamos 0,22 Mol/L de HCl. Em seguida, adicionamos 100,0 μ L de água DEPC e 500 η g de acrilamida linear (Ambion, EUA). A esta mistura foi adicionado 190,0 μ L da combinação de fenol: clorofórmio: álcool-isoamílico (25:24:1), com conseguinte inversão por 20 segundos e, centrifugação a 14.000RPM (*Eppendorf centrifuge 5417C*) a 25°C por 5 minutos. A fase aquosa foi, então, repurificada por adição de 190,0 μ L da

mistura clorofórmio: álcool-isoamílico (24:1), sob as mesmas condições da extração orgânica anterior. A seguir, precipitamos a fase aquosa, por uma hora e meia a -20°C , em etanol 70% (v/v) em presença de $1,0 \text{ Mol}/\mu\text{L}$ de acetato de amônio e 500 ng de acrilamida linear. Após a precipitação, o precipitado foi lavado em etanol 75% (v/v) por no mínimo três vezes. Uma vez lavado e devidamente seco, estes *ds*-cDNAs foram solubilizados em $10,0 \mu\text{L}$ de água tratada com DEPC pH 7.0, para posterior amplificação *in vitro*, utilizando-se o kit *RiboMAX™ Large Scale RNA Production System—T7* (Promega, EUA). Resumidamente, a estes $10,0 \mu\text{L}$ de *ds*-cDNAs foram adicionados: 1X de tampão Ribomax; $7,5 \text{ mMol/L}$ de mix de rNTP's; e $2,5 \mu\text{L}$ do *enzyme mix-T7-RNA polymerase*. Esta reação foi, então, incubada a 37°C por 5 horas.

O material amplificado (5' Poly (U) aRNA) foi purificado pelo método do TRizol[®] (*Invitrogen™ Life Technologies*, EUA), removendo-se ambos os ribonucleotídeos livres e *ds*-cDNAs templates. A concentração dos 5' Poly (U) aRNAs foi determinada por leitura das absorvâncias a 230nm, 260nm e 280nm em espectrofotômetro (GeneQuant, Clamart Cedex, France).

Os perfis gerados foram monitorados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% (p/v) corado com de brometo de etídio ($0,15 \mu\text{g/mL}$) (Figura 5).

O tamanho do perfil quando se emprega um ciclo de amplificação foi de 2000 a 400 nts (nucleotídeos), e de 1200 a 400 nts para dois ciclos de acordo com o demonstrado por BITTNER et al. 2003; GOMES et al. 2003.

4.5 CONSTRUÇÃO DA LÂMINA DE *cDNA MICROARRAY*

Utilizamos *cDNA microarrays* confeccionados no Laboratório de Genômica Funcional do ILPC/SP, contendo 144 elementos vazios, 48 cDNAs controles e 4.608 diferentes seqüências de cDNAs (ORESTES) provenientes do banco de clones do Projeto Genoma Humano do Câncer FAPESP/ILPC. A elaboração dos *probes* e *espotagem* dos mesmos em lâminas de vidro silanizadas foi padronizada e otimizada a partir dos protocolos descritos por CHANDRASEKHARAPPA et al. 2003 e CHILDS et al. 2003.

As seqüências ORESTES (SOUZA et al. 2000; CAMARGO et al. 2001; BRENTANI H et al. 2003) utilizadas na lâmina ILPC - 4.8K 02 foram selecionadas segundo os critérios descritos por BRENTANI et al. (2005):

- As seqüências correspondem a genes de seqüências completas e conhecidas;
- As seqüências não apresentam identidade maior que 85% quando comparada com quaisquer fragmentos de 100 pares de bases do genoma humano;
- As seqüências só produzem um único alinhamento no genoma humano;
- As seqüências correspondem à extremidade mais 3' do gene, mas sempre 5' ao primeiro sítio de poli-adenilação;
- As seqüências são maiores que 300 pares de bases.

Os cDNAs de controle interno empregados em nosso estudo são seqüências dos genes *DAP* (*DapF diaminopimelate epimerase*), *THR* (*trnB-Thr tRNA*), *TRP* (*trnD-Trp tRNA*), *PHE* (*trnD-Phe tRNA*) e *LYS* (*trnY-Lys tRNA*) da

bactéria *Bacillus subtilis*, e que foram utilizados como controle de qualidade e reprodutibilidade da reação de transcrição reversa, durante a marcação de nossas amostras (GOMES et al. 2003).

4.6 MARCAÇÃO DO RNA AMPLIFICADO

Para a marcação indireta tanto dos 5' poly (U) aRNAs em estudo quanto do 5' poly (U) aRNA referência, foi empregado o protocolo descrito por COX e SINGER em 2004.

Resumidamente, a 6,0 µg de 5'poly (U) aRNAs foram adicionados 0,375 µg/µL de *Random Primer (dN6; Amersham Pharmacia Biotech, UK)*; 2,0 µL de mix-RNA controle, totalizando 15,4 µL de reação que foi aquecido a 70°C por 10 minutos, e resfriado em banho de gelo por 5 minutos. A transcrição reversa e randômica foi realizada em presença de 1,0X de *First-Strand Buffer (ImProm-II™ Reverse Transcription System, Promega, EUA)*; 6,0 mMol/L de MgCl₂; 0,5 mMol/L de dATP; dCTP e dGTP; 0,2 mMol/L de dTTP (Clontech, EUA) e 0,3 mMol/L de *5-3-aminoallyl-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate aa-dUTP* (Sigma, EUA); 1,0 U/µL de *RNasin(RNasin® Plus RNase Inhibitor, Promega, EUA)* e 2,0 µL de *RTase (ImProm-II™ Reverse Transcription System, Promega, EUA)*. A mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos e 42°C por 2 horas; e os 5' Poly (U) aRNAs foram degradados em solução alcalina (EDTA a 0,0833 Mol/L e NaOH a 0,333 Mol/L) sob aquecimento a 75°C por 20 minutos. Para ajuste do pH do produto anterior, adicionamos 0,25 Mol/L de HCl. A seguir, precipitamos esta mistura em 80% (v/v) de isopropanol acrescido de 0,70 Mol/µL de acetato de

amônio, 200 η g de acrilamida linear e 40 μ g de glicogênio (*Roche Diagnostics GmbH*), por 10 minutos à temperatura ambiente.

Esta metodologia possibilitou a incorporação enzimática da molécula aa-dUTP à molécula de cDNA, que após precipitação e lavagens em etanol a 75% (v/v), foi então solubilizada em solução de bicarbonato de sódio a 0,065 Mol/L pH 9.0 e fracionada em duas distintas reações de acoplamento relativas à incorporação química das moléculas fluorescentes amino-reativas: os ésteres succinidimil alexa-flúor 555 e 647 (Molecular Probes – Invitrogen[®]) (COX e SINGER 2004).

Após a incorporação dos ésteres, purificamos os cDNAs marcados em coluna *QIAquick PCR Purification* (Qiagen, EUA). Após a sua purificação, ambas as populações de cDNA marcado (amostra e referência) foram reunidas em um único tubo, ao qual adicionamos 2,0 μ g de DNA poly (A) (Amersham Biosciences, EUA) e 2,0 μ g de *Human Cot-1 DNA*[®] (Invitrogen, EUA). A seguir, reduzimos esta solução em *Savant Speed Vac Concentrator* (Savant, EUA) à qual adicionamos 0,015 Mol/L de Citrato de sódio (*Tri – Sodium citrate dehydrate*, Merk); 0,15 Mol/L de cloreto de sódio; 0,10% (p/v) de SDS (*Dodecyl Sulfate Sodium Salt*, Merk); 0,10% p/v de Ficoll (*Ficoll 400*); 0,10% p/v de BSA (*bovine serum albumin*) e 0,10% p/v de Polivinilpirolidona; 40% (v/v) de formamida e 10,0 μ g de esperma de salmão. Mantivemos esta solução sob agitação a 500RPM (*Thermomixer eppendorf*) a 45°C até o seu uso.

4.7 HIBRIDIZAÇÃO

As etapas de pré-hibridização, hibridização e lavagem das lâminas foram realizadas conforme descrito por GOMES et al. em 2003. Todas as amostras foram hibridizadas em duplicatas, com inversão dos corantes entre a amostra e o RNA referência.

Resumidamente, as lâminas de *cDNA microarrays* foram pré-hibridizadas em 23,0 mL de solução contendo 0,075 Mol/L de Citrato de sódio; 0,75 Mol/L de cloreto de sódio; 1,0% (p/v) de BSA solução de Denhardts a 5X - 0,10% (p/v) de Ficol; 0,10% (p/v) de BSA e 0,10% (p/v) de Polivinil pirolidona; e 0,10% (p/v) de SDS, por pelo menos 12 horas a 42°C. Após a pré-hibridização, as lâminas foram lavadas em água MilliQ pH 7.0 a 42°C por alguns segundos, e centrifugadas a 1.500g por 2 minutos para secagem. Para enfim, serem montadas na estação de hibridização (*Genomic Solutions*, EUA).

Os cDNAs marcados em 100,0 µL de tampão de hibridização foram aquecidos a 95°C por 5 minutos e mantidos a 70°C até sua aplicação sobre a lâmina.

A reação de hibridização ocorreu sob as seguintes condições desnaturantes: 70°C por 5 minutos; 55°C por 45 minutos e a 42°C por pelo menos 20 horas.

Uma vez hibridizadas, as lâminas foram submetidas às seguintes lavagens: uma vez em solução a 0,03 Mol/L de Citrato de sódio e 0,30 Mol/L de cloreto de sódio pH 7.0 (filtrado e pré-aquecido a 42°C) por 10 minutos à temperatura ambiente; duas vezes em solução a 1,50 mMol/L de Citrato de sódio; 15,0

mMol/L de cloreto de sódio e 0,10% (p/v) de SDS pH 7.0 (filtrado e pré-aquecido a 42°C) por 10 minutos à temperatura ambiente; e finalmente, duas vezes em solução a 1,50 mMol/L de Citrato de sódio e 15,0 mMol/L de cloreto de sódio e pH 7.0 (filtrado e pré-aquecido a 42°C) por 10 minutos à temperatura ambiente. Enfim lavadas, seguimos para centrifugação a 1.500g por 2 minutos para secagem.

Já devidamente lavadas e secadas, realizamos o processo de digitalização das lâminas e capturação das imagens.

4.8 DIGITALIZAÇÃO DAS IMAGENS E QUANTIFICAÇÃO

Os sinais gerados foram capturados por *scanner* confocal a *laser* (*ScanArrayTM Express Microarray Acquisition System – Packard BioScience Biochip Technologies*, EUA), usando-se uma resolução de 10 microns e sensibilidade de captação PMT de 60% para ambos os canais. Cada hibridização produziu um par de imagens 16-bit TIFF (*Tagged Information File Format*).

A quantificação das intensidades dos elementos e *background* médio local de todas as lâminas foram feitas aplicando-se o método Histograma do *software ScanArrayTM Express – Packard BioScience Biochip Technologies*, conforme sugerido por GOMES et al. em 2003. Os valores de intensidade R e G referem-se à incorporação dos corantes alexa-647 (*RED*) e alexa-555 (*GREEN*).

4.9 NORMALIZAÇÃO DOS DADOS

A fim de se ajustar variações sistemáticas lineares e não-lineares, ambas do tipo intensidade-dependentes, principalmente para elementos de baixa intensidade, empregamos o método de regressão linear localmente ponderada com *span* 4 e grau 1, LOWESS – *Locally Weighted Scatter-plot Smoothing* (Cleveland 1974, citado por QUACKENBUSH 2001 p. 419).

Uma vez normalizados, o conjunto de dados foi filtrado, excluindo-se elementos vazios, cDNAs controles e elementos cuja intensidade de sinal for igual ou menor que o *background* médio local.

Seguindo a abordagem de comparação indireta, empregamos um RNA referência comum composto por um *pool* de RNA total de linhagens de melanoma humano (SKMEL-05, SKMEL-17, SKMEL-28, SKMEL-37 e SKMEL-188). Desta forma, para cada gene foi determinada a razão de expressão, em \log_2 , entre as intensidades da AMOSTRA e da amostra REFERÊNCIA (YANG e SPEED 2002; CHURCHILL 2002; QUACKENBUSH 2002).

Os dados de expressão (R e G) de uma única lâmina são usualmente dispostos em um gráfico *MA-plot*, onde M representa a diferença entre a intensidade R e G, em \log_2 , ($M = \log_2 R/G$). E A (intensidade total) a média entre as intensidades R e G, também em \log_2 , ($A = \frac{1}{2} \log_2 RG$). Este tipo de disposição dos dados é de suma importância no propósito que a normalização representa, pois através da curvatura da nuvem de pontos no *MA-plot*, fica evidente, por exemplo, as variações sistemáticas intensidade-dependentes, principalmente para elementos de baixa intensidade (YANG et al. 2002; DUDOIT et al. 2002).

Para avaliar variações sistemáticas e espaciais relativas às diferenças no comprimento ou abertura das agulhas, e ainda à deformação depois de longas horas de *spotagem* (YANG et al. 2001, 2002) construímos gráficos do tipo *box-plot* apresentando a distribuição das medianas da razão de intensidade (M) para cada um dos 48 *subarrays* de nossa lâmina ILPC - 4.8K 02.

4.10 ANÁLISE DOS DADOS

Todas as tabelas geradas após a quantificação dos dados foram submetidas ao Laboratório de Biologia Computacional do Hospital A. C. Camargo para análises de qualidade. Para cada amostra foi possível obter informações sobre as correlações entre as réplicas.

As análises matemáticas e estatísticas foram realizadas pelo grupo do Dr. Eduardo Jordão, IME-USP. Resumidamente, foi empregada uma linguagem computacional e gráfica R (IHAKA e GENTLEMAN 1996) do *Contributed R Archive Network* (CRAN, <http://cran.r-project.org>) que promove análises estatísticas e gráficas, incluindo modelos lineares e não-lineares, *clusters*, predições, análises *resampling survival* e *time-series*. Além disso, aplicamos ferramentas do projeto bioconductor (<http://www.bioconductor.org>) que permite análise de dados de genômica e de expressão gênica (QUACKENBUSH 2001; DUDOIT et al. 2003; BALL et al. 2003).

4.10.1 Genes diferencialmente expressos

Para se determinar a significância da diferença de expressão entre os melanomas primários e metastáticos aplicamos o teste não-paramétrico de *Wilcoxon* para todos os genes do conjunto de dados.

4.10.2 Determinação de Módulos Funcionais

A metodologia de identificação de módulos funcionais foi empregada na análise do perfil de expressão gênica de melanomas primários e metastáticos. Esta metodologia foi descrita por SEGAL et al. (2003, 2004) e consistia, para um determinado conjunto de dados de *microarray*, na identificação de grupos de genes relacionados a processos biológicos, denominados **módulos funcionais**. Esta abordagem foi empregada com sucesso pelo nosso grupo no estudo do perfil de expressão gênica em amostras de esôfago normal, com metaplasia intestinal e com adenocarcinoma (GOMES et al. 2005).

Dos 4.608 genes representados na lâmina ILPC - 4.8K 02, 1.418 foram agrupados segundo os bancos de dados públicos *GeneDecks Assorted Gene Sets* (<http://www.genecards.org/>) e *Gene Ontology* (<http://www.godatabase.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>). Deste modo, identificamos ao total 124 módulos funcionais – 44 grupos gênicos relativos à anotação do *GeneDeck* e 80 do *Gene Ontology*. Após realizarmos a interface entre estes grupos gênicos e a plataforma da lâmina ILPC - 4.8K 02, conseguimos uma representatividade que variou de 1 a 386 cDNAs ORESTES, conforme indicado entre parênteses no Quadro 1.

Agrupamos, ainda, em um módulo funcional denominado “assinatura metastática” no qual representamos 55 genes cuja expressão gênica estava associada ao potencial metastático de melanomas cutâneos.

Quadro 1 – Módulos funcionais identificados na lâmina ILPC - 4.8K 02.

| Módulos GeneDeck | Módulos GO | Módulos GO |
|---|--|--|
| Gap Junction (23) | Activation of MAPK activity GO0000187 (2) | Integrin binding GO0005178 (3) |
| Antigen processing and presentation (12) | Angiogenesis GO0001525 (6) | Homophilic cell adhesion GO0007156 (2) |
| Prion Disease (2) | Anti-apoptosis GO0006916 (12) | Nervous system development GO0007399 (59) |
| Glutathione metabolism (8) | Apoptosis GO0006915 (72) | Cell adhesion GO0007155 (44) |
| ECM-receptor interaction (26) | Calcium ion binding GO0005509 (23) | Regulation of progression through cell cycle GO0000074 (52) |
| Cytokine-cytokine receptor interaction (48) | Caspase activation via cytochrome c GO0008635 (1) | Cell cycle arrest GO0007050 (7) |
| Natural killer cell cytotoxicity (37) | Caspase activator activity GO0008656 (1) | Intracellular transport GO0046907 (63) |
| Tight Junction (47) | Cell death GO0008219 (72) | Cell cycle GO0007049 (9) |
| Valine; leucine and isoleucine biosynthesis (4) | Cell motility GO0006928 (35) | Cell-cell signaling GO0007267 (60) |
| Toll-Like recep. Signaling pathway (32) | Cytoskeleton GO0005856 (54) | Negative regulation of progression through cell cycle GO0045786 (8) |
| Globoside metabolism (10) | Cytosol GO0005829 (27) | Lipid Binding GO0008289 (13) |
| Adipocytokine signaling pathway (31) | Extracellular matrix (sensu Metazoa) GO0005578 (31) | Transporter activity GO0005215 (50) |
| Cell communication (22) | Extracellular region GO0005576 (69) | Cell proliferation GO0008283 (89) |
| MAPK signaling pathway (79) | Extracellular space GO 0005615 (28) | Nucleocytoplasmic transporter activity GO0005487 (1) |
| Prostaglandin and leukotriene metabolism (12) | G-Protein signaling GO0007187 (17) | Cell differentiation GO0030154 (38) |
| Amyotrophic lateral sclerosis (8) | Growth factor activity GO0008083 (7) | Inflammatory response GO0006954 (10) |
| Wnt pathway (44) | GTP binding GO0005525 (8) | Protein import into nucleus GO0006606 (8) |
| Leukocyte transendothelial migration (43) | Gtpase activity GO0003924 (24) | Regulation of cell growth GO0001558 (4) |
| Cell Adhesion Molecules (35) | Hydrolase activity GO0016787 (115) | Cell cycle checkpoint GO0000075 (9) |
| Neuroactive ligand-receptor (36) | Induction of apoptosis GO0006917 (30) | Desenvolvimento da epiderme GO0008544 (8) |
| Nicotinate and nicotinamide metabolism (22) | Insulin receptor signaling pathway GO0008286 (4) | Glycosphingolipid biosynthesis GO0006688 (2) |

| Módulos GeneDeck | Módulos GO | Módulos GO |
|---|---|--|
| Ganglioside biosynthesis (10) | Insulin-like growth factor binding GO0005520 (1) | Peptidase activity GO0008233 (20) |
| N-Clycan bisosynthesis (20) | Integral to plasma membrane GO0005887 (100) | Development GO0007275 (162) |
| Focal Adhesion (80) | Intracellular signaling cascade GO0007242 (117) | Transport GO0006810 (92) |
| Ca+2 signaling pathway (41) | Mitochondrial outer membrane GO0005741 (3) | Negative regulation of cell proliferation GO0008285 (26) |
| Aminoacyl-trna synthetases (13) | Phosphatidylinositol biosynthesis GO0006661 (1) | Protein binding GO0005515 (386) |
| Basal transcription factors (10) | Protein amino acid dephosphorylation GO0006470 (10) | Calcium-dependent cell-cell adhesion GO0016339 (1) |
| Apoptosis (39) | Protein amino acid phosphorylation GO0006468 (50) | Proteolysis GO0006508 (31) |
| Blood gropu glycolipid biosynthesis- neolactoseries (10) | Protein kinase activity GO0004672 (86) | Integral to membrane GO0016021 (168) |
| Biosynthesis of steroids (5) | Protein serine/threonine kinase activity O0004674 (50) | Intercellular junction GO0005911 (4) |
| Axon guidance (54) | Protein-tyrosine kinase activity GO0004713 (29) | Metalloendopeptidase activity GO0004222 (5) |
| Benzoate degradation (22) | Regulation of apoptosis GO0042981 (48) | Tissue kallikrein activity GO0004293 (2) |
| JAK-STAT signaling pathway (45) | Regulation of cyclin dependent protein kinase activity GO0000079 (6) | Nucleocytoplasmic transport GO0006913 (11) |
| Cell cycle (40) | Regulation of transcription, DNA- dependent GO0006355 (85) | Lipid metabolism GO0006629 (37) |
| Complement and coagulation cascades (17) | Response to hypoxia GO0001666 (2) | Central nervous system development GO0007417 (11) |
| ABC transporters general (7) | Response to stress GO0006950 (102) | Small gtpases GO0007264 (14) |
| Alzheimer's disease (8) | RNA polymerase II transcription factor activity GO0003702 (29) | Transcription factor activity GO0003700 (69) |
| Long term depression (23) | SH3/SH2 adaptor activity GO0005070 (8) | Transforming growth factor beta receptor binding GO0005160 (2) |
| Neurodegenerative disorders (12) | Signal transducer activity GO0004871 (210) | Transforming growth factor beta receptor signaling pathway GO0007179 (4) |
| Regulation of actin cytoskeleton (75) | Signal transduction GO0007165 (299) | UV protection GO0009650 (1) |
| Adherens Junction (32) | | |
| PIP3 signaling system (42) | | |
| Notch signaling pathway (12) | | |
| TTGFBI signaling pathway (26) | | |

Seguindo a metodologia proposta por SEGAL et al. (2003; 2004), para identificar amostras nas quais determinados módulos funcionais estavam significativamente ativos (ou inativos), atribuímos aos genes o estado de ativação ou inativação quando a sua razão de expressão for, respectivamente, duas vezes maior ou menor que a expressão média de todos os genes na amostra. A seguir, atribuímos um p -valor para esta fração de genes ativos (ou inativos) pelo cálculo da distribuição hipergeométrica ao nível de 5%, de forma a identificar ativação ou inativação dos módulos funcionais em cada amostra do conjunto de dados.

Para se buscar módulos ativos ou inativos segundo o grupo de melanoma, se primário ou metastático, empregamos a mesma análise descrita anteriormente, onde calculamos para cada módulo funcional e grupo de melanoma, a fração de amostras que apresentavam determinado módulo funcional freqüentemente ativo ou inativo. Novamente, ao atribuímos um p -valor para esta fração de amostras ativas (ou inativas) pelo cálculo da distribuição hipergeométrica ao nível de 5%, classificamos os módulos como ativos ou inativos segundo o grupo de melanoma.

A seguir, calculamos um escore para aqueles genes cuja razão de expressão contribuía para significantes mudanças no estado do módulo funcional entre os melanomas primários e metastáticos. Primeiramente, identificamos os subgrupos de amostras ativas e inativas, nas quais dado módulo funcional estava, respectivamente, ativo e inativo. Em seguida, calculamos a fração de genes ativos (a_s) e inativos (i_s) na amostra (s) para cada módulo, cujos valores de razão de expressão eram maiores do que duas vezes (ou menores) nas amostras ativas (a) ou inativas (i). A partir da soma de $-\log(a_s)$ e $-\log(i_s)$ para as amostras onde a classificação do gene coincidia com a classificação do grupo, obtivemos os

valores de escore de cada gene. Na avaliação da significância de cada escore, aplicamos um teste de hipóteses a partir de uma aproximação de uma distribuição normal.

4.10.3 Construção e análise de redes de relevância

Construímos redes de relevância para todos os módulos funcionais identificados na lâmina ILPC - 4.8K 02. A idéia original proposta por BUTTE et al. em 2000 foi ligeiramente modificada para a busca por pares de genes com valores de correlação linear significativamente alterado entre determinados grupos amostrais.

Para se identificar estes pares de genes com correlação linear alterada entre os grupos de melanomas, fizemos uma comparação entre pares de genes, dentro de cada módulo funcional, e a seguir, determinamos seus coeficientes de correlação. A partir destes valores, construímos uma rede, por representação gráfica, atribuindo coloração verde para correlação negativa e, vermelha para correlação positiva.

Para comparar as alterações entre os coeficientes de correlação, segundo o grupo de melanoma, aplicamos primeiramente a transformação Z de Fisher, onde a diferença entre os valores de correlação para cada par de genes, nos dois tipos biológicos estudados, foi transformada em uma nova variável Z , que apresenta distribuição normal aproximada. E usamos esta informação para aferir a significância da quebra de correlação entre os grupos de melanomas ao aplicarmos o teste de hipótese para esta variável Z .

4.10.4 Validação dos dados de expressão gênica

Para validação dos dados de expressão baseados na abundância de mRNA, optamos pela metodologia de imuno-histoquímica para comparar os níveis de proteína em amostras de melanomas cutâneo. Para tanto, utilizamos blocos de amostras parafinadas correspondentes às amostras do conjunto de dados de *cDNA microarray*, assim como amostras independentes, disponíveis em um *Tissue microarray (TMA)*. Este *TMA* foi confeccionado no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo, utilizando-se o *tissue microarrayer* (Beecher Instruments®, Silver Spring, EUA), e apresentava 111 amostras em duplicata, assim distribuídos – 72 melanomas primários (> 1,0 mm de espessura) e 29 melanomas metastáticos (13 metástases cutâneas; 8 linfonodais e 8 viscerais), e ainda 10 nevos compostos.

Para as reações de imuno-histoquímica, as lâminas foram previamente tratadas com 3-aminopropiltriethoxi-silano (Sigma, EUA) e deixadas por 24 horas a 60°C. A seguir, foram deparafinizadas em xilol a 60°C por 20 minutos, e então, xilol à temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, as lâminas foram re-hidratadas em passagens sucessivas em etanol 100%, 85% e 70% (v/v) por 30 segundos cada, e por último, água corrente e destilada.

Antes das reações de imuno-histoquímica, os antígenos protéicos foram recuperados por calor e pressão (Eterna®, Nigro), em solução de ácido cítrico a 10,0 mMol/L pH 6,0. A seguir, realizamos o bloqueio da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio a 3,0% (v/v) em quatro incubações de 5 minutos cada, e depois sucessivas lavagens em PBS (Solução salina tamponada com fosfato a 0,10mMol/L pH 7.2) por cinco minutos.

Incubamos as lâminas com o anticorpo primário anti-galectina-3 (Clone 9C4, *LabVision*, EUA) e o policlonal anti-kallicreína-7 (gentilmente cedido por Dra. Lara Termini – LICR/SP e Dr. E.P Diamandis – Mount Sinai Hospital/Canadá) diluídos a títulos pré-estabelecidos em tampão PBS acrescido de albumin sérica bovina a 1,0% (p/v) (Sigma, EUA) e azida sódica a 0,10% (p/v), por 18 horas, a 4°C, em câmara úmida. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em tampão PBS com três incubações de 3 minutos cada. A seguir, iniciamos, então, o acoplamento do anticorpo secundário biotilado (LSAB + AP *Link Universal*) do kit LSAB – *System AP* (DakoCytomation, EUA) diluído 1:200 em tampão PBS, por 30 minutos a 37°C.

Após o acoplamento, as lâminas foram lavadas em tampão PBS em três incubações de 3 minutos cada, para finalmente serem expostas ao complexo (LSAB + AP *Streptavidin-AP*) diluídos (1:200) em tampão PBS, por 30 minutos a 37°C, com posterior lavagens (três vezes) em PBS a cada 3 minutos. A seguir, as lâminas foram, então, reveladas em solução de *Envision + ALP System* (Dako, EUA), durante 5 minutos a 37°C. Uma vez coradas, foram lavadas em água corrente, e contracoradas por 1 minuto.

Para ambos os anticorpos, usamos controles positivos que sabidamente expressavam galectina-3 e kallicreína-7.

Para cada lesão, calculamos a média do escore relativo à marcação citoplasmática de diferentes lesões do *TMA*. Este escore foi, então, obtido pela multiplicação da intensidade (0: negativo; 1: fraca; 2: moderada e 3: intensa) versus a proporção de células marcadas (0: negativo; 1: 1,0-10%; 2: 11-50% e 3: >50%). Todavia, em casos de imunoreatividade nuclear, calculamos a média do

escore somente segundo a proporção de células marcadas (0: negativo; 1: >10%). Ao final, estabelecemos como critério de positividade citoplasmática escore ≥ 4 e, para a marcação nuclear $> 0,1$.

Para analisar estatisticamente as diferenças entre as medianas dos escores médios dos melanomas primários e metastáticos; e avaliar associações e correlações, entre o perfil da marcação e variáveis histopatológicas, aplicamos respectivamente, os testes não paramétricos de *Mann-Whitney*, teste do χ^2 e de correlação de *Spearman*. Consideramos como significativo *p*-valores $\leq 0,05$. Para efetuar tais análises, usamos o pacote estatístico SPSS 13.0 para Windows.

5 RESULTADOS

5.1 AMOSTRAS DE MELANOMAS HUMANOS

De um total de 188 amostras coletadas, descartamos 70% ao longo do processo de validação histopatológica; triagem clínica; validação da qualidade dos transcritos e processo de amplificação. Assim ao final, analisamos o perfil de expressão gênica de 64 amostras - 21 representando melanomas primários e 43 metástases.

Os Quadros 2 e 3 descrevem as amostras analisadas segundo o seu subtipo, assim como algumas características histopatológicas, clínicas e demográficas, tais como a idade, sexo e estadios dos pacientes ao diagnóstico.

A frequência entre homens e mulheres foi de, respectivamente, 51,6% e 48,4%. Em relação ao tipo de pele, cor de olhos e cabelos, poucos pacientes apresentavam pele tipo I e II (30,2%), e ainda, poucos tinham cor e cabelos claros (21,6%). No entanto, a grande maioria era de pele clara (87,3%).

Os subtipos de melanomas primários mais frequentes foram o extensivo superficial (38,1%) e acral lentiginoso (33,3%). Quanto à espessura, os melanomas do tipo T4 foram os mais frequentes (57,1%).

Em relação aos metastáticos, as metástases cutâneas locais ou à distância (51,2%), e linfonodais (34,9%) foram as mais frequentes.

E por último, cerca de 50% das amostras apresentava doença em estadio avançado (nível IV).

Quadro 2 – Características demográficas e clínicas dos melanomas primários.

| IM | Tipo histológico | Sexo | Idade ao diagnóstico | Breslow ^a (mm) | TNM ^b | Estadio clínico ^c | Estadio patológico ^d |
|-----|---------------------------------|-----------|----------------------|------------------------------|------------------|------------------------------|---------------------------------|
| 14 | acral lentiginoso | Feminino | 69,0 | 12,0 | T4bN3M0 | III | IIIC |
| 19 | extensivo superficial | Masculino | 64,5 | 0,8 | T1aN1aM0 | III | IIIA |
| 20 | extensivo superficial | Feminino | 73,2 | 3,1 | T3bN1aM0 | III | IIIB |
| 24 | mucosa | Feminino | 55,3 | P3,0cm | T4xN0M0 | IIB | IIB |
| 38 | extensivo superficial | Masculino | 65,4 | 5,0 | T4aN1aM0 | III | IIIA |
| 49 | acral lentiginoso | Feminino | 85,6 | 14,0 | T4bN3M0 | III | IIIC |
| 51 | acral lentiginoso | Feminino | 58,8 | 4,6 | T4bN0M0 | IIC | IIC |
| 53 | extensivo superficial | Feminino | 46,7 | 0,7 | T1aN0M0 | IA | IA |
| 54 | nodular | Masculino | 58,4 | 5,1 | T4bN0M1a | IV | IV |
| 55 | extensivo superficial | Feminino | 94,1 | 3,5 | T3bN0M0 | IIB | IIB |
| 62 | extensivo superficial polipóide | Masculino | 41,3 | 25,0 | T4bN0M0 | IIC | IIC |
| 64 | acral lentiginoso | Feminino | 76,2 | 3,8 | T3bN0M0 | IIB | IIB |
| 71 | extensivo superficial | Masculino | 46,3 | 1,4 | T2aN0M0 | IB | IB |
| 72 | outro | Feminino | 61,7 | 28,0 | T4aN1aM0 | III | IIIB |
| 91 | acral lentiginoso | Masculino | 80,9 | 3,6 | T3aN0M0 | IIA | IIA |
| 100 | nodular | Masculino | 58,8 | 6,8 | T4aN1aM0 | III | IIIB |
| 103 | acral lentiginoso | Masculino | 50,2 | 6,0 | T4aN1aM0 | III | IIIB |
| 111 | extensivo superficial | Masculino | 67,2 | 2,9 | T3aN0M0 | IIA | IIA |
| 115 | acral lentiginoso | Feminino | 76,4 | 2,3 | T3aN0M0 | IIA | IIA |
| 119 | não-classificável | Masculino | 53,0 | 7,5 | T4bN0M0 | IIC | IIC |
| 887 | não-classificável | Masculino | 76,8 | 5,0 | T4bN3M1b | IV | IV |

a - Índice de Breslow (BRESLOW 1970).

b - Classificação TNM.

c - Estadiamento clínico segundo AJCC-2002 - *American Joint Committee on Cancer 2002* (BALCH et al. 2000, 2001a, 2001b).

d - Estadiamento patológico segundo AJCC-2002 (BALCH et al. 2000, 2001a, 2001b).

Quadro 3 - Características demográficas e clínicas dos melanomas metastáticos.

| IM | Tipo de metástase | Sexo | Idade ao diagnóstico | TNM ^a | Estadio clínico ^b | Estadio patológico ^c |
|-----|----------------------|-----------|----------------------|------------------|------------------------------|---------------------------------|
| 7 | metástase cutânea | feminino | 44,9 | T4bN1bM1c | IV | IV |
| 9 | metástase cutânea | feminino | 44,4 | T2aN2bM1c | IV | IV |
| 30 | metástase cutânea | feminino | 29,6 | T4aN3M1c | IV | IV |
| 33 | metástase linfonodal | feminino | 55,2 | T1aN3M1c | IV | IV |
| 37 | metástase linfonodal | feminino | 51,2 | T4bN3M1a | IV | IV |
| 42 | metástase cutânea | masculino | 36,9 | TxN0M1c | IV | IV |
| 50 | metástase cutânea | masculino | 65,0 | TxN1bM1a | IV | IV |
| 58 | metástase linfonodal | masculino | 55,8 | T3aN3M0 | III | IIIC |
| 59 | metástase cutânea | masculino | 68,9 | T1aN1bM0 | III | IIIB |
| 60 | metástase cutânea | feminino | 58,9 | TxN2cM0 | III | IIIB |
| 61 | metástase linfonodal | masculino | 36,3 | T1aN3M0 | III | IIIC |
| 63 | metástase cutânea | masculino | 71,0 | T4bN0M1c | IV | IV |
| 66 | metástase linfonodal | feminino | 58,0 | T4bN3M1c | IV | IV |
| 68 | metástase linfonodal | feminino | 21,7 | TxN3M0 | III | IIIC |
| 69 | metástase cutânea | masculino | 62,0 | T4bN3M0 | III | IIIC |
| 73 | metástase cutânea | masculino | 35,6 | TxN1bM1a | IV | IV |
| 77 | metástase linfonodal | feminino | 24,8 | T3aN3M0 | III | IIIC |
| 78 | metástase linfonodal | masculino | 48,5 | TxN1bM1c | IV | IV |
| 79 | metástase linfonodal | masculino | 69,0 | TxN3M1a | IV | IV |
| 80 | metástase cutânea | feminino | 74,2 | TxN2cM0 | III | IIIB |
| 81 | metástase linfonodal | masculino | 74,0 | T4bN1bM0 | III | IIIC |
| 82 | metástase visceral | masculino | 52,4 | TxN1bM1c | IV | IV |
| 83 | metástase visceral | masculino | 66,9 | TxNxM1c | IV | IV |
| 93 | metástase cutânea | masculino | 48,1 | T1bN0M1a | IV | IV |
| 95 | metástase cutânea | feminino | 65,5 | T4aN1aM1c | IV | IV |
| 96 | metástase cutânea | feminino | 64,0 | TxN0M1a | IV | IV |
| 98 | metástase cutânea | feminino | 51,2 | TxN3M1a | IV | IV |
| 99 | metástase linfonodal | feminino | 38,9 | TxN3M0 | III | IIIC |
| 101 | metástase cutânea | feminino | 31,3 | TxN0M1a | IV | IV |
| 105 | metástase linfonodal | feminino | 73,3 | T3aN3M0 | III | IIIC |
| 106 | metástase pulmonar | masculino | 43,7 | T4bN0M1c | IV | IV |
| 107 | metástase linfonodal | masculino | 71,0 | TxN3M1c | IV | IV |
| 108 | metástase cutânea | masculino | 35,5 | T2bN0M1c | IV | IV |
| 109 | metástase visceral | feminino | 45,3 | TxN0M1c | IV | IV |
| 110 | metástase cutânea | feminino | 65,5 | T3aN3M1c | IV | IV |
| 112 | metástase linfonodal | masculino | 56,9 | T1aN2bM1c | IV | IV |
| 113 | metástase cutânea | feminino | 55,3 | T4bN0M1c | IV | IV |
| 116 | metástase visceral | masculino | 47,8 | T3aN1aM1c | IV | IV |
| 117 | metástase cutânea | masculino | 55,0 | T4bN3M1a | IV | IV |
| 118 | metástase linfonodal | feminino | 64,1 | T3bN3M0 | III | IIIC |
| 126 | metástase cutânea | masculino | 61,9 | TxN1bM1a | IV | IV |
| 127 | metástase cutânea | masculino | 19,8 | T4xNxM1c | IV | IV |
| 129 | metástase visceral | feminino | 51,3 | T2aN0M1c | IV | IV |

a - Classificação TNM.

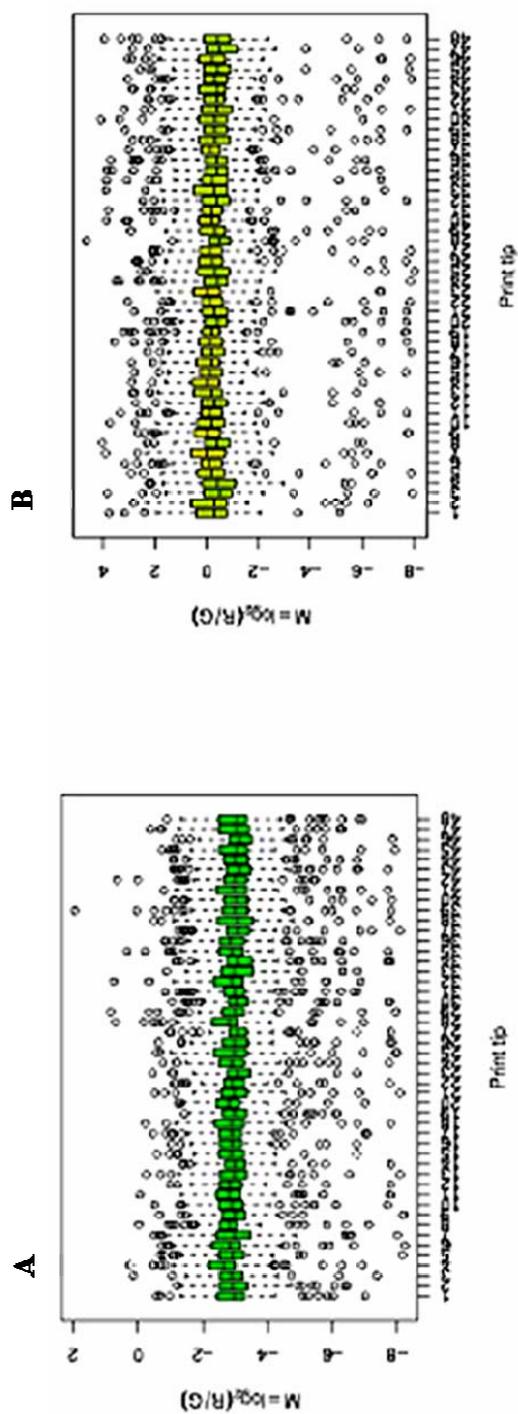
b - Estadiamento clínico segundo AJCC-2002 - *American Joint Committee on Cancer 2002* (BALCH et al. 2000, 2001a, 2001b).

c - Estadiamento patológico segundo AJCC-2002 (BALCH et al. 2000, 2001a, 2001b).

5.2 QUALIDADE DOS DADOS

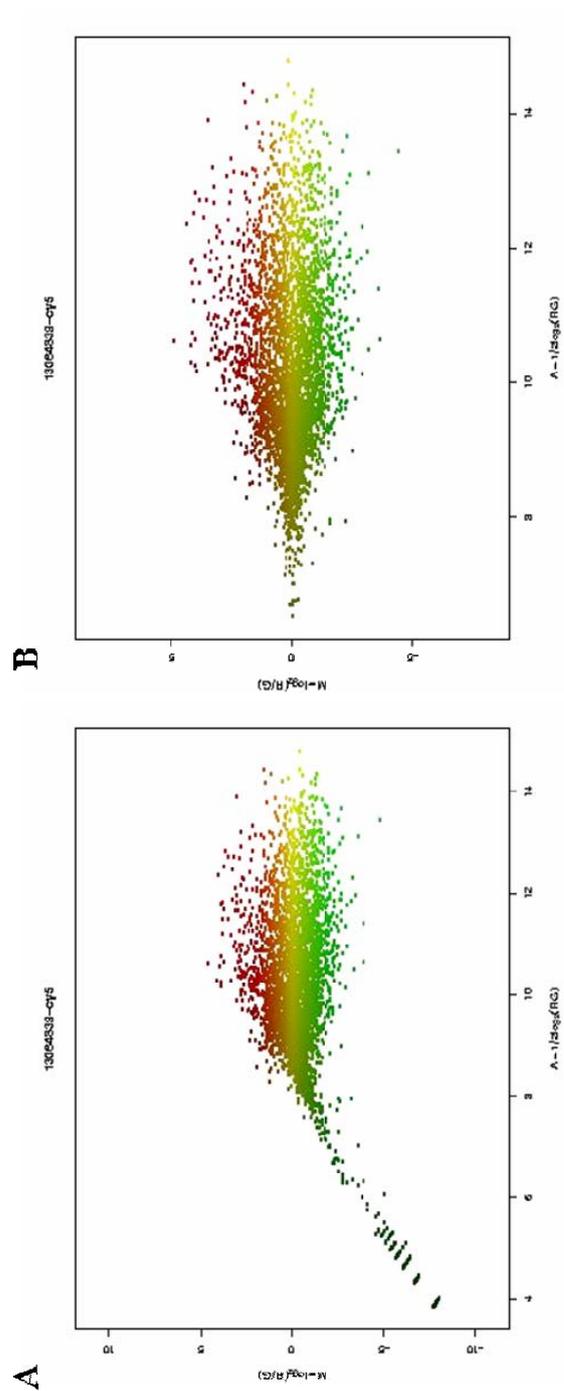
As nossas lâminas não apresentaram variações sistemáticas espaciais, conforme podemos observar na Figura 7. Nestes *box-plots*, vemos que, mesmo antes da normalização, não há uma diferença muito grande entre as medianas das razões de intensidade (R e G) dos 48 *subarrays* que compõem a lâmina ILPC 4.8K 02, para ambos os experimentos controle e réplica.

Após dispor os dados da réplica do experimento controle, com inversão dos corantes, em um gráfico *MA-plot*, notamos um desvio da nuvem de pontos. Embora este desvio não seja *grid*-dependente, já que a curvatura da nuvem não é muito alterada, ele varia de modo intensidade-dependente, principalmente para cDNAs ORESTES de baixa intensidade. Contudo, após a normalização pelo método de LOWESS, este desvio desaparece, conforme podemos observar na Figura 8.



Legenda: (A) e sua réplica (B) com inversão dos corantes antes da normalização, para uma amostra de melanoma primário, experimento controle.

Figura 7 - Gráficos do tipo *box-plot* apresentando as medianas das razões de intensidade (R e G) dos 48 *subarrays* que compõem as lâminas ILPC - 4.8K 02.



Legenda: MA-plot das razões de intensidade (R e G) antes (A) e após (B) a normalização local não-linear LOWESS.

Figura 8 - MA-plot das razões de intensidade (R e G) referente à réplica do experimento controle para um melanoma primário.

Vale ressaltar que para esta representação acima, os pontos em vermelho são aqueles que apresentam razão de intensidade (R e G), em escala logarítmica (\log_2) maior que zero; aqueles em amarelo são os que não são diferenciais com razão de intensidade $M=0$; e por último, os pontos verdes aqueles em que a razão é menor que zero.

Note que a maioria dos cDNAs ORESTES da lâmina ILPC - 4.8K 02, uma vez normalizados, ajusta-se no centro (zero) do *MA-plot*. Isto vem ao encontro da premissa de que são poucos os genes (em vermelho e verde) cuja expressão diferencial entre as duas populações de mRNAs amostra e referência é significativa (YANG et al. 2001; YANG e SPEED 2002).

Após uma pré-análise dos dados gerados detectamos um comportamento não-linear em alguns pontos (em vermelho) que ficavam fora da reta $y = x$ no gráfico *MM-plot* (Figura 9). Esse gráfico deveria mostrar um coeficiente de correlação muito próximo de um. Todavia, após sistemáticas análises, concluímos que este problema devia-se a uma variabilidade da intensidade de sinal do *background* local de ambos os canais (Figura 10).

No entanto, isto não nos preocupou muito, pois após a normalização por LOWESS esta interferência relativa àqueles elementos não-lineares (Figura 9) foi precisamente corrigida, conforme demonstrado na Figura 11. De fato, ao final conseguimos, após a correção por LOWESS, um índice de correlação de *Pearson* em média 0,90.

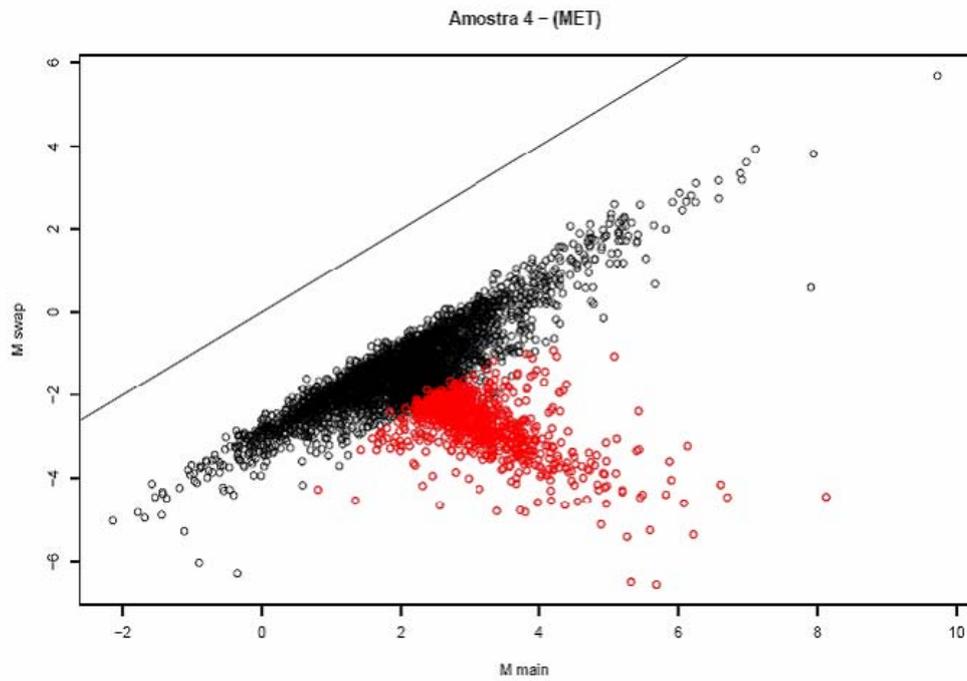


Figura 9 - Gráfico Ms (réplica do experimento controle com inversão dos corantes) versus Mm (experimento controle) de um conjunto de dados não-normalizado referente a um melanoma metastático.

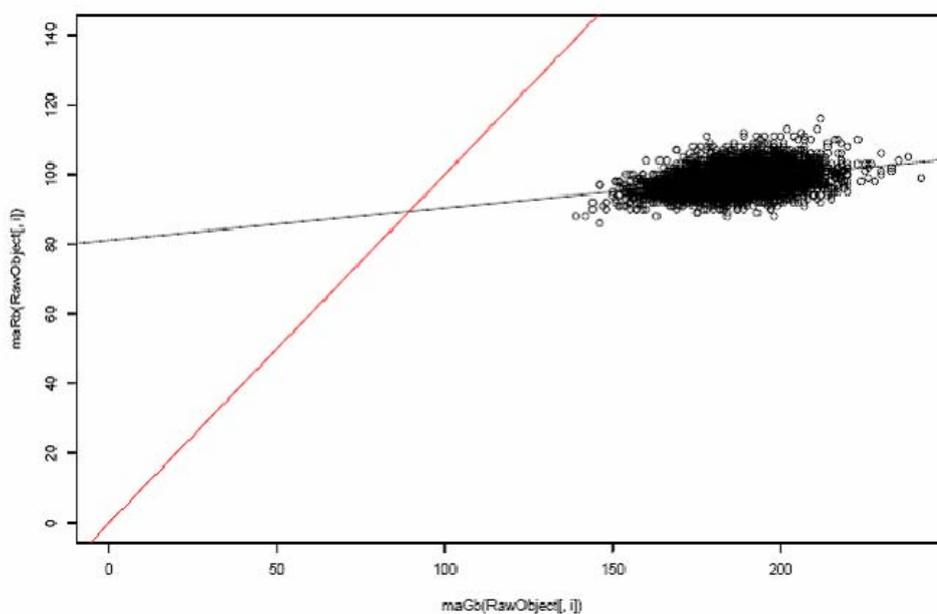


Figura 10 – *Scatter-plot* entre os valores de *background* local (R e G) para a amostra de melanoma metastático IM 04, experimento controle.

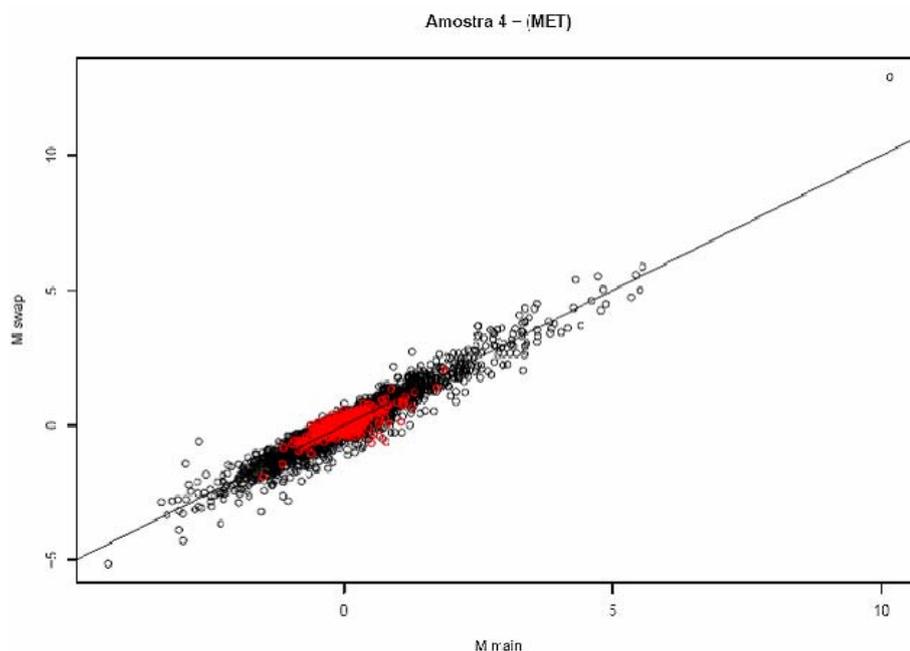


Figura 11 - Gráfico Ms (réplica do experimento controle com inversão dos corantes) versus Mm (experimento controle) para um melanoma metastático após a normalização dos dados pelo método de LOWESS.

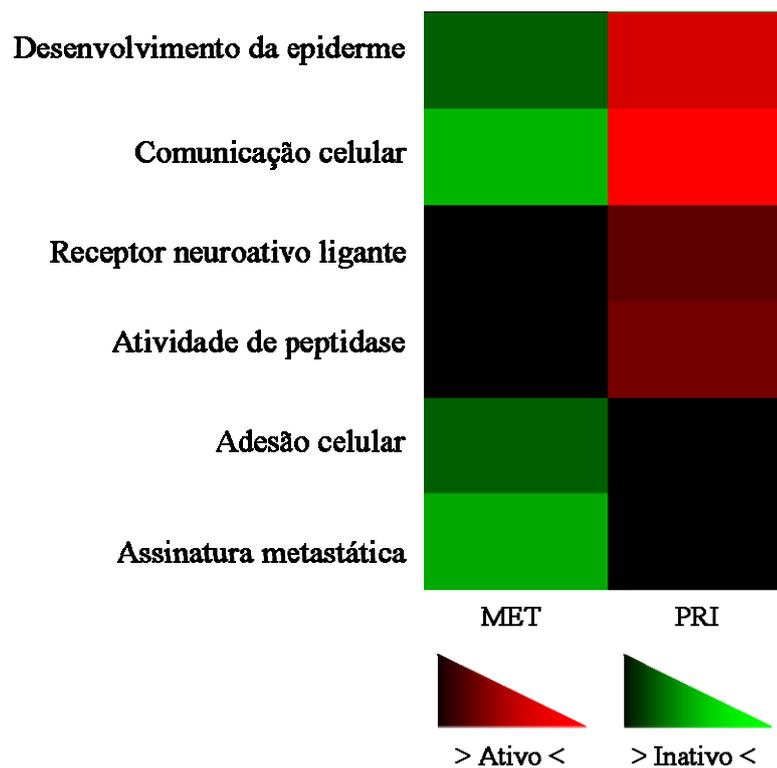
5.3 ANÁLISES DOS DADOS

5.3.1 Módulos funcionais

Somente alguns módulos funcionais apresentaram mudança de estado com significância estatística, segundo o grupo de melanoma, se primário ou metastático. Dentre estes temos: desenvolvimento da epiderme; atividade de peptidase; comunicação celular; adesão celular; receptor neuroativo ligante e assinatura metastática (Figura 12).

A seguir, geramos um escore para os genes cujas alterações de expressão mostraram significância estatística (ativos ou inativos) conforme o estado do módulo funcional. Quando analisamos as funções destes genes vemos que a maioria deles associa-se à adesão celular, e ainda, modula sinais via interação célula-célula e célula-matriz (Quadro 1).

Para avaliar melhor o comportamento destes genes construímos *box-plots* gerados com base em sua intensidade de expressão dos níveis de mRNA em relação à amostra referência, dada em \log_2 , segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow. A seguir, aplicamos o teste não-paramétrico de *Wilcoxon*, no qual avaliamos as diferenças entre as medianas destas intensidades de expressão em relação ao grupo de melanoma – se primário ou metastático; e ainda, ao índice de Breslow - melanomas $\leq 1,0$ mm e $> 1,0$ mm (Figuras 13 a 30).



Legenda: Módulos funcionais (linhas) que apresentaram alteração significativa ($p \leq 0,05$) segundo o grupo de melanoma (colunas). A cor vermelha denota ativação do módulo enquanto a cor verde, inativação.

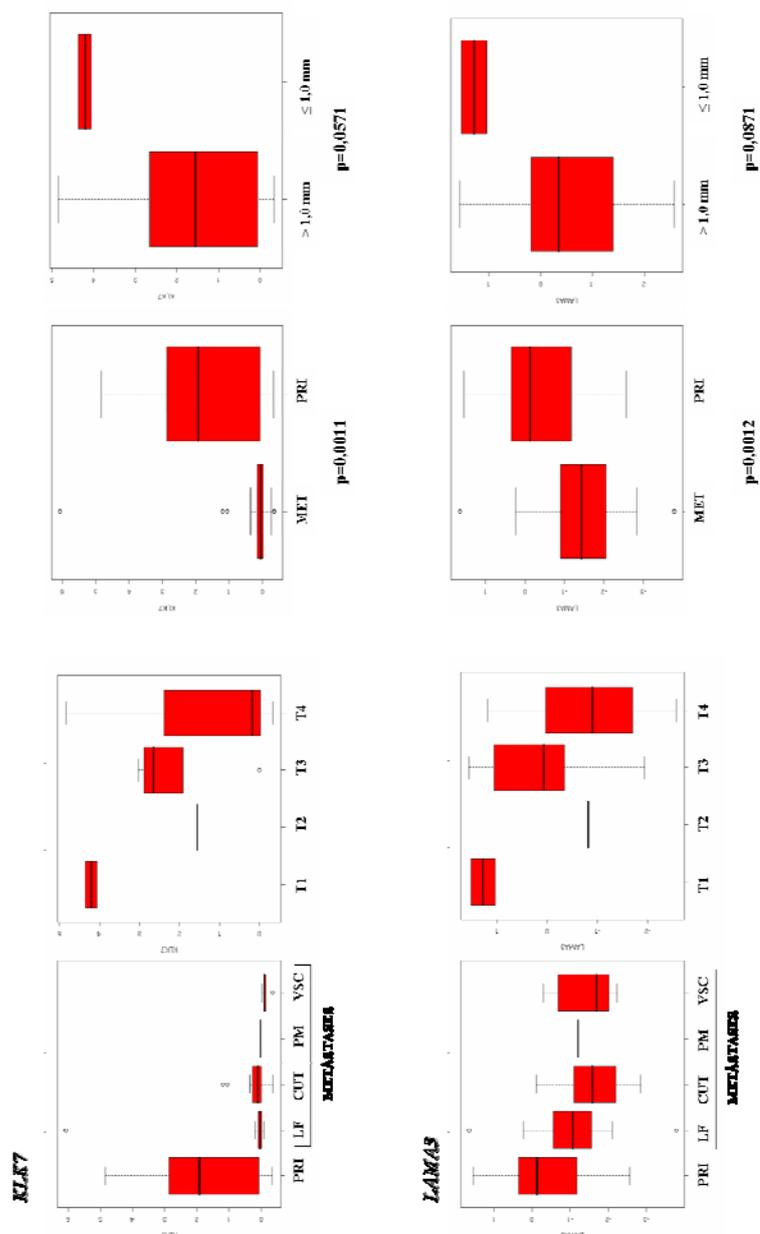
Figura 12 – Variação no estado de ativação dos módulos funcionais entre melanomas primários e metastáticos.

Tabela 1 - Função dos genes que contribuíram significativamente para a classificação dos módulos funcionais ($p \leq 0,05$).

| Gene | Nome | Função | Escore | p-valor |
|------------------------------------|--|--|--------|---------|
| Desenvolvimento da epiderme | | | | |
| <i>LAMA3</i> | <i>Laminin, alpha 3</i> | Subunidade alfa-3 da laminina-5 que compõe a matriz da lâmina basal. Promove adesão celular focal via ligação à integrina $\alpha 6\beta 4$ | 16,0 | 0,000 |
| <i>KLK7</i> | <i>Kallikrein-7 precursor</i> | Atividade de proteinase, catalisando degradação de junções coesivas intercelulares entre os queratinócitos - corneodesmosomas. Participa do processo de diferenciação e estratificação dos queratinócitos epidermais | 12,0 | 0,027 |
| <i>EMPI1</i> | <i>Epithelial membrane protein 1</i> | Proteína de membrana associada ao tumor | 12,0 | 0,027 |
| <i>CTGF</i> | <i>Connective tissue growth factor</i> | Promove proliferação e diferenciação de condrócitos. Promove adesão celular | 11,7 | 0,035 |
| Comunicação celular | | | | |
| <i>COL3A1</i> | <i>Collagen, type III, alpha 1</i> | Subunidade alfa-1 do colágeno fibrilar III presente na matriz extracelular de tecidos conectivos. Promove adesão celular via ligação à integrinas ($\alpha 1\beta 1$; $\alpha 2\beta 1$; $\alpha 3\beta 1$) | 30,9 | 0,000 |
| <i>DSC3</i> | <i>Desmocollin 3</i> | Componente da junção intercelular desmossoma. Promove adesão celular | 26,0 | 0,000 |
| <i>COL17A1</i> | <i>Collagen, type XVII, alpha 1</i> | Subunidade alfa-1 do colágeno XVII presente na matriz extracelular de tecidos conectivos | 23,2 | 0,001 |
| <i>VWF</i> | <i>Von Willebrand factor</i> | Promove adesão celular via ligação às integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 2b\beta 3$ | 23,0 | 0,001 |
| <i>THBS1</i> | <i>Thrombospondin 1</i> | Adesão celular. Pode se ligar a fibrinogênio, fibronectina, laminina, colágeno tipo V e integrinas $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ e $\alpha 2b\beta 3$ | 22,9 | 0,001 |
| <i>LAMA3</i> | <i>Laminin, alpha 3</i> | Subunidade alfa-3 da laminina-5 que compõe a matriz da lâmina basal. Promove adesão celular focal via ligação à integrina $\alpha 6\beta 4$ | 21,4 | 0,003 |
| <i>COL4A1</i> | <i>Collagen, type IV, alpha 1</i> | Subunidade alfa-1 do colágeno IV que compõe a matriz da lâmina basal. Promove adesão celular via ligação à integrinas ($\alpha 1\beta 1$; $\alpha 2\beta 1$; $\alpha 3\beta 1$) | 19,1 | 0,018 |
| Receptor neuroativo ligante | | | | |
| <i>GRIN2B</i> | <i>Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B</i> | Receptor do glutamate | 9,1 | 0,000 |
| <i>NMU</i> | <i>Neuromedin U</i> | Estimula contração muscular do trato gastrointestinal | 8,9 | 0,000 |
| <i>GPR35</i> | <i>G protein-coupled receptor 35</i> | Receptor-proteína G 35 | 8,9 | 0,000 |
| <i>P2RX1</i> | <i>Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1</i> | Purinoreceptor medeia transmissão sináptica neuronal | 6,9 | 0,001 |
| Atividade de peptidase | | | | |
| <i>KLK6</i> | <i>Kallikrein-6 precursor</i> | Atividade de proteinase, catalisando degradação de junções coesivas intercelulares | 69,4 | 0,000 |
| <i>KLK13</i> | <i>Kallikrein-13 precursor</i> | Atividade de proteinase, catalisando degradação de junções coesivas intercelulares | 69,4 | 0,000 |

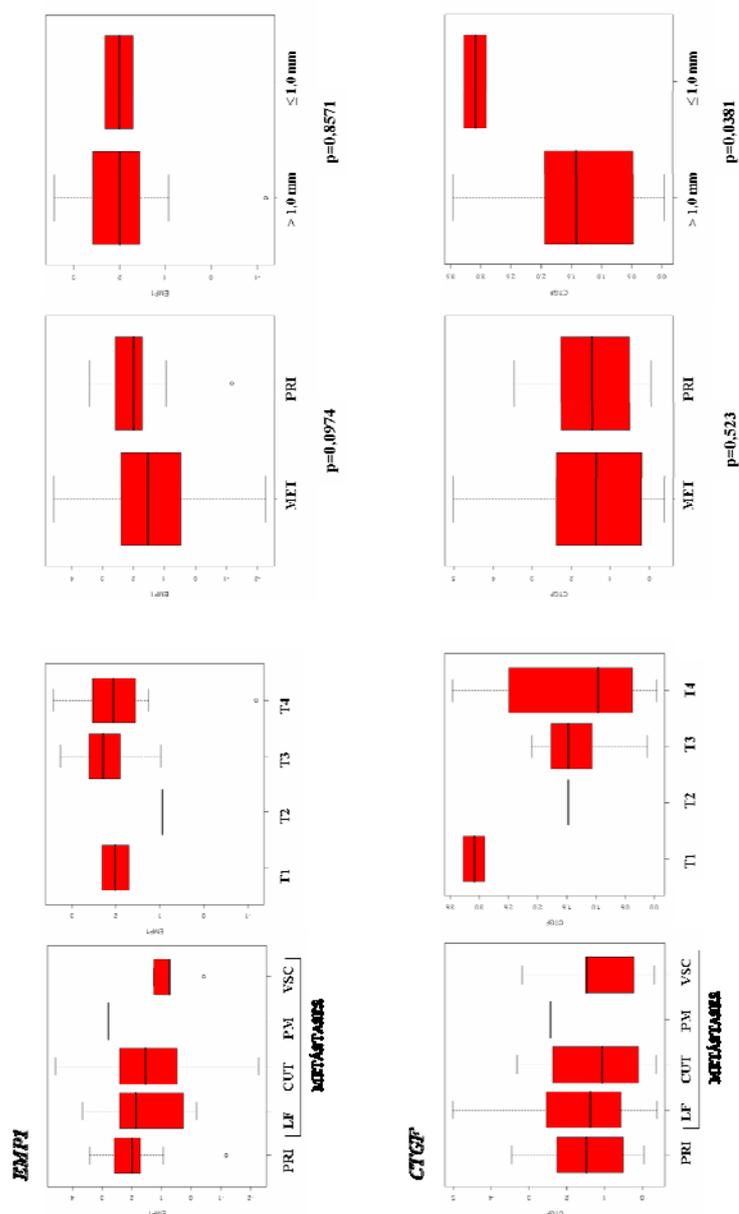
| Gene | Nome | Função | Escore | p-valor |
|-------------------------------|---|---|--------|---------|
| <i>DPP4</i> | <i>Dipeptidylpeptidase 4</i> | Metabolismo protéico | 69,4 | 0,000 |
| <i>C1R</i> | <i>Complement component 1, r subcomponent</i> | Proteinase membro da família S1 | 56,7 | 0,007 |
| Adesão celular | | | | |
| <i>VWF</i> | <i>Von Willebrand factor</i> | Promove adesão celular via ligação às integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 2b\beta 3$ | 19,2 | 0,000 |
| <i>GPR56</i> | <i>G protein-coupled receptor 56</i> | Promove supressão da proliferação tumoral via ligação à transglutaminase (TG)2 | 19,1 | 0,000 |
| <i>POSTN</i> | <i>Periostin precursor</i> | Promove adesão celular via interação às integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$ | 18,6 | 0,000 |
| <i>CIQR1</i> | <i>Complement component 1, q subcomponent, receptor 1</i> | Receptor de c1q, MBL2 (mannose-binding lectin) e SPA (pulmonary surfactant protein A). Promove adesão celular | 16,7 | 0,000 |
| <i>DSC3</i> | <i>Desmocollin 3</i> | Componente da junção intercelular desmossoma. Promove adesão célula-célula | 16,5 | 0,000 |
| <i>CCR1</i> | <i>Chemokine (C-C motif) receptor 1</i> | Receptor $\beta 1$ de citocina. Liga-se a MIP-1- α , MIP-1-delta, RANTES, e MCP-3 | 15,0 | 0,000 |
| <i>FBLN5</i> | <i>Fibulin 5</i> | Promove adesão de células endoteliais ao se ligar a integrinas e motivos RGD. Pode ser um ligante vascular para integrinas com conseqüente desenvolvimento vascular e remodelamento | 12,4 | 0,003 |
| <i>FXYS5</i> | <i>FXYS domain-containing ion transport regulator 5</i> | Envolvido na supressão de E-caderina que resulta em redução da adesão celular. Promove metástase | 11,2 | 0,010 |
| Assinatura metastática | | | | |
| <i>LUM</i> | <i>Lumican precursor</i> | Componente de matriz extracelular, responsável pelo rearranjo de proteoglicanos | 37,7 | 0,000 |
| <i>CYR61</i> | <i>Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61</i> | Promove proliferação celular, quimiotaxia, angiogênese e adesão celular | 36,4 | 0,000 |
| <i>PLAU</i> | <i>Plasminogen activator, urokinase</i> | Ativador de plasminogênio | 34,0 | 0,000 |
| <i>CTGF</i> | <i>Connective tissue growth factor</i> | Promove proliferação e diferenciação de condrócitos. Mede a adesão celular | 31,3 | 0,000 |
| <i>SI00P</i> | <i>SI00 calcium binding protein P</i> | Ligante de cálcio | 29,1 | 0,000 |
| <i>FBN1</i> | <i>Fibrillin 1 (Marfan syndrome)</i> | Componente de matriz extracelular. Promove adesão celular via ligação à integrina $\alpha v\beta 3$ | 26,1 | 0,000 |
| <i>CCL18</i> | <i>Chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)</i> | Quimiocina. Promove resposta imune humoral e celular | 26,1 | 0,000 |
| <i>SIAT1</i> | <i>ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1</i> | Metabolismo de carboidratos | 17,2 | 0,013 |
| <i>IGFBP4</i> | <i>Insulin-like growth factor-binding protein 4</i> | Antagonista de IGFs | 16,3 | 0,023 |

Fonte: REBHAN et al. (1997) - banco de dados genecards (<http://www.genecards.org/>).



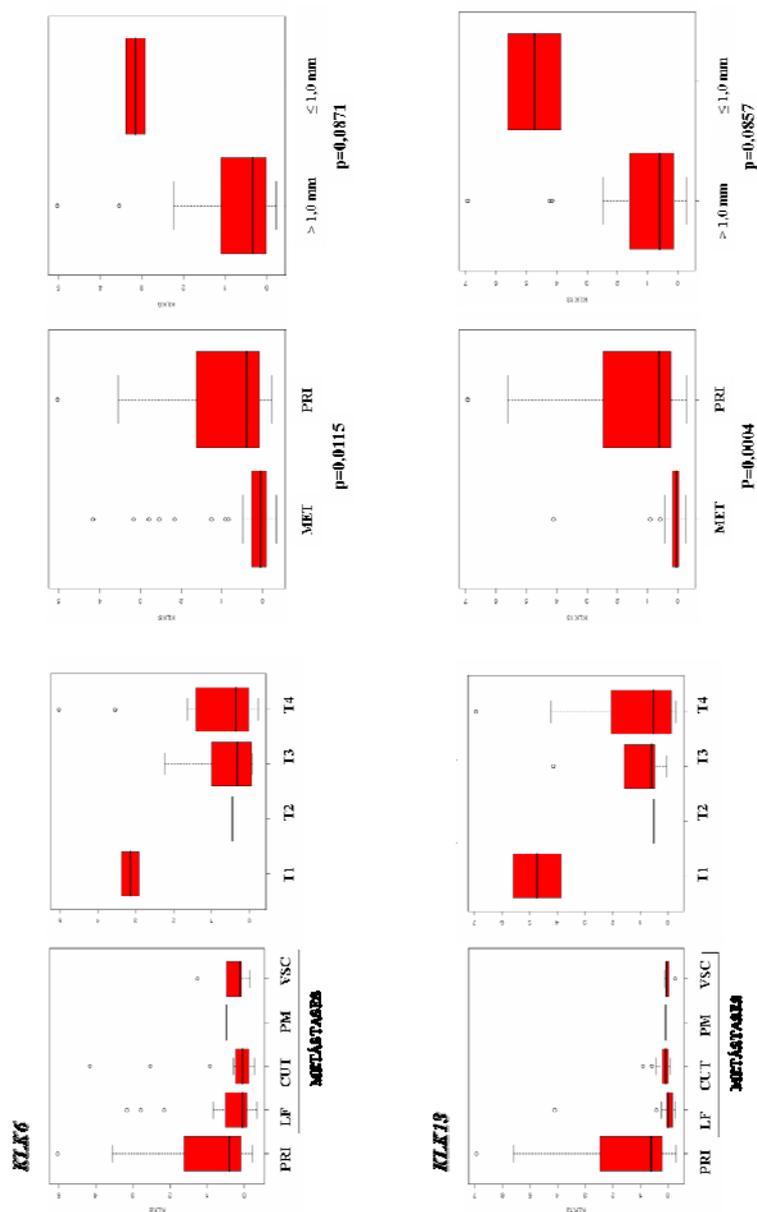
Legenda: Índice de Breslow - T1: < 1,0 mm; T2: 1,01-2,0 mm; T3: 2,01-4,0 mm; T4: > 4,0 mm. Metástases - LF: Linfonodal; CUT: Cutânea; PM: Pulmonar; e VSC: Visceral. MET: Melanomas metastáticos; PRI: Melanomas primários.

Figura 13 – Gráficos *box-plot* mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (log₂) dos genes (*KLK7* e *LAMA3*) que contribuíram na classificação do módulo desenvolvimento da epiderme segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow.



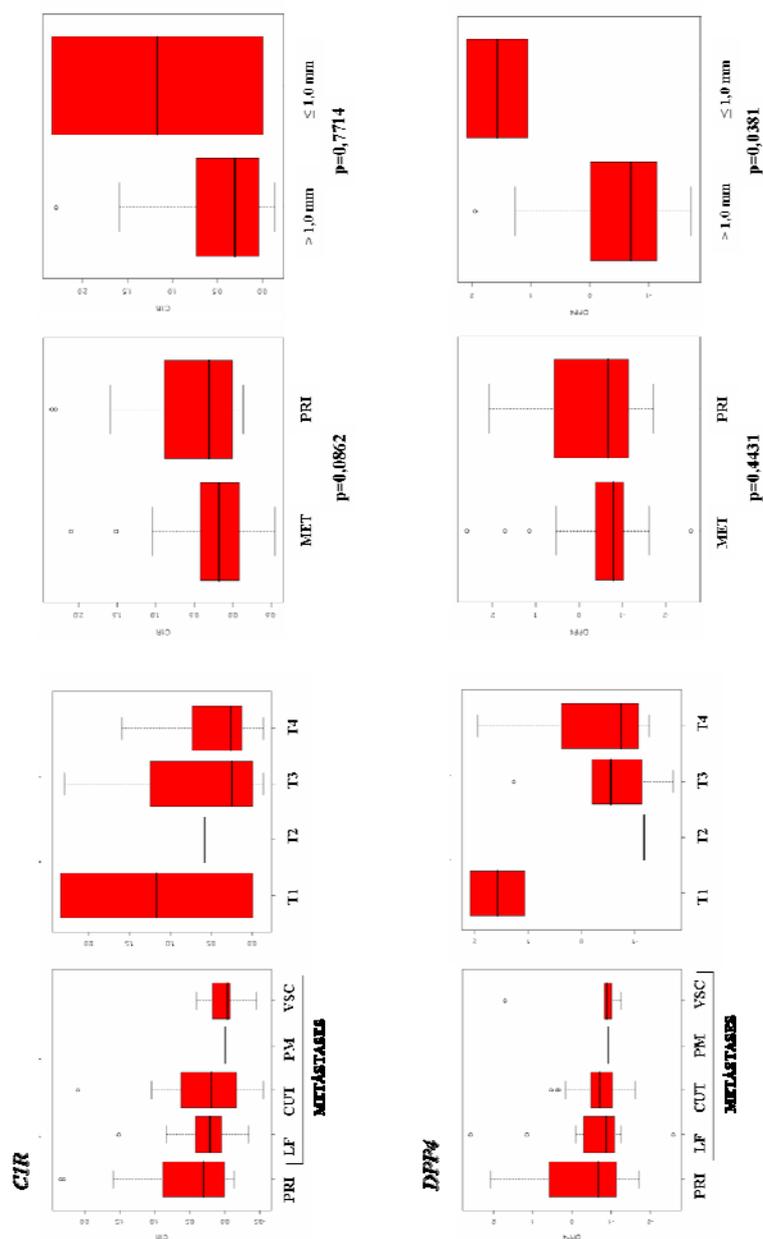
Legenda: Índice de Breslow - T1: < 1,0 mm; T2: 1,01-2,0 mm; T3: 2,01-4,0 mm; T4: > 4,0 mm. Metástases - LF: Linfonodal; CUT: Cutânea; PM: Pulmonar; e VSC: Visceral. MET: Melanomas metastáticos; PRI: Melanomas primários.

Figura 14 – Gráficos *box-plot* mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*EMP1* e *CTGF*) que contribuíram na classificação do módulo desenvolvimento da epiderme segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow.



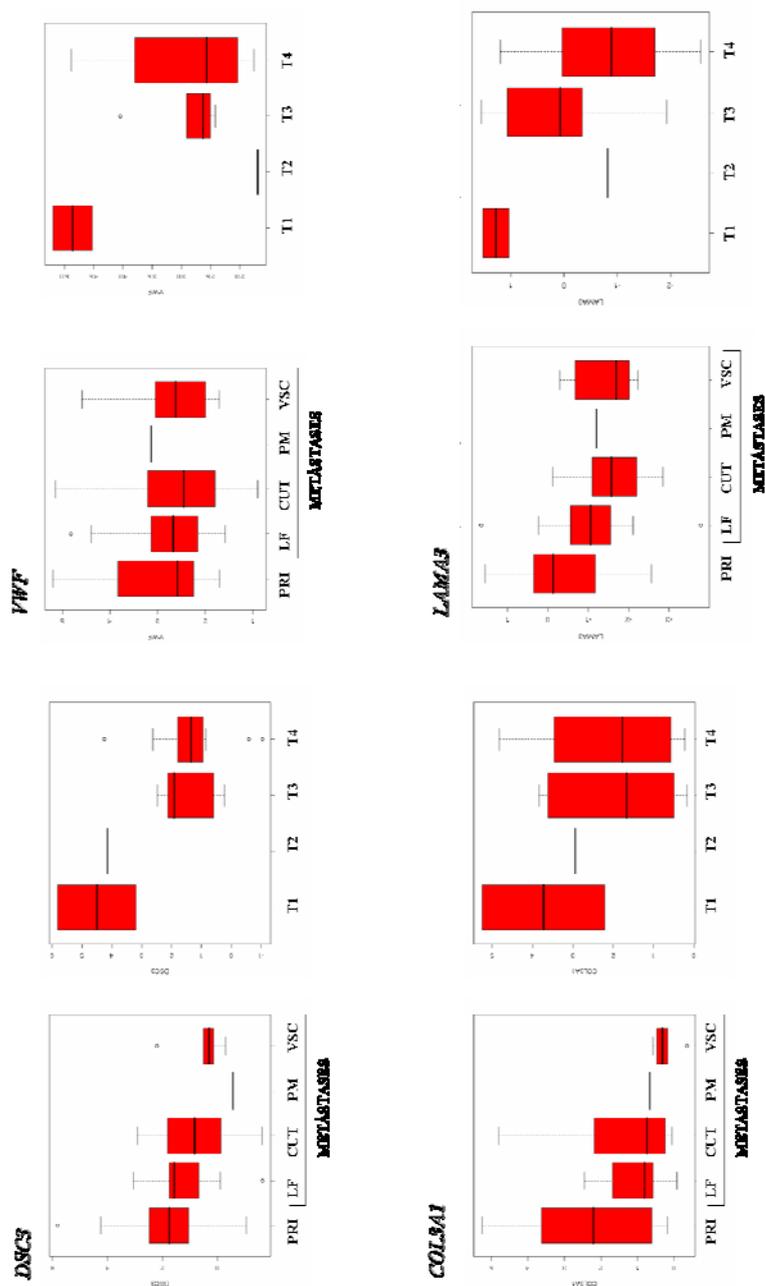
Legenda: Índice de Breslow - T1: < 1,0 mm; T2: 1,01-2,0 mm; T3: 2,01-4,0 mm; T4: > 4,0 mm. Metástases - LF: Linfonodal; CUT: Cutânea; PM: Pulmonar; e VSC: Visceral. MET: Melanomas metastáticos; PRI: Melanomas primários.

Figura 15 – Gráficos *box-plot* mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*KLK6* e *KLK13*) que contribuíram na classificação do módulo atividade de peptidase segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow.



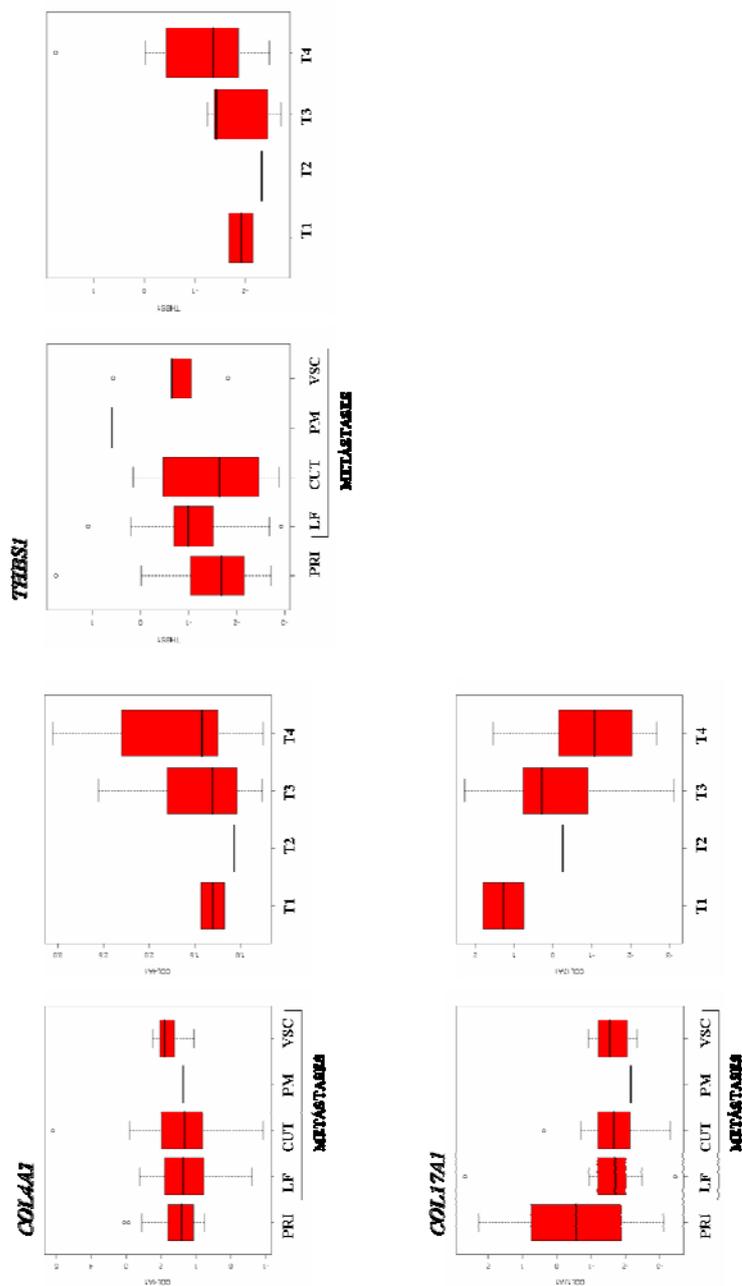
Legenda: Índice de Breslow - T1: < 1,0 mm; T2: 1,01-2,0 mm; T3: 2,01-4,0 mm; T4: > 4,0 mm. Metástases - LF: Linfonodal; CUT: Cutânea; PULM: Pulmonar; e VISC: Visceral. MET: Melanomas metastáticos; PRI: Melanomas primários.

Figura 16 – Gráficos *box-plot* mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*CIR* e *DPP4*) que contribuíram na classificação do módulo atividade de peptidase segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow.



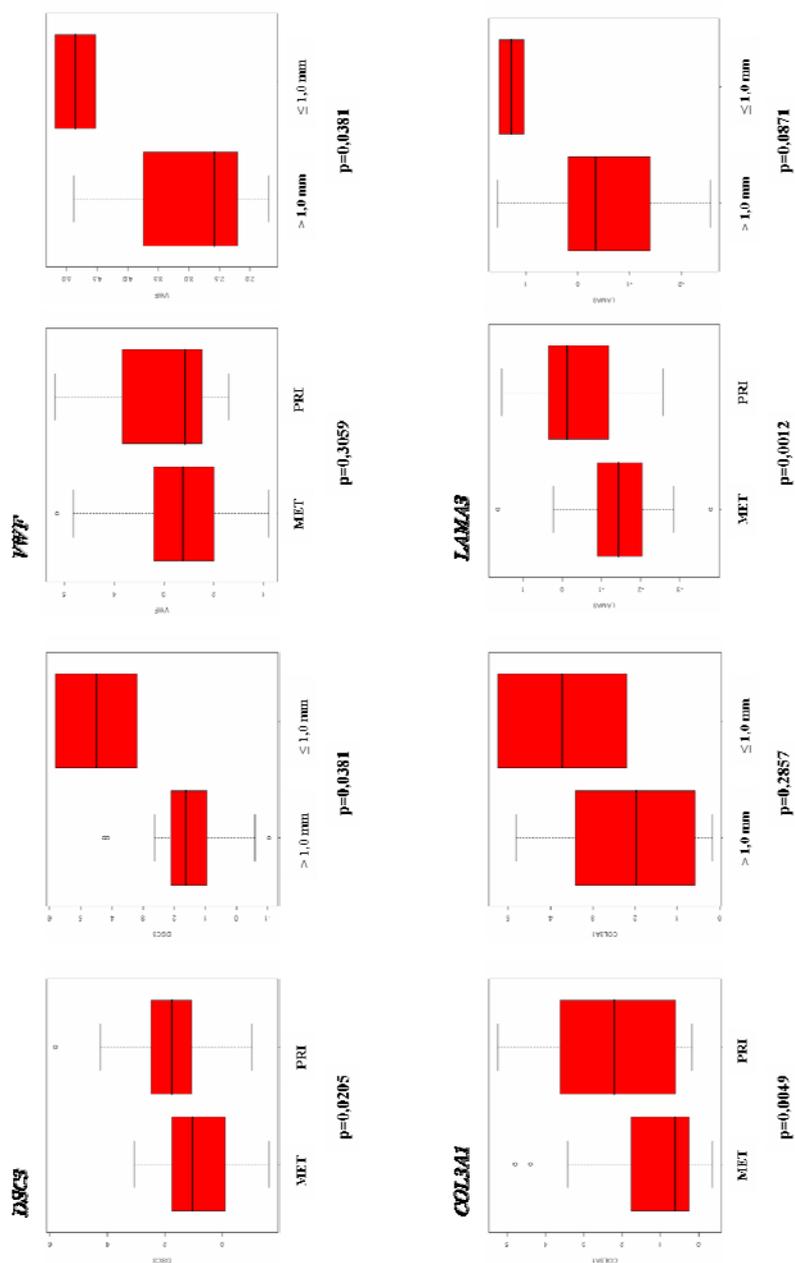
Legenda: Índice de Breslow - T1: < 1,0 mm; T2: 1,01-2,0 mm; T3: 2,01-4,0 mm; T4: > 4,0 mm. Metástases - LF: Linfonodal; CUT: Cutânea; PM: Pulmonar; e VSC: Visceral.

Figura 17 – Gráficos *box-plot* gerados com base na intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*COL3A1*; *DSC3*; *LAMA3* e *VWF*) que contribuíram na classificação do módulo comunicação celular segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow.



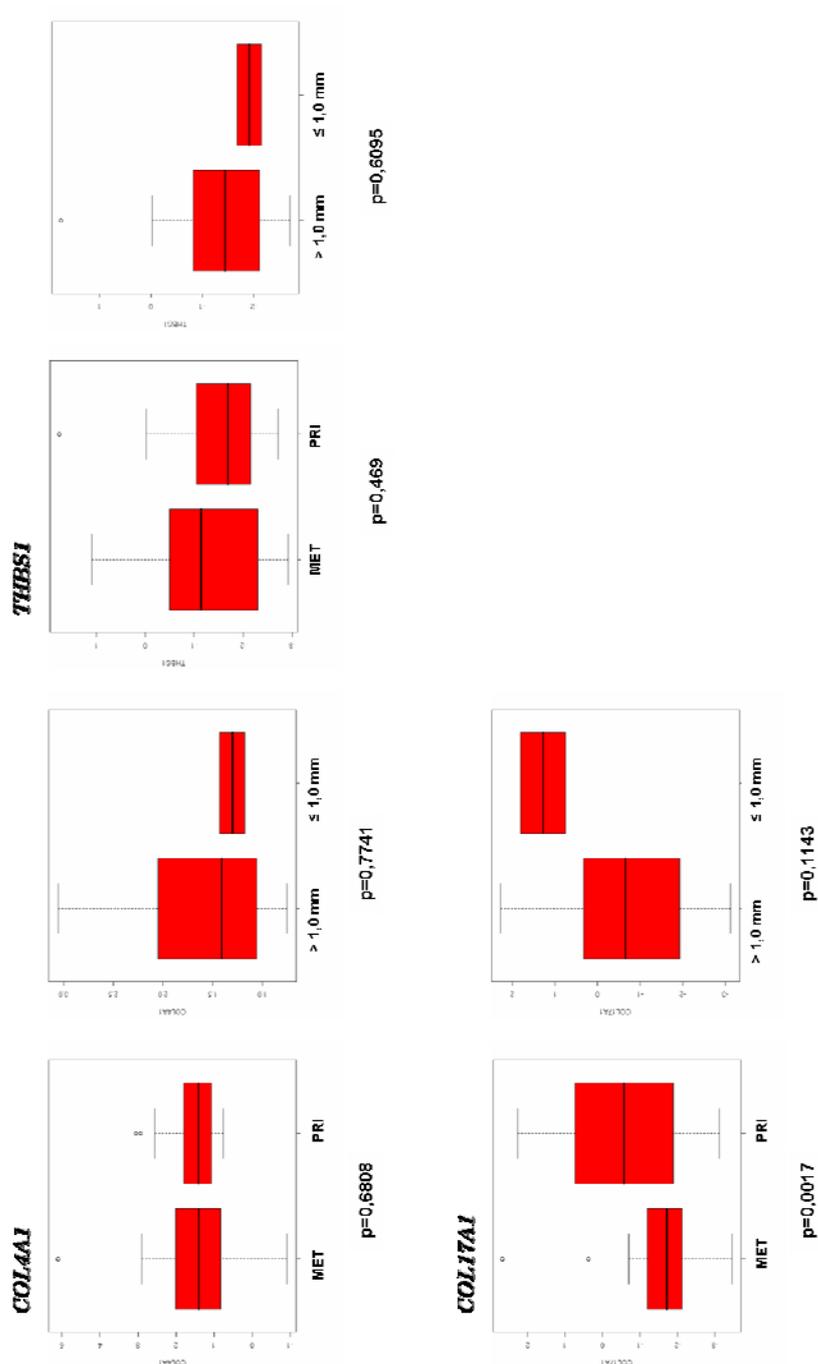
Legenda: Índice de Breslow - T1: < 1,0 mm; T2: 1,01-2,0 mm; T3: 2,01-4,0 mm; T4: > 4,0 mm. Metástases - LF: Linfonodal; CUT: Cutânea; PM: Pulmonar; e VSC: Visceral.

Figura 18 – Gráficos *box-plot* gerados com base na intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*COL4A1*; *COL17A1* e *THBS1*) que contribuíram na classificação do módulo comunicação celular segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow.



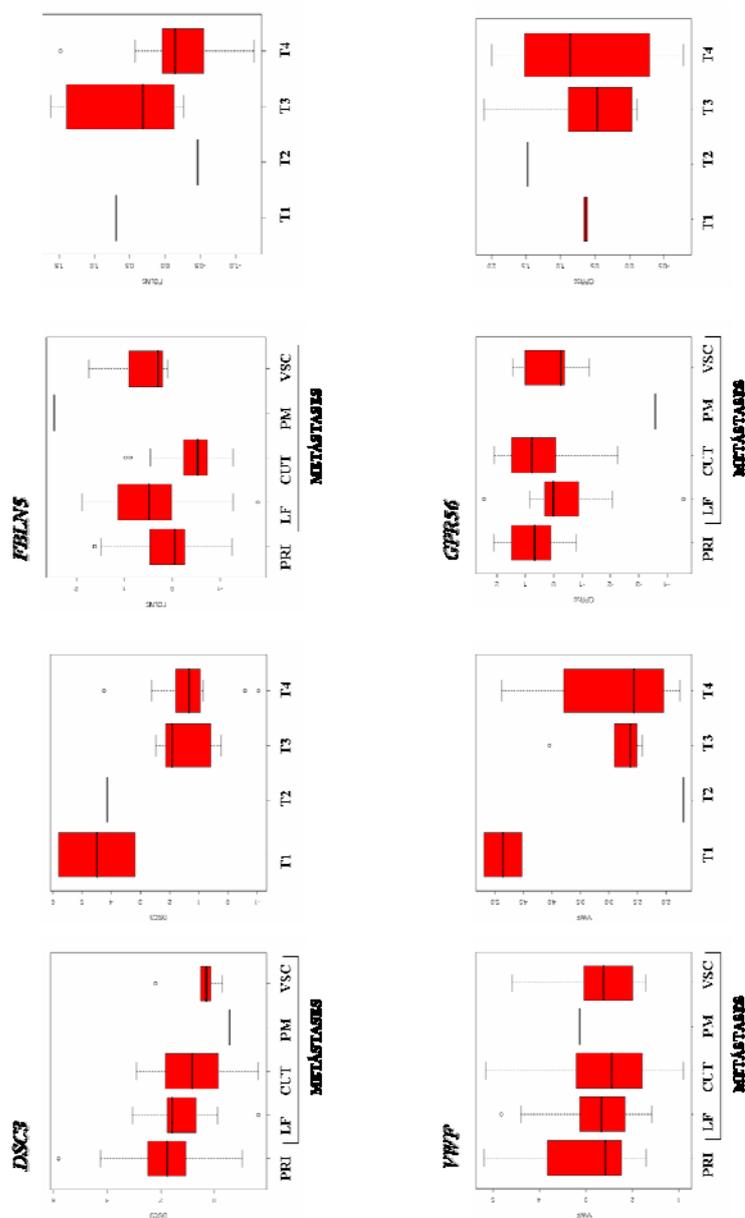
Legenda: MET: Melanomas metastáticos; PRI: Melanomas primários.

Figura 19 – Gráficos *box-plot* mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*COL3A1*; *DSC3*; *LAMA3* e *VWF*) que contribuíram na classificação do módulo comunicação celular segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow.



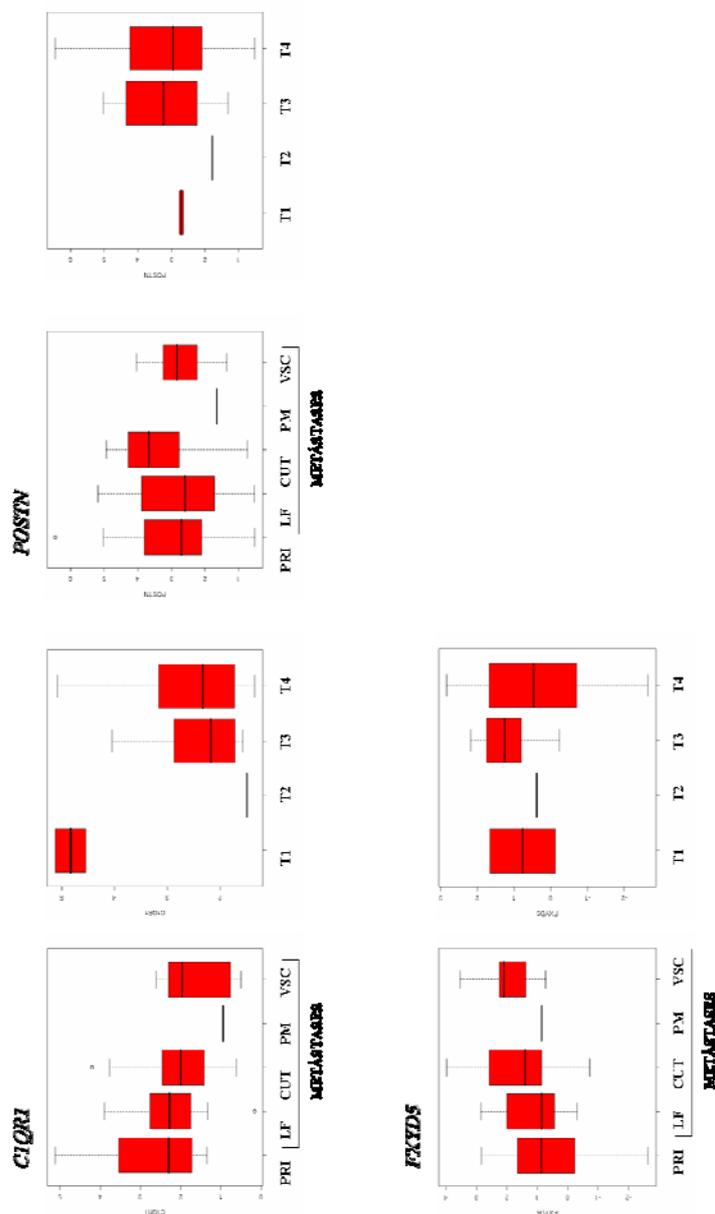
Legenda: MET: Melanomas metastáticos; PRI: Melanomas primários.

Figura 20 – Gráficos *box-plot* mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*COL4A1*; *COL17A1* e *THBS1*) que contribuíram na classificação do módulo comunicação celular segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow.



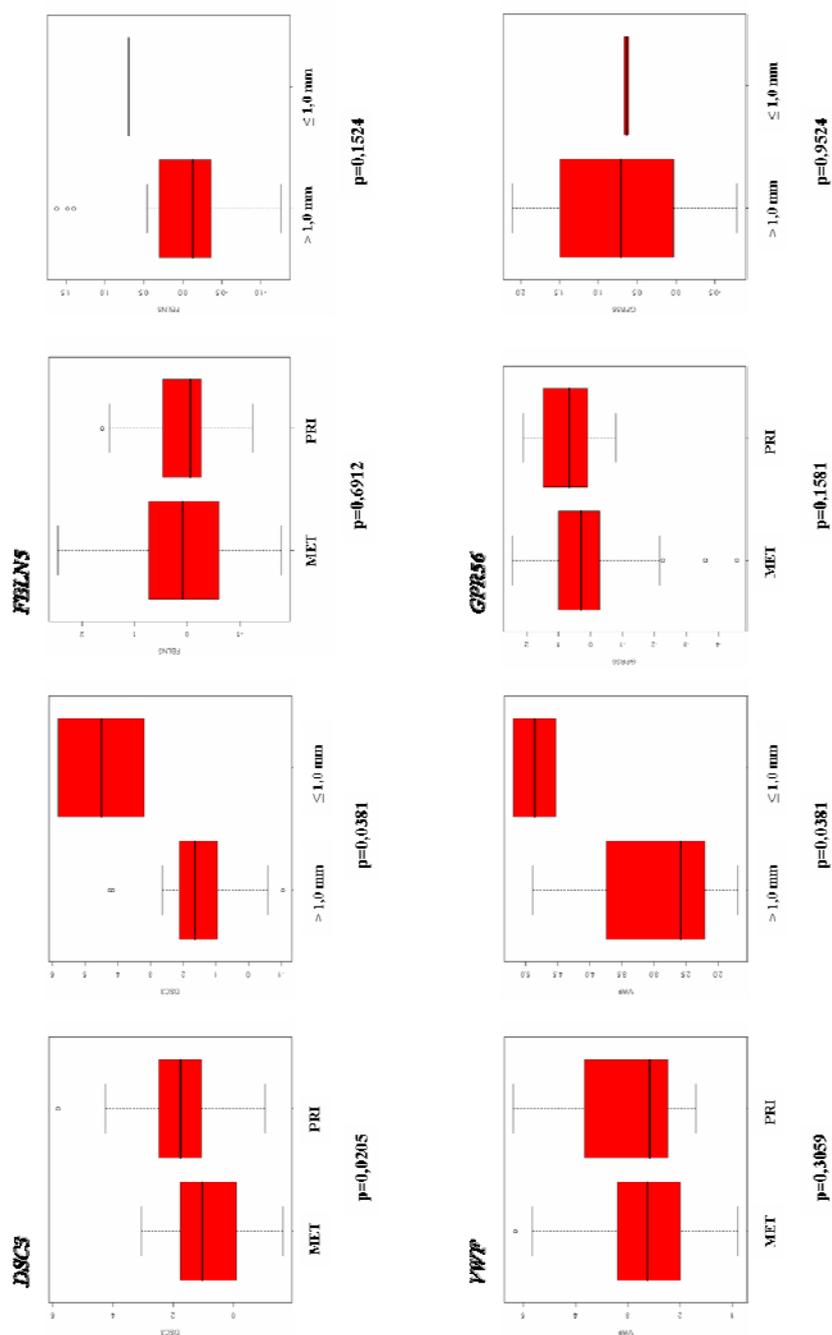
Legenda: Índice de Breslow - T1: < 1,0 mm; T2: 1,01-2,0 mm; T3: 2,01-4,0 mm; T4: > 4,0 mm. Metástases - LF: Linfonodal; CUT: Cutânea; PM: Pulmonar; e VSC: Visceral. MET: Melanomas metastáticos; PRI: Melanomas primários.

Figura 21 – Gráficos *box-plot* gerados com base na intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*DSC3*; *FBLN5*; *GPR56* e *VWF*) que contribuíram na classificação do módulo adesão celular segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow.



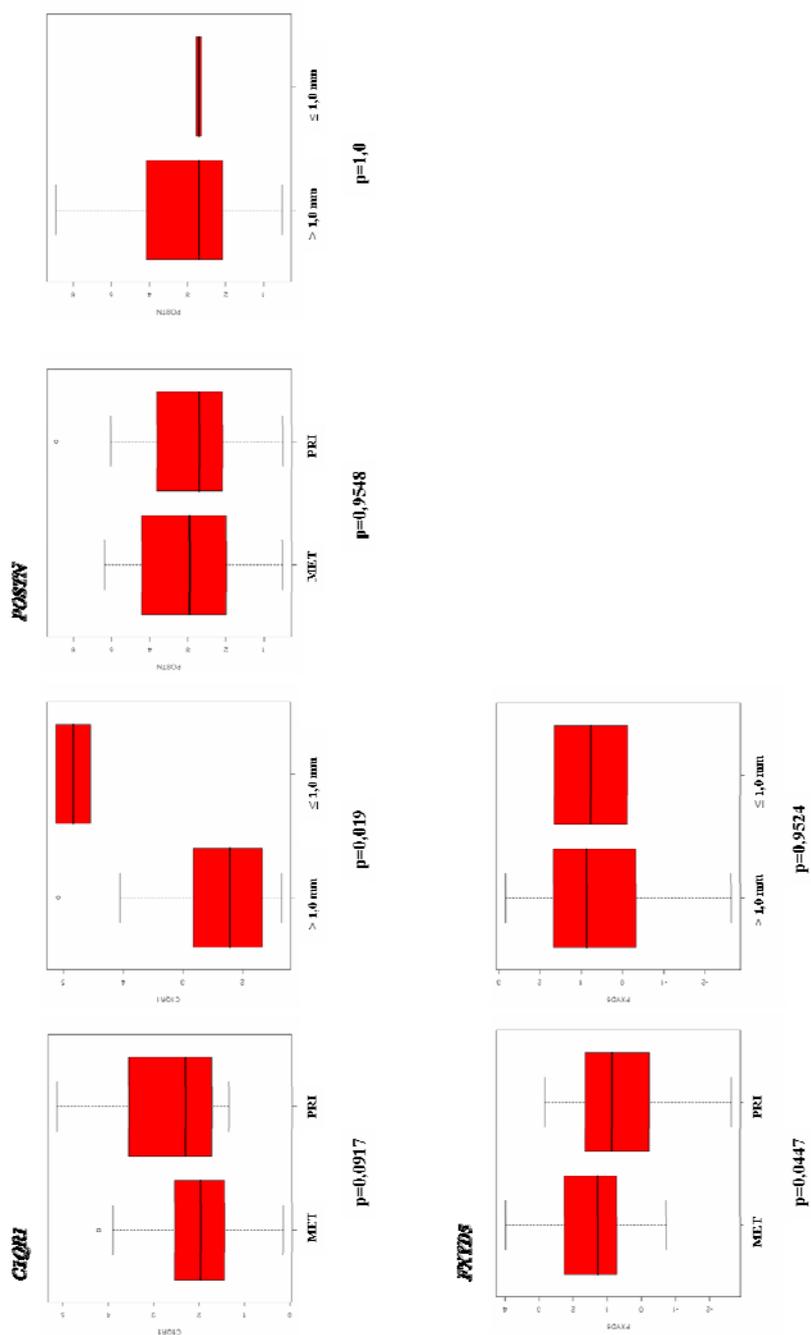
Legenda: Índice de Breslow - T1: < 1,0 mm; T2: 1,01-2,0 mm; T3: 2,01-4,0 mm; T4: > 4,0 mm. Metástases - LF: Linfonodal; CUT: Cutânea; PM: Pulmonar; e VSC: Visceral. MET: Melanomas metastáticos; PRI: Melanomas primários.

Figura 22 – Gráficos *box-plot* gerados com base na intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*CIQR1*; *FXYD5* e *POSTN*) que contribuíram na classificação do módulo adesão celular segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow.



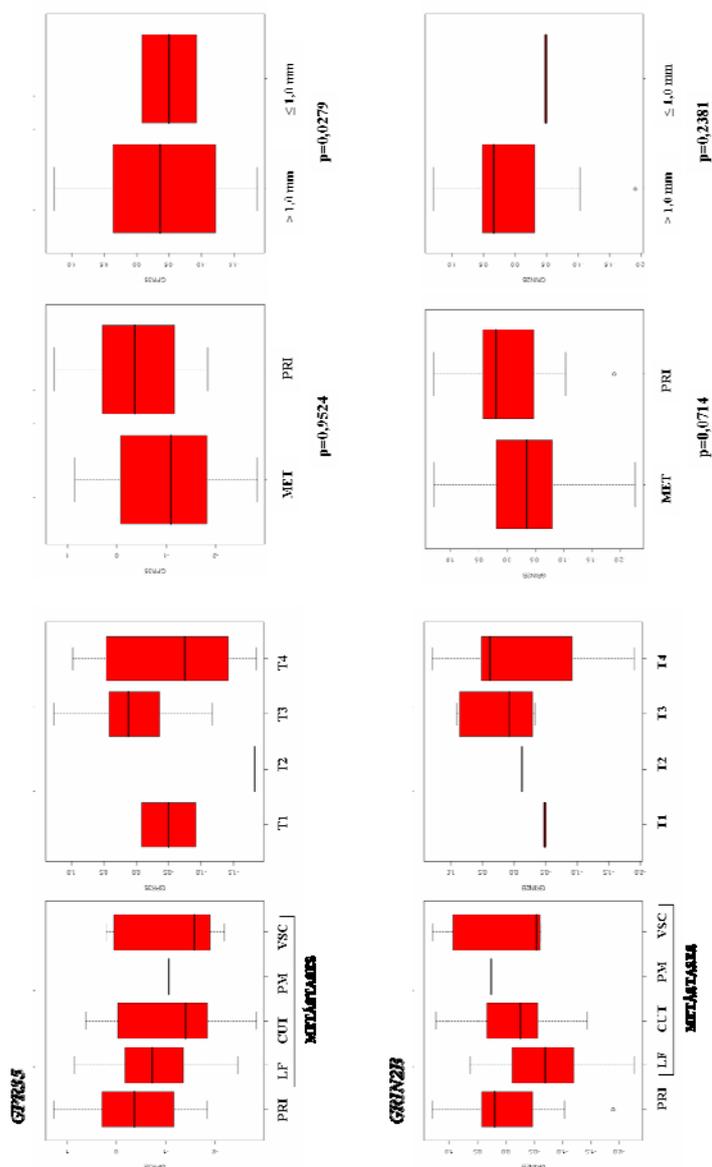
Legenda: MET: Melanomas metastáticos; PRI: Melanomas primários.

Figura 23 – Gráficos *box-plot* mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*DSC3*; *FBLN5*; *GPR56* e *VWF*) que contribuíram na classificação do módulo adesão celular segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow.



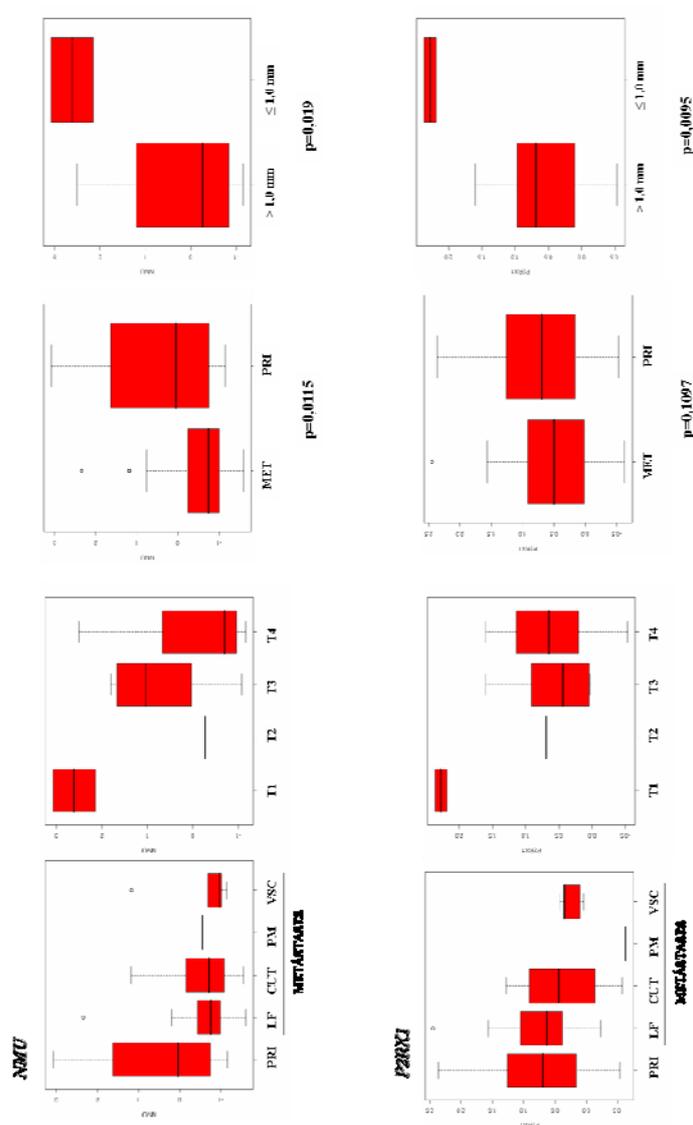
Legenda: MET: Melanomas metastáticos; PRI: Melanomas primários.

Figura 24 – Gráficos *box-plot* mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*CIQRI*; *FXYS5* e *POSTN*) que contribuíram na classificação do módulo adesão celular segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow.



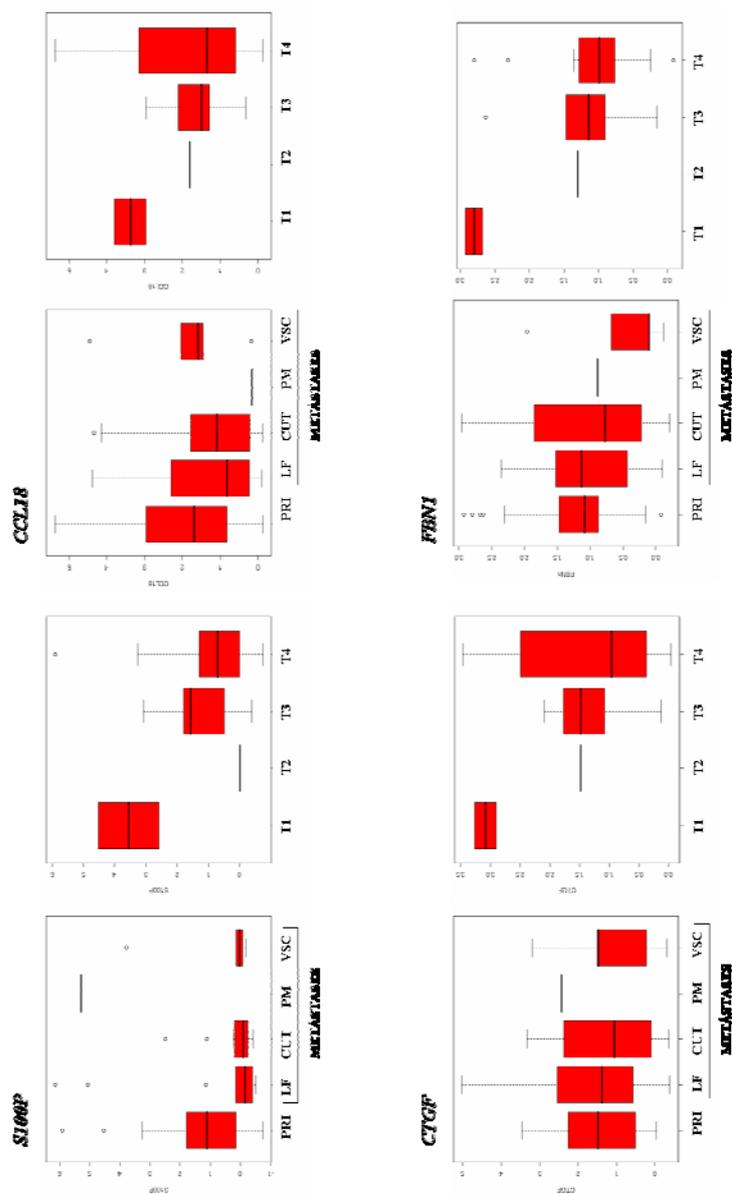
Legenda: Índice de Breslow - T1: < 1,0 mm; T2: 1,01-2,0 mm; T3: 2,01-4,0 mm; T4: > 4,0 mm. Metástases - LF: Linfonodal; CUT: Cutânea; PM: Pulmonar; e VSC: Visceral. MET: Melanomas metastáticos; PRI: Melanomas primários.

Figura 25 – Gráficos *box-plot* mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*GPR35* e *GRIN2B*) que contribuíram na classificação do módulo receptor neuroativo ligante segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow.



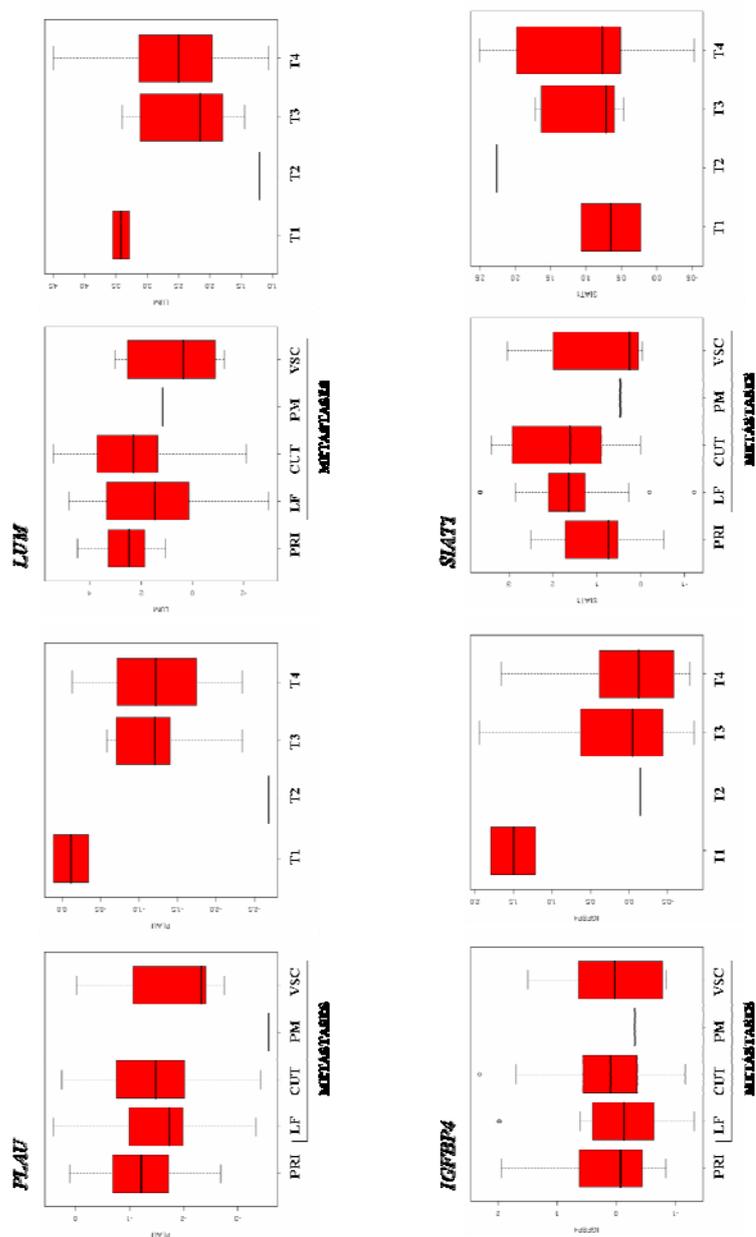
Legenda: Índice de Breslow - T1: < 1,0 mm; T2: 1,01-2,0 mm; T3: 2,01-4,0 mm; T4: > 4,0 mm. Metástases - LF: Linfonodal; CUT: Cutânea; PM: Pulmonar; e VSC: Visceral. MET: Melanomas metastáticos; PRI: Melanomas primários.

Figura 26 – Gráficos *box-plot* mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*NMU* e *P2RX1*) que contribuíram na classificação do módulo receptor neuroativo ligante segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow.



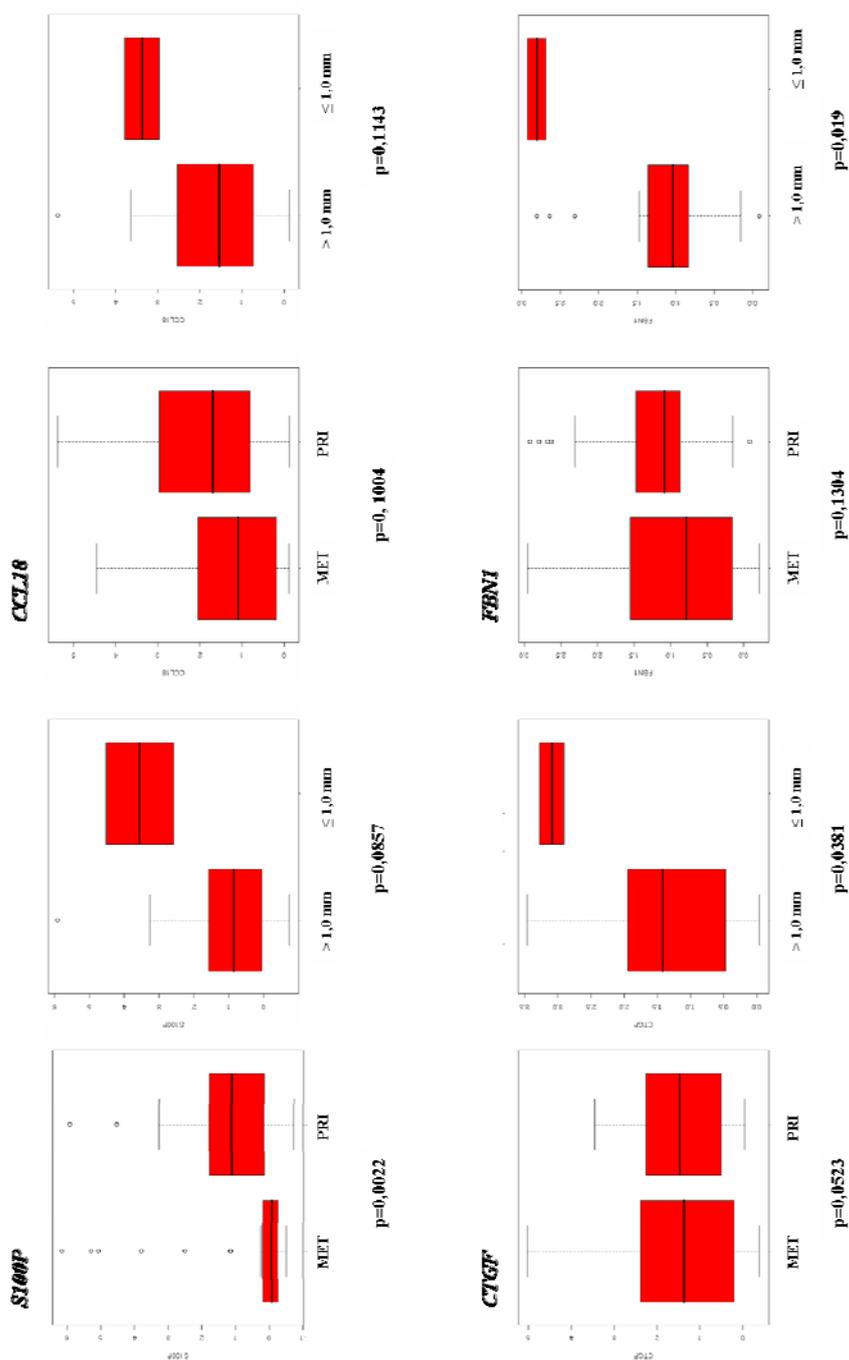
Legenda: Índice de Breslow - T1: < 1,0 mm; T2: 1,01-2,0 mm; T3: 2,01-4,0 mm; T4: > 4,0 mm. Metástases - LF: Linfonodal; CUT: Cutânea; PM: Pulmonar; e VSC: visceral.

Figura 27 – Gráficos *box-plot* gerados com base na intensidade de expressão relativa à amostra referência (log₂) dos genes (*CCL18*; *CTGF*; *FBNI* e *S100P*) que contribuíram na classificação do módulo assinatura metastática segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow.



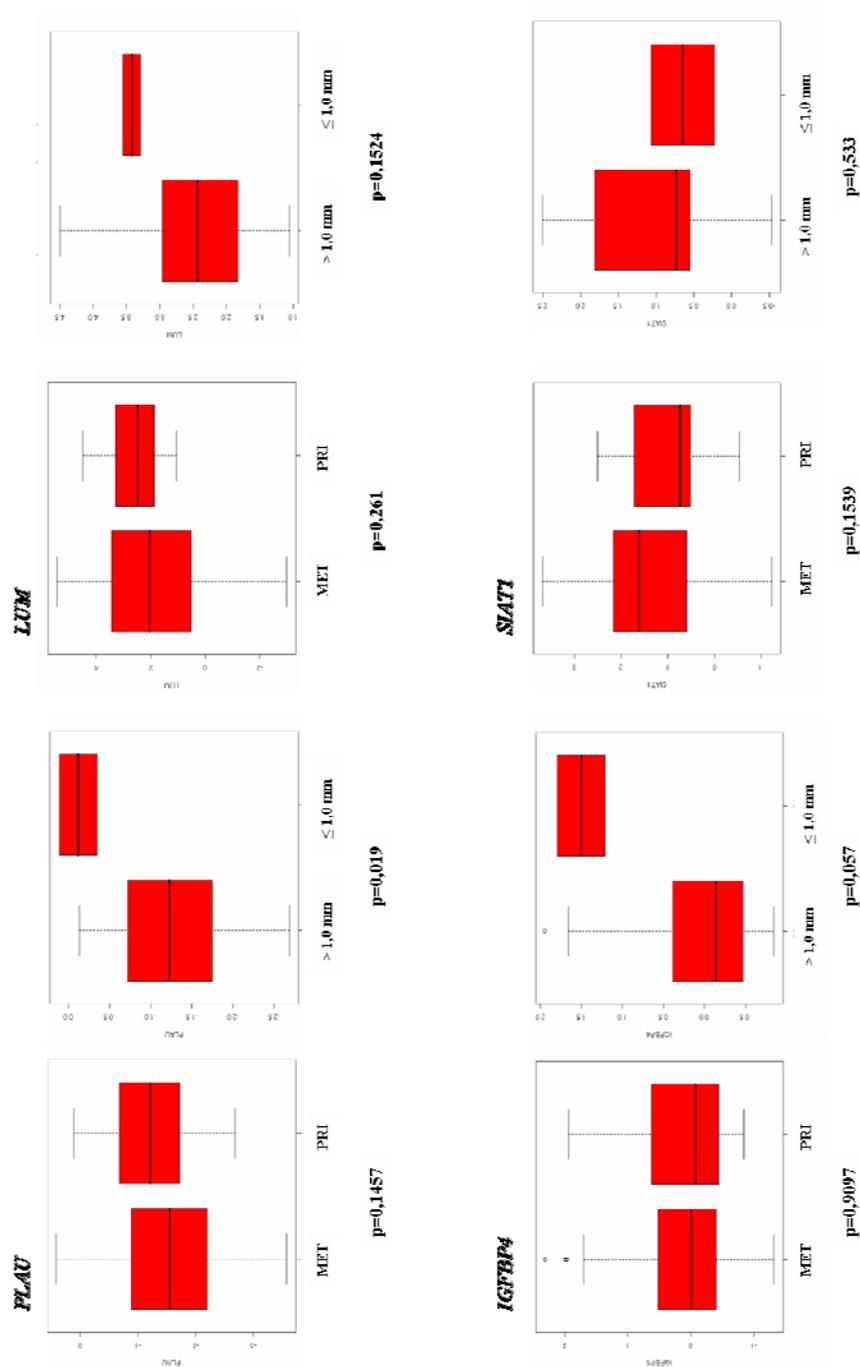
Legenda: Índice de Breslow - T1: < 1,0 mm; T2: 1,01-2,0 mm; T3: 2,01-4,0 mm; T4: > 4,0 mm. Metástases - LF: Linfonodal; CUT: Cutânea; PM: Pulmonar; e VSC: visceral.

Figura 28 – Gráficos *box-plot* gerados com base na intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*IGFBP4*; *LUM*; *PLAUI* e *SIAT1*) que contribuíram na classificação do módulo assinatura metastática segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow.



Legenda: MET: Melanomas metastáticos; PRI: Melanomas primários.

Figura 29 – Gráficos *box-plot* mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*CCL18*; *CTGF*; *FBNI* e *S100P*) que contribuíram na classificação do módulo assinatura metastática segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow.



Legenda: MET: Melanomas metastáticos; PRI: Melanomas primários.

Figura 30 – Gráficos *box-plot* mostrando as diferenças entre as medianas de intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) dos genes (*IGFBP4*; *LUM*; *PLAU* e *SIATI*) que contribuíram na classificação do módulo assinatura metastática segundo o grupo de melanoma e índice de Breslow.

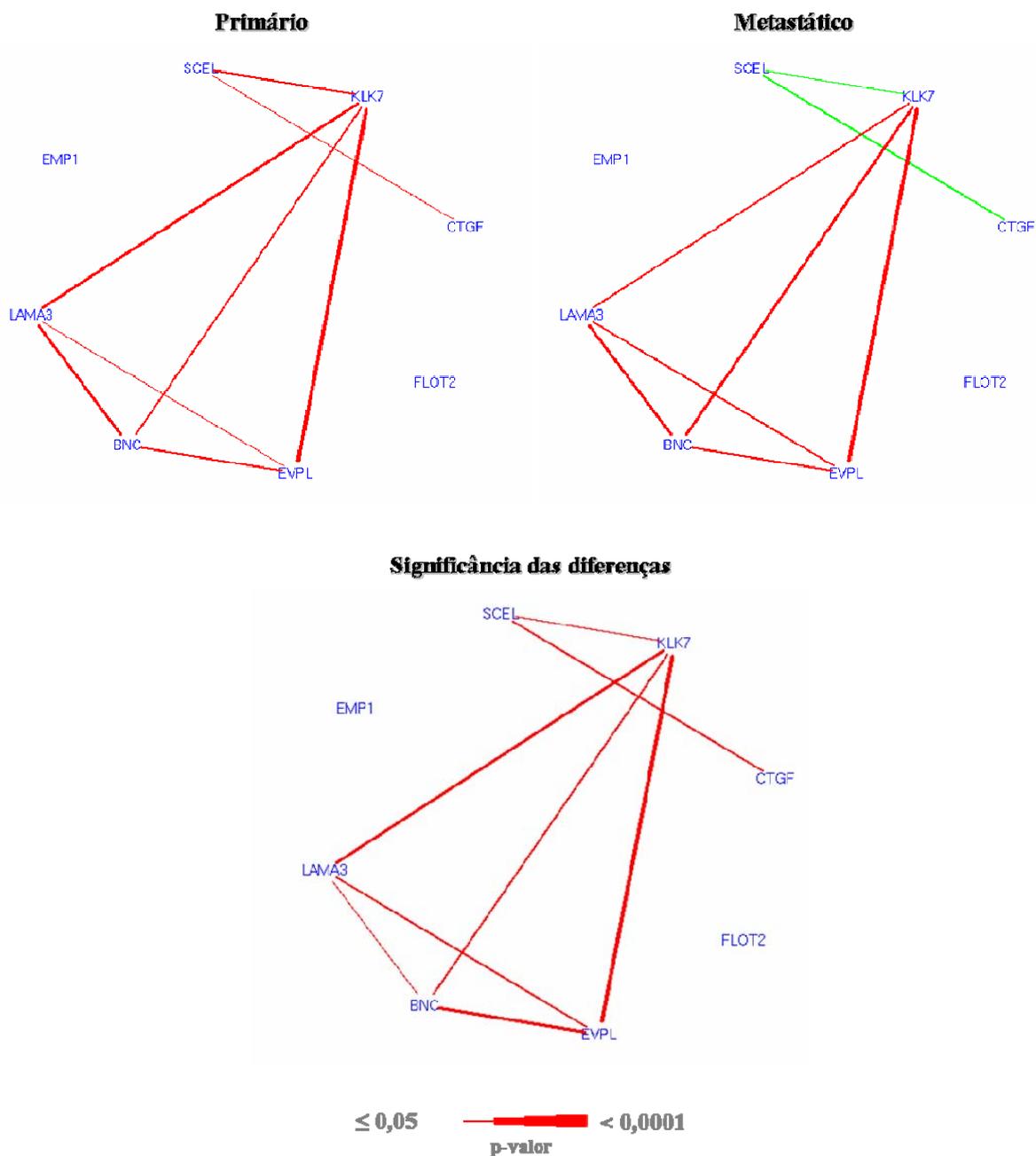
5.3.2 Redes de relevância

Muitas das abordagens empregadas em análise de expressão gênica seguem o conceito de análise dos dados baseada em hipóteses. Isto significa que, com base no conhecimento disponível, perguntamos se um gene candidato mostra expressão alterada. A grande desvantagem desta abordagem é a perda da oportunidade de identificação de novos mecanismos ou genes candidatos.

Ao contrário, analisando-se hipóteses baseadas em dados, é possível identificar genes ou vias metabólicas até então não associadas ao fenômeno biológico em estudo. Para isso, empregamos o conceito de redes de relevância, onde identificamos pares de genes cujo padrão de expressão gênica mostrava-se linearmente correlacionado.

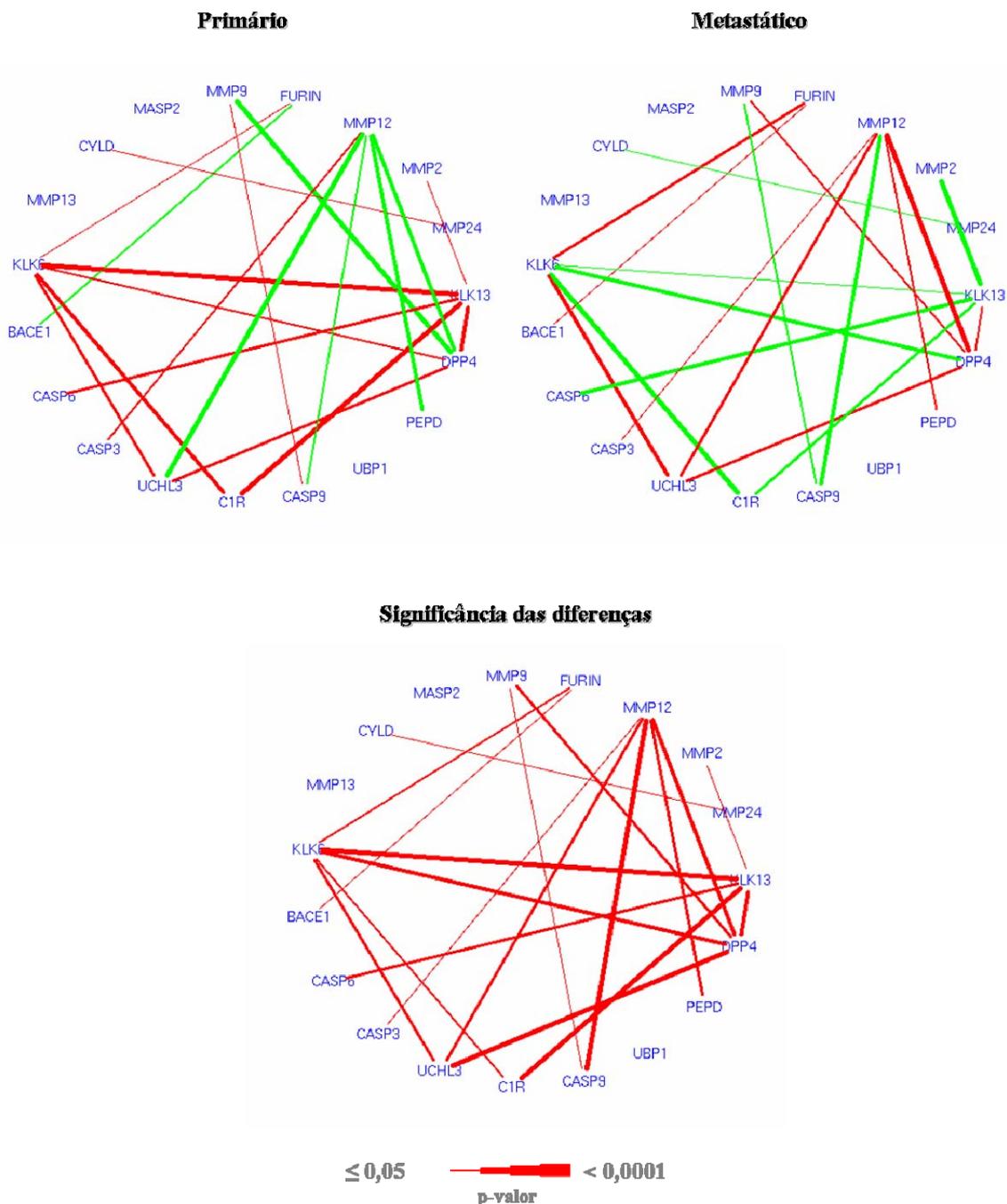
Após avaliar a significância das diferenças de correlação, identificamos milhares de pares de genes cujos coeficientes de correlação foram significativamente alterados ($p \leq 0,05$) na comparação entre melanomas primários e metastáticos.

Apresentamos as redes de relevância somente para aqueles módulos funcionais que se mostraram significativamente alterados segundo o grupo de melanoma (Figuras 31 a 36).



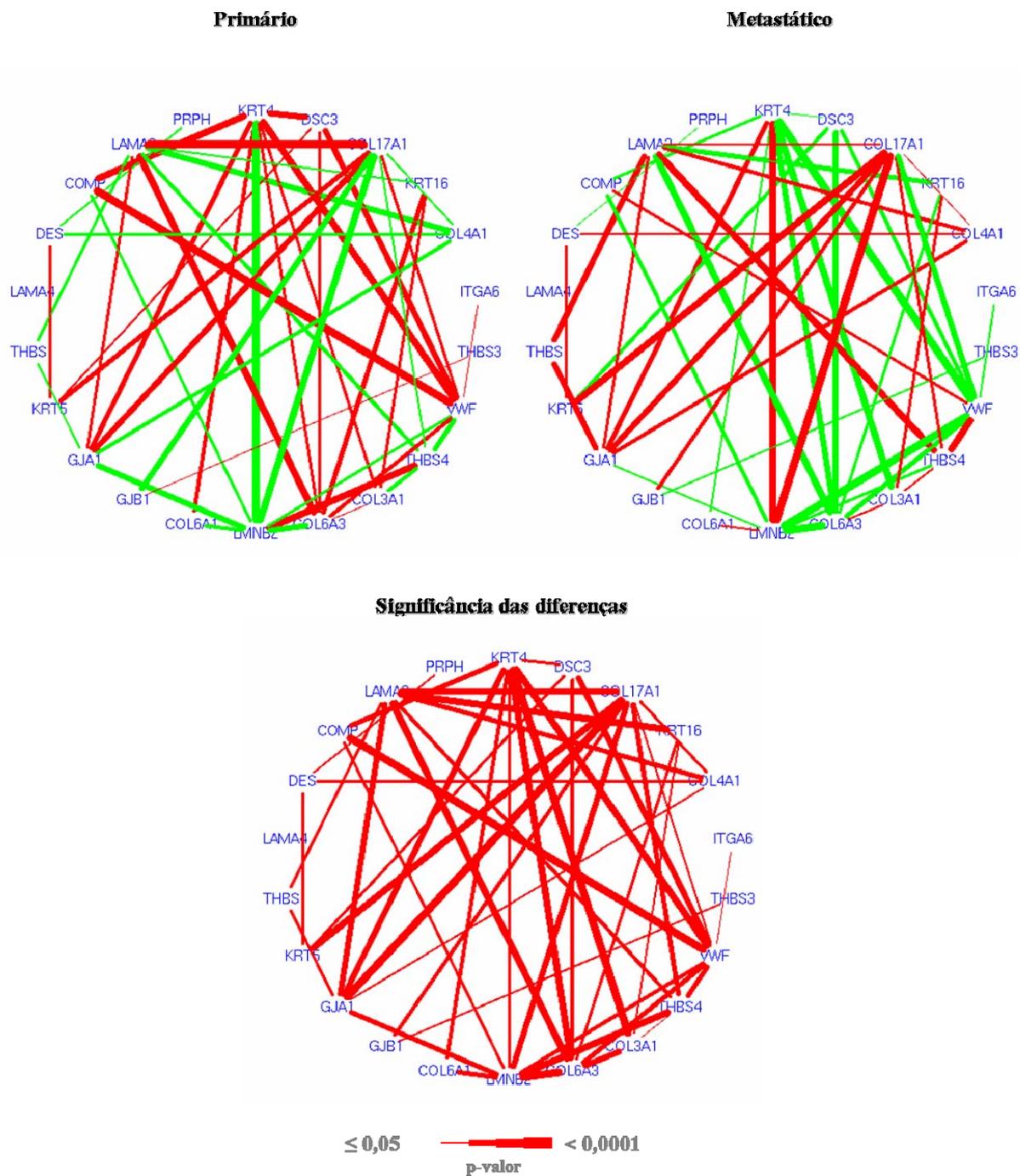
Legenda: Representamos os pares de genes cuja alteração na correlação entre os melanomas primários e metastáticos foi significativa ($p\text{-valor} \leq 0,05$). Correlação positiva está representada por linhas vermelhas, e correlação negativa por linhas verdes. A espessura do traçado da linha correlaciona-se diretamente com a significância das diferenças.

Figura 31 - Rede de relevância para o módulo desenvolvimento da epiderme.



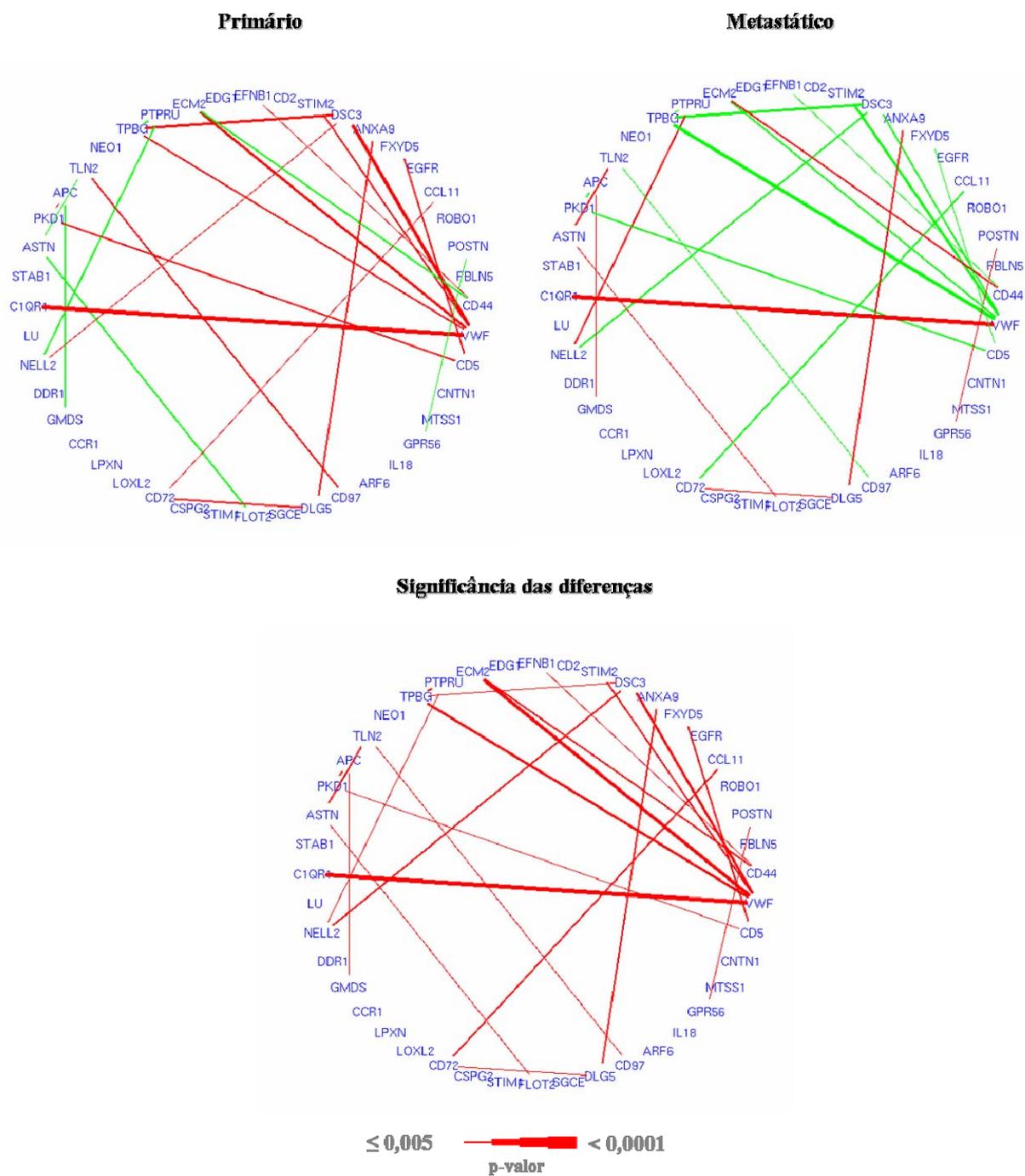
Legenda: Representamos os pares de genes cuja alteração na correlação entre os melanomas primários e metastáticos foi significativa ($p\text{-valor} \leq 0,05$). Correlação positiva está representada por linhas vermelhas, e correlação negativa por linhas verdes. A espessura do traçado da linha correlaciona-se diretamente com a significância das diferenças.

Figura 32 - Rede de relevância para o módulo atividade de peptidase.



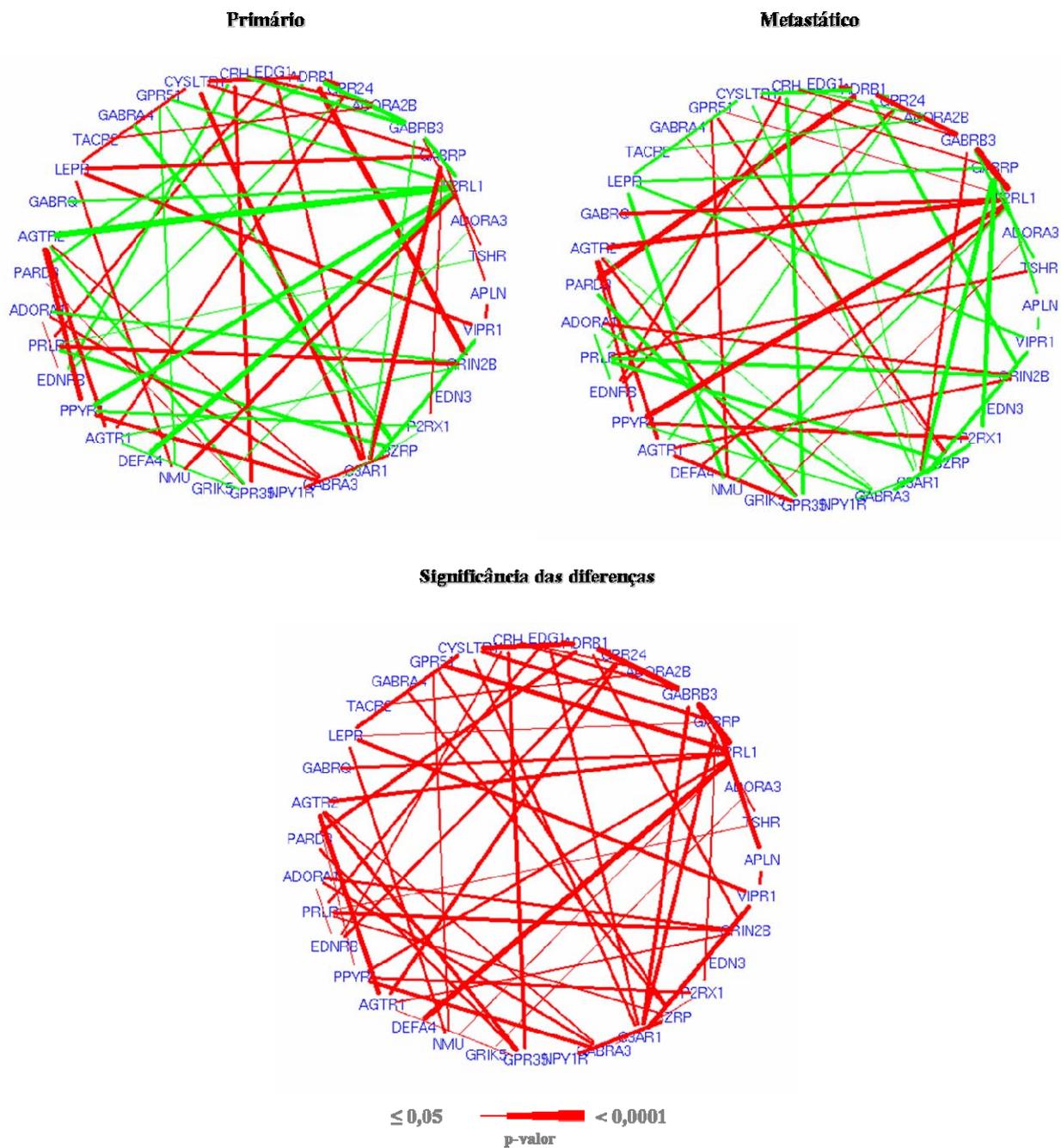
Legenda: Representamos os pares de genes cuja alteração na correlação entre os melanomas primários e metastáticos foi significativa (p -valor $\leq 0,05$). Correlação positiva está representada por linhas vermelhas, e correlação negativa por linhas verdes. A espessura do traçado da linha correlaciona-se diretamente com a significância das diferenças.

Figura 33 - Rede de relevância para o módulo comunicação celular.



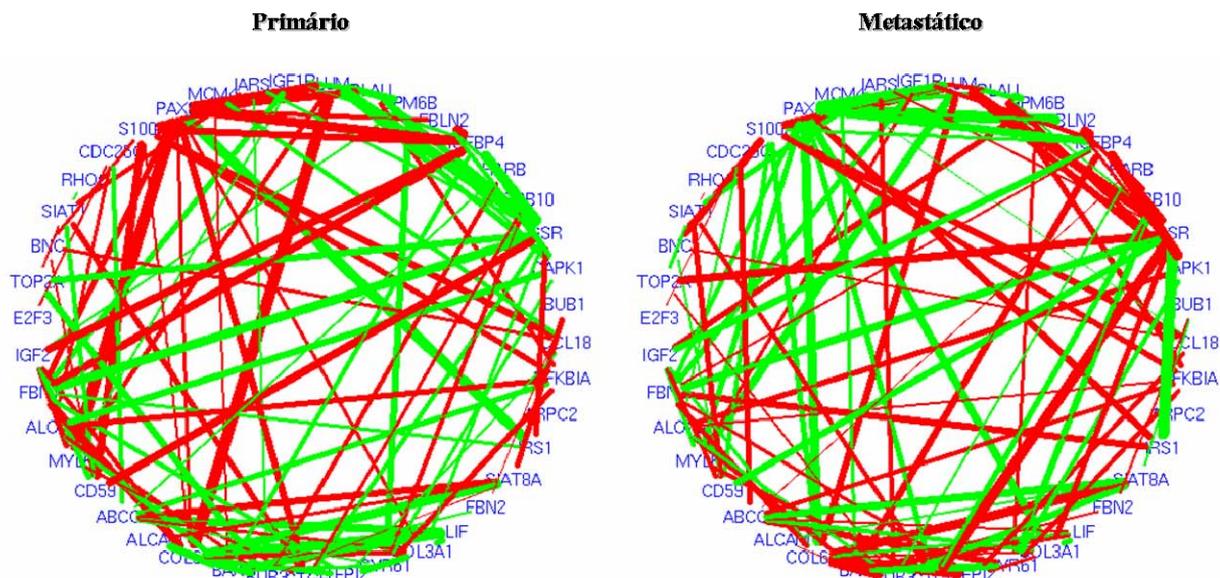
Legenda: Representamos os pares de genes cuja alteração na correlação entre os melanomas primários e metastáticos foi significativa (p -valor $\leq 0,005$). Correlação positiva está representada por linhas vermelhas, e correlação negativa por linhas verdes. A espessura do traçado da linha correlaciona-se diretamente com a significância das diferenças.

Figura 34 - Rede de relevância para o módulo adesão celular.

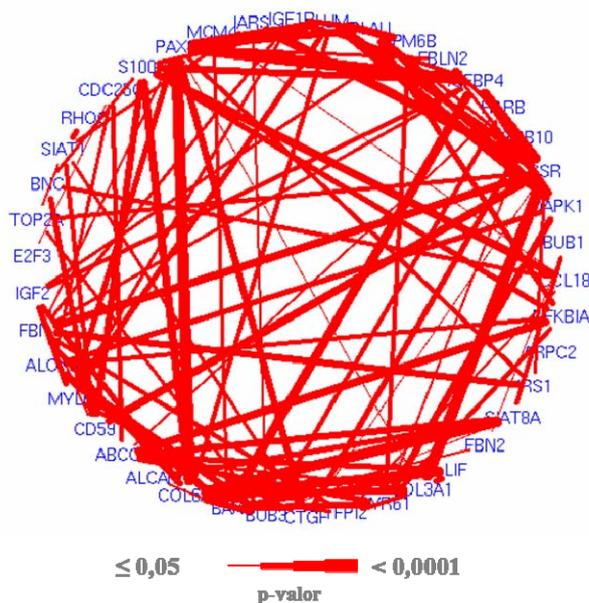


Legenda: Representamos os pares de genes cuja alteração na correlação entre os melanomas primários e metastáticos foi significativa ($p\text{-valor} \leq 0,05$). Correlação positiva está representada por linhas vermelhas, e correlação negativa por linhas verdes. A espessura do traçado da linha correlaciona-se diretamente com a significância das diferenças.

Figura 35 - Rede de relevância para o módulo receptor neuroativo ligante.



Significância das diferenças



Legenda: Representamos os pares de genes cuja alteração na correlação entre os melanomas primários e metastáticos foi significativa (p -valor $\leq 0,05$). Correlação positiva está representada por linhas vermelhas, e correlação negativa por linhas verdes. A espessura do traçado da linha correlaciona-se diretamente com a significância das diferenças.

Figura 36 - Rede de relevância para o módulo assinatura metastática.

A seguir, construímos os Quadros (4 a 9) para cada rede de relevância, onde apresentamos alguns pares de genes segundo sua função biológica e mudança de correlação na comparação entre melanomas primários e metastáticos.

Quadro 4 - Rede de relevância desenvolvimento da epiderme, segundo a função biológica e mudança de correlação.

| | KLK7 | LAMA3 | SCEL | CTGF | BNC | EVPL | | Função biológica |
|-------|------|-------|------|------|-----|------|-----|--|
| KLK7 | | | | | | | PRI | Processo de diferenciação e descamação dos queratinócitos epidermais |
| | | | | | | | MET | |
| LAMA3 | | | | | | | PRI | Promove adesão celular focal via ligação à integrina $\alpha 6\beta 4$ |
| | | | | | | | MET | |
| SCEL | | | | | | | PRI | Componente do envelope corneificado |
| | | | | | | | MET | |
| CTGF | | | | | | | PRI | Promove adesão celular |
| | | | | | | | MET | |
| BNC | | | | | | | PRI | Processo de diferenciação do queratinócitos epidermais |
| | | | | | | | MET | |
| EVPL | | | | | | | PRI | Componente do envelope corneificado |
| | | | | | | | MET | |

Quadro 5 – Rede de relevância atividade de peptidase, segundo a função biológica e mudança de correlação.

| | KLK6 | KLK13 | DPP4 | C1R | UCHL3 | CASP6 | MMP9 | MMP12 | | Função biológica |
|-------|------|-------|------|-----|-------|-------|------|-------|-----|--|
| KLK6 | | Red | Red | Red | Red | | | | PRI | Serina protease envolvida no processo de descamação |
| | | Grn | Grn | Grn | Red | | | | MET | |
| KLK13 | Red | | Red | Red | | Red | | | PRI | Serina protease envolvida no processo de descamação |
| | Grn | | Red | Grn | | Grn | | | MET | |
| DPP4 | Red | Red | | | Red | | Grn | Grn | PRI | Peptidase regulada pelo <i>hepatocyte nuclear factor 1 alpha</i> |
| | Grn | Red | | | Red | | Red | Red | MET | |
| C1R | Red | Red | | | | | | | PRI | Serina protease |
| | Grn | Grn | | | | | | | MET | |
| UCHL3 | Red | | Red | | | | | Grn | PRI | Hidrolase envolvida no processamento de ubiquitinadas |
| | Red | | Red | | | | | Red | MET | |
| CASP6 | | Red | | | | | | | PRI | Proteinase envolvida em apoptose |
| | | Grn | | | | | | | MET | |
| MMP9 | | | Grn | | | | | | PRI | Metaloproteinase |
| | | | Red | | | | | | MET | |
| MMP12 | | | Grn | | Grn | | | | PRI | Metaloproteinase |
| | | | Red | | Red | | | | MET | |

Quadro 6 - Rede de relevância comunicação celular, segundo a função biológica e mudança de correlação.

| | COL3A1 | DSC3 | VWF | KTR5 | COL6A3 | THBS4 | | Função biológica |
|--------|--------|------|-----|------|--------|-------|-----|--|
| COL3A1 | | | | | | | PRI | Componente de matriz extracelular |
| | | | | | | | MET | |
| DSC3 | | | | | | | PRI | Componente da junção intercelular desmossoma |
| | | | | | | | MET | |
| VWF | | | | | | | PRI | Componente de matriz extracelular |
| | | | | | | | MET | |
| KTR5 | | | | | | | PRI | Filamento intermediário |
| | | | | | | | MET | |
| COL6A3 | | | | | | | PRI | Componente de matriz extracelular |
| | | | | | | | MET | |
| THBS4 | | | | | | | PRI | Molécula de adesão celular que modula interação célula-célula e célula-matriz ao se ligar ao fibrinogênio fibronectina, laminina e colágeno tipo V |
| | | | | | | | MET | |

Quadro 8 – Rede de relevância receptor neuroativo ligante, segundo a função biológica e mudança de correlação.

| | GRIN2B | NMU | GPR35 | ADRB1 | PRLP | ADORA1 | GPR51 | AGTR2 | ATGR1 | | Função biológica |
|--------|--------|-----|-------|-------|------|--------|-------|-------|-------|-----|---|
| GRIN2B | | | | Red | Red | Grn | | | Grn | PRI | Receptor para glutamato |
| | | | | Grn | Grn | Red | | | Red | MET | |
| NMU | | | | | | | Grn | | | PRI | Estimula contração muscular do trato gastrointestinal |
| | | | | | | | Red | | | MET | |
| GPR35 | | | | | | | | Grn | Grn | PRI | Receptor-proteína G 35 |
| | | | | | | | | Red | Red | MET | |
| ADRB1 | Red | | | | | | | | | PRI | Receptor beta-adrenérgico |
| | Grn | | | | | | | | | MET | |
| PRLR | Red | | | | | | | | | PRI | Receptor para prolactina |
| | Grn | | | | | | | | | MET | |
| ADORA1 | Grn | | | | | | | | | PRI | Receptor para adenosina, promove a inibição da adenilil ciclase |
| | Red | | | | | | | | | MET | |
| GPR51 | | Grn | | | | | | | | PRI | Heterodímero de GABA-B-R1 e GABA-B-R2 |
| | | Red | | | | | | | | MET | |
| AGTR2 | | | Grn | | | | | | | PRI | Receptor de angiotensina II |
| | | | Red | | | | | | | MET | |
| ATGR1 | Grn | | Grn | | | | | | | PRI | Receptor de angiotensina II |
| | Red | | Red | | | | | | | MET | |

Quadro 9 – Rede de relevância assinatura metastática, segundo a função biológica e mudança de correlação.

| | LUM | PLAU | CTGF | S100P | FBN1 | COL6A3 | IGFBP4 | PAX8 | GSR | | Função biológica |
|--------|-----|------|------|-------|------|--------|--------|------|-----|-----|---|
| LUM | | | | Red | | Red | | | Grn | PRI | Componente de matriz extracelular, responsável pelo rearranjo de proteoglicanos |
| | | | | Red | | Red | | | Red | MET | |
| PLAU | | | | | | | | Red | Grn | PRI | Ativador de plasminogênio. Modula invasão em cânceres humanos |
| | | | | | | | | Grn | Red | MET | |
| CTGF | | | | | Red | | Red | Red | | PRI | Promove adesão celular |
| | | | | | Grn | | Grn | Grn | | MET | |
| S100P | Red | | | | | | Red | | | PRI | Ligante de cálcio |
| | Red | | | | | | Grn | | | MET | |
| FBN1 | | | Red | | | | Red | Red | | PRI | Componente de matriz extracelular |
| | | | Grn | | | | Red | Grn | | MET | |
| COL6A3 | Red | | | | | | | | | PRI | Componente de matriz extracelular |
| | Red | | | | | | | | | MET | |
| IGFBP4 | | | Red | Red | Red | | | Red | Grn | PRI | Antagonista de IGFs |
| | | | Grn | Grn | Red | | | Grn | Red | MET | |
| PAX8 | | Red | Red | | Red | | Red | | | PRI | Fator de transcrição para <i>thyroid-specific genes</i> |
| | | Grn | Grn | | Grn | | Grn | | | MET | |
| GSR | Grn | Grn | | | | | Grn | | | PRI | Metabolismo da glutatona |
| | Red | Red | | | | | Red | | | MET | |

Desenvolvimento da epiderme

Dentre as redes destacamos a rede de relevância desenvolvimento da epiderme (Figura 31 e Quadro 4). Vemos nesta rede que *KLK7* (*Kallikrein-7 precursor*) se correlaciona com quase todos os componentes (Figura 31). Para se evidenciar melhor estas alterações de correlação entre os pares gênicos, construímos *scatter-plot's* apresentando o valor de expressão relativa à amostra referência (em \log_2) de cada gene por amostra de melanoma (Figura 37).

Nestes gráficos visualizamos a distribuição dos melanomas primários e metastáticos de acordo com o valor de expressão dos pares *KLK7 x LAMA3* (*Laminin, alpha 3*); *KLK7 x EVPL* (*Envoplakin*); *KLK7 x BNC* (*Basonuclin 1*) e *KLK7 x SCEL* (*Sciellin*). Aplicando-se o método transformação Z de Fisher, obtivemos os coeficientes de correlação linear entre *KLK7* e *LAMA3* para os melanomas primários ($R=0,880$) e de ($R=0,103$) para os metastáticos, cuja diferença foi estatisticamente significativa ($p \leq 0,005$) (Figura 37A).

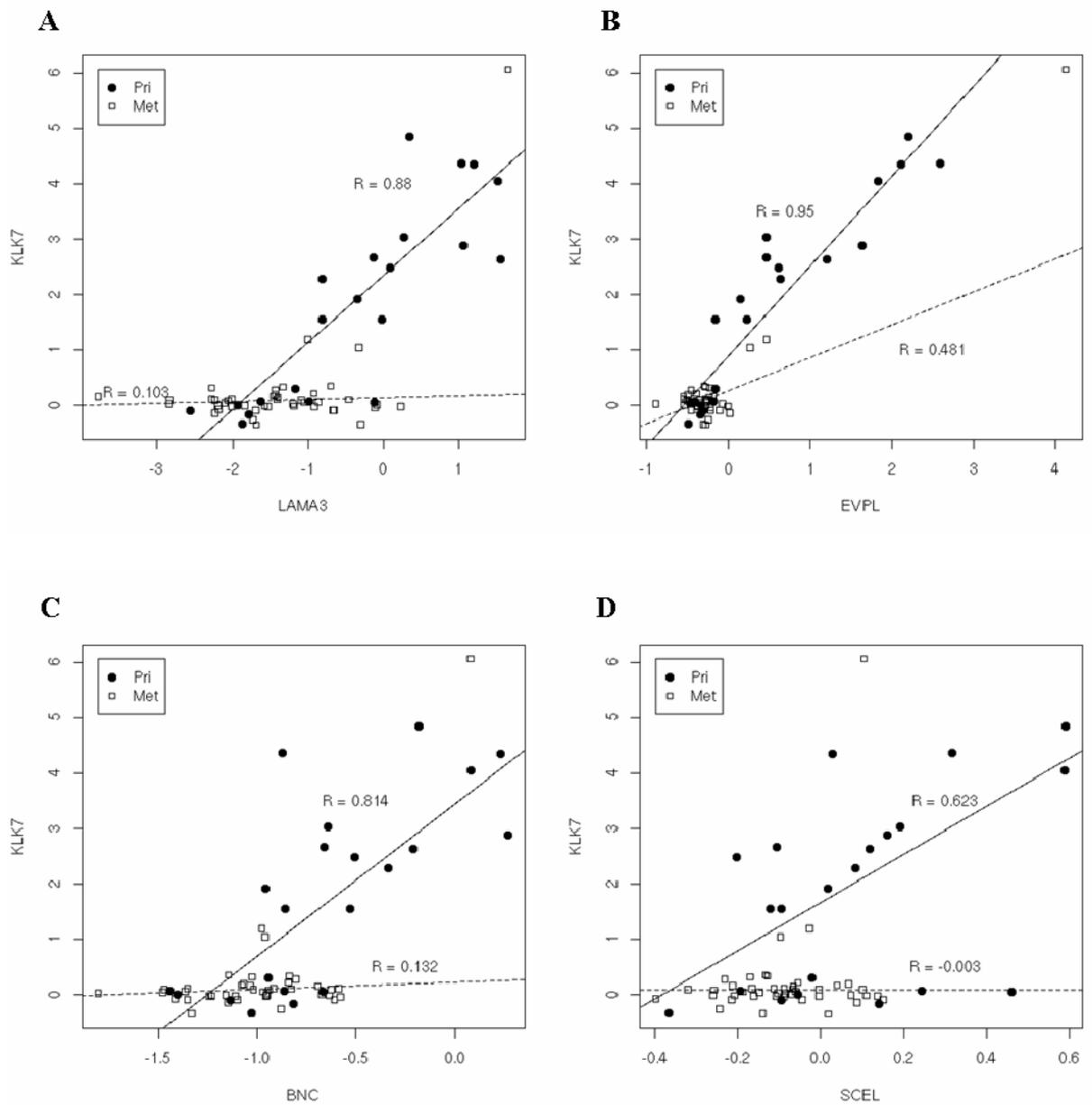
LAMA3 foi o gene que mais contribuiu (escore 16,0 $p=0,0002$) na classificação do módulo funcional desenvolvimento da epiderme segundo o grupo de melanoma (Tabela 1).

A diferença de correlação entre *KLK7* e *EVPL* foi estatisticamente significativa ($p \leq 0,005$), mostrando-se positiva tanto nos melanomas primários ($R=0,950$) quanto nas metástases ($R=0,481$) - Figura 37B.

Além disso, tanto *KLK7* quanto *EVPL* estão significativamente induzidos nos melanomas primários, respectivamente $p=0,0011$ e $p=0,0007$, sendo pouco expressos nas metástases.

Além de envoplaquina, houve uma significativa quebra de correlação ($p \leq 0,005$) entre *KLK7* e *BNC*, mostrando-se expressivamente positiva nos melanomas primários ($R=0,814$), sendo menos ($R=0,132$) nas metástases (Figura 37C).

Já entre *KLK7* e *SCEL* houve uma significativa quebra de correlação ($p \leq 0,05$) segundo o grupo de melanoma, sendo de ($R=0,623$) nos melanomas primários e apenas ($R= -0,003$) nas metástases (Figura 37D).



Legenda: Pares de genes *KLK7* x *LAMA3* (A); *KLK7* x *EVPL* (B); *KLK7* x *BNC* (C) e *KLK7* x *SCEL* (D) em melanomas primários (círculos fechados) e metastáticos (quadrados abertos).

Figura 37 – Mudanças na correlação entre pares de genes do módulo funcional desenvolvimento da epiderme.

Atividade de peptidase

Na rede atividade de peptidase (Figura 32), destacamos a correlação entre *KLK6* (*Kallikrein-6 precursor*) x *KLK13* (*Kallikrein-13 precursor*). Houve uma significativa quebra de correlação ($p \leq 0,005$) entre estas kaliceínas, sendo de ($R=0,944$) nos melanomas primários e de apenas ($R=-0,086$) nos metastáticos (Figura 38).

Há uma significativa diferença entre as medianas da intensidade de expressão relativa à amostra referência de *KLK6* e *KLK13* entre os grupos de melanomas, respectivamente, $p=0,0115$ e $p=0,0004$ (Figura 15).

KLK6 e *KLK13* contribuíram significativamente ($p < 0,001$) para a classificação módulo funcional atividade de peptidase segundo o grupo de melanoma (Tabela 1). Além disso, tanto *KLK6* quanto *KLK13* parecem ser mais expressos em melanomas mais finos ($\leq 1,0$ mm), conforme disposto na Figura 15.

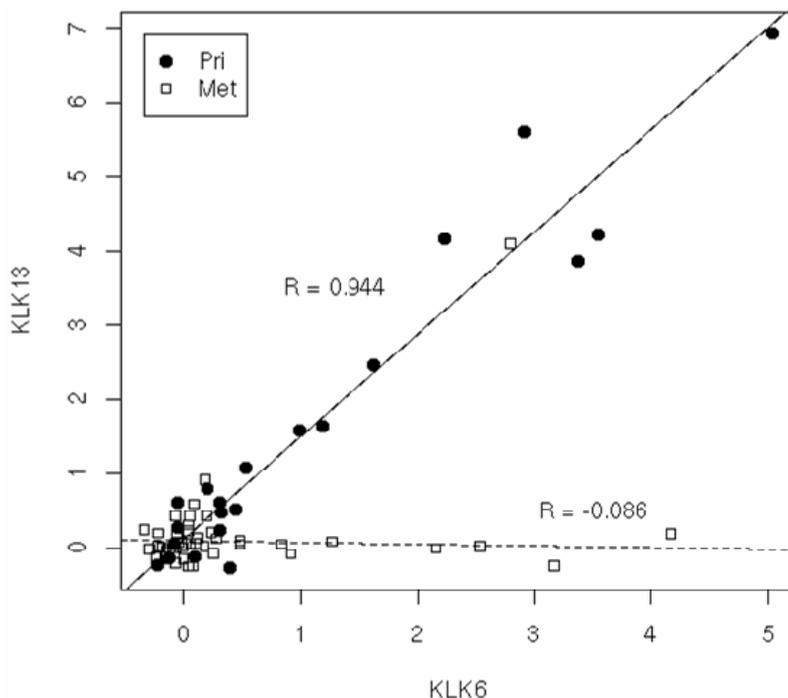


Figura 38 – Mudanças na correlação entre *KLK6* x *KLK13* em melanomas primários (círculos fechados) e melanomas metastáticos (quadrados abertos).

Comunicação celular

Na rede comunicação celular (Figura 33), *COL3A1* (*Collagen, type III, alpha 1*) e *COL6A3* (*Collagen, type VI, alpha 3*) mostraram-se correlacionados cuja diferença entre as amostras de melanomas primários ($R=0,910$) e metastáticos ($R=0,491$) foi significativa ($p \leq 0,005$), Figura 39.

Quando comparamos as medianas da intensidade de expressão relativa à amostra referência dos níveis de mRNA de *COL3A1* e *COL6A3* entre os grupos de melanomas, vemos que ambos foram significativamente induzidos nos melanomas primários, respectivamente, $p=0,0049$ e $p=0,0019$. Este dado corrobora com o observado por HAQQ et al. em 2005, onde ambos *COL3A1* e

COL6A3 mostraram-se significativamente suprimidos em melanomas metastáticos.

COL3A1 foi o gene que mais contribuiu (escore 30,9 $p < 0,00001$) para a classificação do módulo funcional comunicação celular segundo o grupo de melanoma (Tabela 1). Além disso, parece ser mais expresso em melanomas finos (Figura 19).

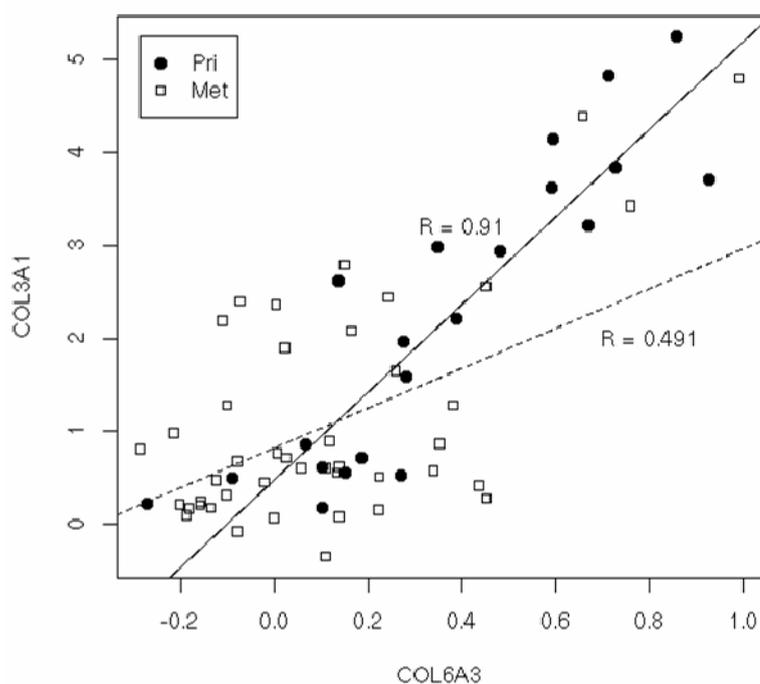


Figura 39 – Mudanças na correlação entre *COL3A1* x *COL6A3* em melanomas primários (círculos fechados) e melanomas metastáticos (quadrados abertos).

Adesão celular

Através da análise da rede adesão celular (Figura 34), conseguimos identificar alguns genes que parecem estar envolvidos no processo de invasão, modulando sinais transduccionais via adesão celular (Quadro 7). Dentre eles, temos os genes *GPR56* (*G protein-coupled receptor 56*) e *POSTN* (*Periostin precursor*) cuja diferença de correlação entre os melanomas primários ($R = -0,612$) e as metástases ($R = 0,215$) foi significativa ($p \leq 0,005$) – Figura 40.

GPR56 e *POSTN* contribuíram significativamente ($p < 0,00001$) para a inativação do módulo funcional adesão celular em melanomas metastáticos (Tabela 1).

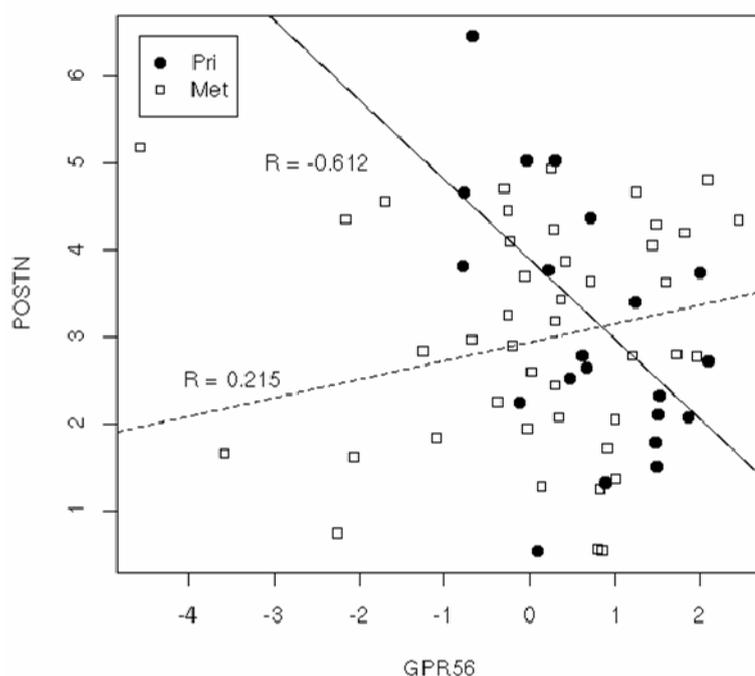


Figura 40 – Mudanças na correlação entre *POSTN* x *GPR56* em melanomas primários (círculos fechados) e melanomas metastáticos (quadrados abertos).

Assinatura metastática

Para a rede assinatura metastática, destacamos o par *LUM* (*Lumican precursor*) e *COL6A3* (Figura 36) cuja diferença entre os melanomas primários ($R=0,851$) e metastáticos ($R=0,333$) foi significativa ($p\leq 0,005$) – Figura 41.

LUM foi o gene que mais contribuiu (escore 37,7 $p<0,0001$) para a inativação do módulo funcional assinatura metastática em melanomas metastáticos (Tabela 1).

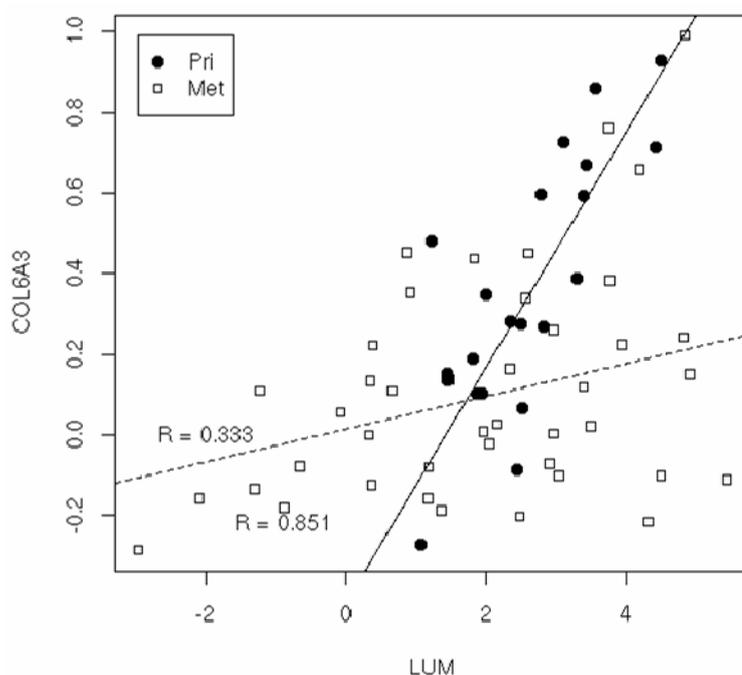


Figura 41 – Mudanças na correlação entre *COL6A3* x *LUM* em melanomas primários (círculos fechados) e melanomas metastáticos (quadrados abertos).

Ainda nesta rede vemos, também, uma significativa quebra de correlação ($p\leq 0,05$) entre *IGFBP4* (*Insulin-like growth factor-binding protein 4*) e *IGF2* (*Insulin-like growth factor-2*), sendo de ($R=0,527$) nos melanomas primários e apenas ($R= -0,032$) nos metastáticos (Figura 42).

IGFBP4 está entre os genes que mais contribuíram (escore 16,3 $p=0,023$) para a inativação do módulo funcional assinatura metastática em melanomas metastáticos (Tabela 1).

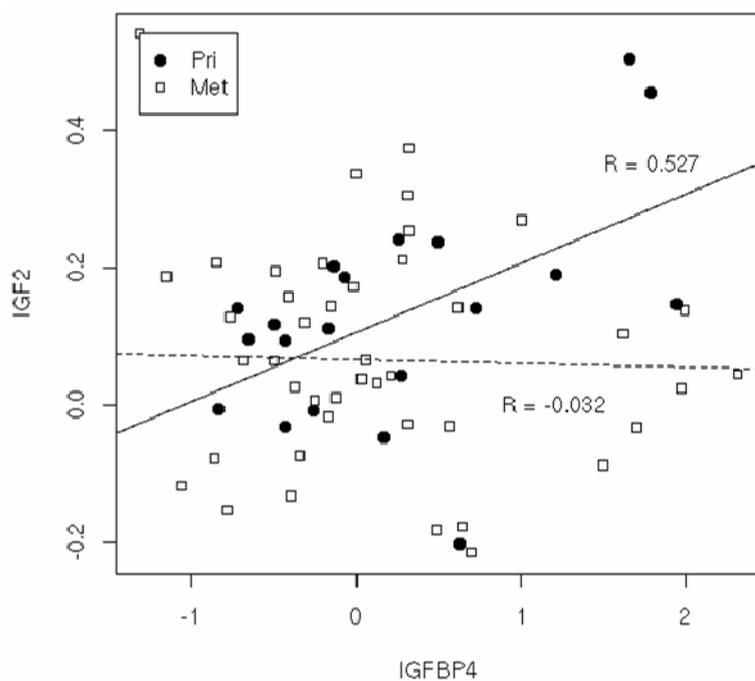


Figura 42 – Mudanças na correlação entre *IGF2* x *IGFBP4* em melanomas primários (círculos fechados) e melanomas metastáticos (quadrados abertos).

5.3.3 Validação dos dados de expressão gênica

A fim de se validar o dado de expressão gênica, utilizamos ensaios de imuno-histoquímica em cortes convencionais de material parafinado ou em *Tissue Microarray (TMA)*.

Dentre os genes descritos anteriormente, decidimos por validar desmocolina-3, galectina-3 e kaliceína-7.

Desmocolina-3

Desmocolina-3 (*DSC3*) foi um dos genes que contribuiu expressivamente ($p < 0,0001$) para a inativação dos módulos funcionais comunicação celular e adesão celular nos melanomas metastáticos (Tabela 1), sendo significativamente mais expresso em melanomas mais finos ($\leq 1,0$ mm), $p = 0,0381$ (Figura 23).

A fim de se entender melhor o padrão de expressão de *DSC3* na progressão melanocítica, analisamos a sua expressão em amostras de melanomas cutâneos, através de reações de *RT-PCR*. Estes dados foram gerados por Nair Muto, em sua tese de doutorado que, utilizando a mesma abordagem experimental, detectou alteração dos níveis de expressão de *DSC3* entre nevos e melanomas primários.

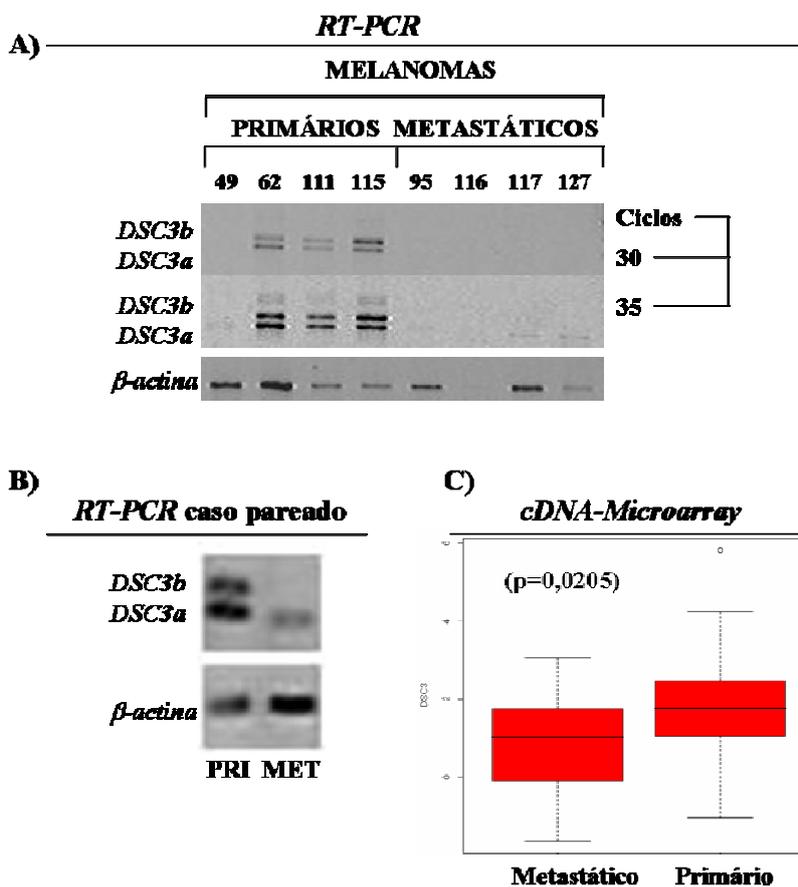
Para validar, então, esta expressão diferencial de *DSC3*, usamos quatro amostras de cada condição biológica - melanoma cutâneo primário e metastático. Mostramos que há expressão das isoformas *DSC3a* e *b* nos melanomas primários, embora um caso de melanoma primário (49) tenha apresentado menor expressão (Figura 43A).

Quanto aos metastáticos, há expressão reduzida somente da isoforma *DSC3a* quando comparada aos primários (Figura 43A). Esta diferença corrobora com a observada na análise por *cDNA microarray* (Figura 43C).

O real significado dos dados ainda requer novos experimentos, pois sendo desmocolina-3 um marcador de queratinócitos, temos que considerar a possibilidade de contaminação das amostras de nevo e melanomas por estas células. No entanto, o fato de termos nossas amostras dissecadas visando enriquecimento das células tumorais ($\geq 60\%$), além do fato de que apenas uma

isoforma foi detectada na amostra referente à metástase, a hipótese de contaminação se torna menos provável.

Quanto à validação de sua expressão protéica por imuno-histoquímica, não conseguimos avaliar sua imunoreatividade adequadamente, uma vez que houve positividade inespecífica em células de infiltrado inflamatório e células endoteliais. Isto indica que precisamos otimizar melhor nossas reações, ou ainda, usar um anticorpo mais específico.



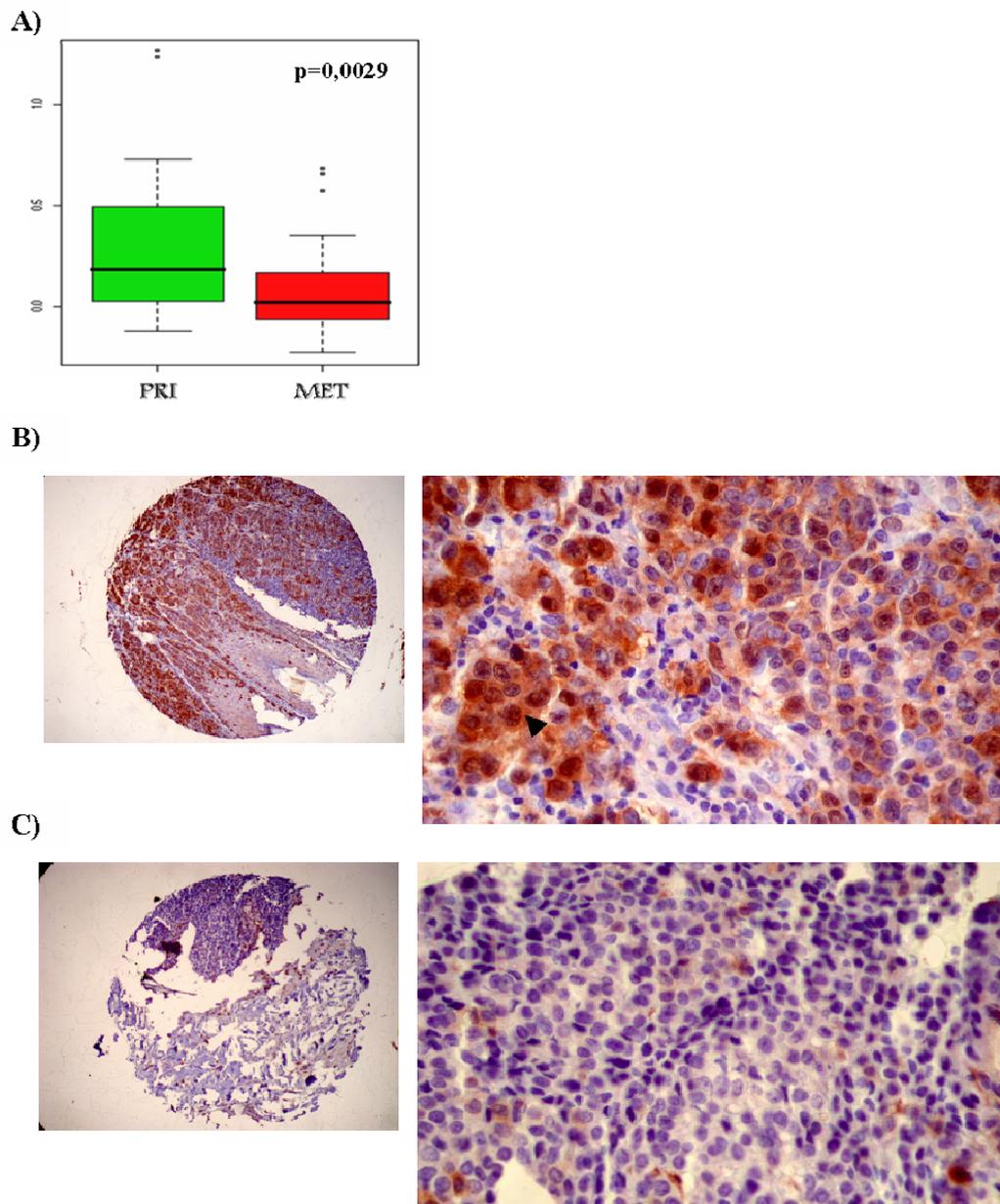
Legenda: Análise da expressão de *DSC3* por RT-PCR (30 e 35 ciclos) em melanomas primários e metastáticos (A); por RT-PCR (35 ciclos) em um caso pareado de melanoma cutâneo PRI (IM 62) e MET (IM 70) (B) e, por *cDNA microarray* entre melanomas primários e metastáticos (C).

Figura 43 – Expressão das isoformas a e b de *DSC3* em melanomas cutâneos primários e metastáticos.

Galectina-3

Pelo fato de *LGALS3* (*Galectin 3*) ter sido significativamente mais expresso em melanomas primários ($p=0,0029$) e pela importância do seu papel no processo de adesão celular, e ainda, a sua interação com beta-catenina (KRZESLAK e LIPINSKA 2004; SHIMURA et al. 2004; SHIMURA et al. 2005), resolvemos avaliar o seu padrão de expressão citoplasmática e nuclear por imunohistoquímica, usando-se *TMA* (Figura 44).

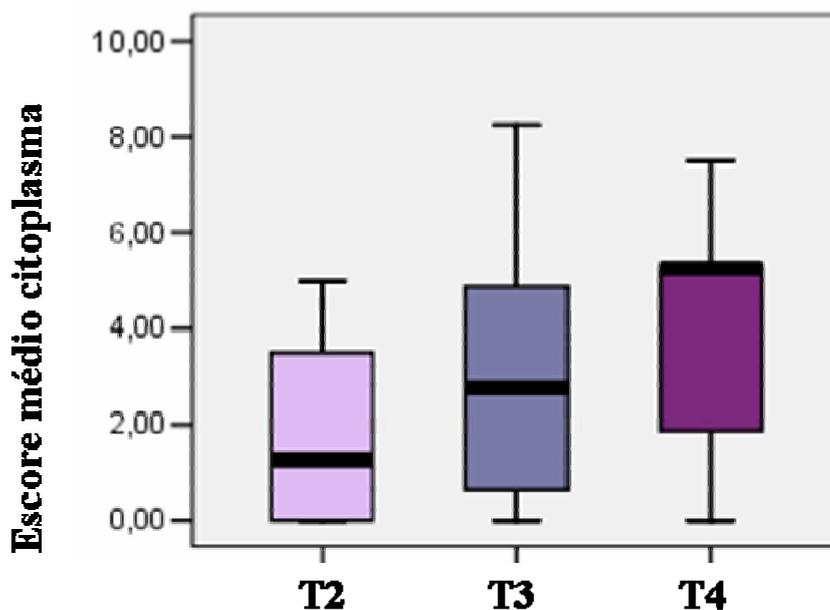
Após a análise de sua marcação citoplasmática e nuclear, vimos que galectina-3 apresentou maior expressão nuclear em melanomas primários em relação aos metastáticos, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa ($p=0,052$). De fato, a frequência de imunoreatividade positiva de galectina-3 nuclear para os melanomas primários foi de 47,5% e de 27,6% para os metastáticos. Em relação à espessura, 68,8% dos melanomas T4 (>4,0 mm) apresentavam positividade para galectina-3 nuclear, contra, respectivamente, 45,5% e 34,8% dos melanomas T2 (1,01 - 2,0 mm) e T3 (2,01 - 4,0 mm). Todavia, estas diferenças não estavam significativamente correlacionadas ao índice de Breslow.



Legenda: Expressão diferencial de galectina-3 em melanomas primários (PRI) e metastáticos (MET) por *cDNA microarray* (A). Em destaque à direita *TMA* (400X), representamos imunoreatividade de galectina-3 em melanoma primário (B), apresentando marcação nuclear e citoplasmática positiva (em destaque) e, em melanoma metastático (C), apresentando marcação nuclear e citoplasmática negativa.

Figura 44 - Análise da expressão gênica e protéica de galectina-3 em melanomas cutâneos.

Quando determinamos os níveis citoplasmáticos de galectina-3, observamos uma correlação significativa ($p=0,002$) entre o escore médio de galectina-3 e a espessura dos melanomas primários, conforme podemos observar na Figura 45.



Legenda: Este gráfico mostra uma correlação significativa entre o escore médio citoplasma e índice de Breslow (em mm), segundo o teste de *Spearman* ($p=0,002$).

Figura 45 - Escore médio da marcação citoplasmática de galectina-3 em melanomas cutâneos primários e metastáticos.

E ainda, segundo o teste χ^2 vimos que a imunoreatividade de galectina-3 citoplasmática apresentou significativa associação com o índice de Breslow ($p=0,007$), conforme disposto na Tabela 2.

Tabela 2 – Associação da imunoreatividade citoplasmática de galectina-3 e o índice de Breslow.

| Variável | Pacientes | Número de pacientes (%) | | p-valor |
|--------------------|-----------|-------------------------|----------------------|---------|
| | | Galectina-3 negativa | Galectina-3 positiva | |
| Índice de Breslow | | | | |
| T2 (1,01 - 2,0 mm) | 22 | 19 (86,4) | 3 (13,6) | 0,007 |
| T3 (2,01 - 4,0 mm) | 23 | 15 (65,2) | 8 (34,8) | |
| T4 (> 4,0 mm) | 16 | 6 (37,5) | 10 (62,5) | |

Apesar da expressão citoplasmática de galectina-3 em melanomas primários de 1,01 - 2,0 mm não ter sido muito freqüente (13,6%), sua marcação nuclear foi mais expressiva (45,5%). Para os demais melanomas (2,01 - 4,0 mm e > 4,0 mm) não houve diferença quanto ao tipo de expressão de galectina-3, se nuclear ou citoplasmática.

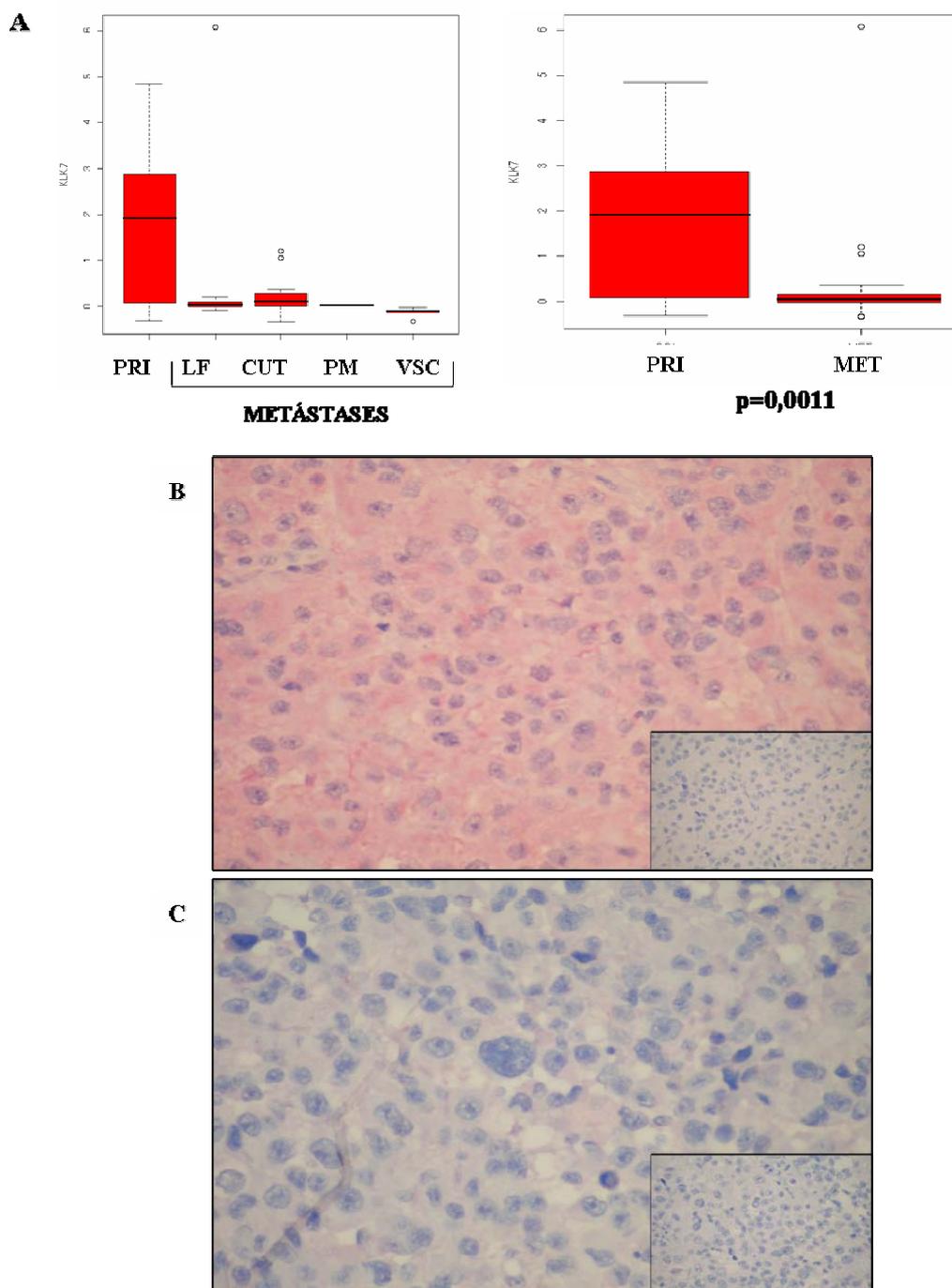
Quanto à expressão de galectina-3 em nevos melanocíticos, obtivemos apenas imunoreatividade positiva nuclear, sendo freqüente em cerca de 60% dos casos. No entanto, quando comparamos as medianas dos escores médios entre os melanomas e os nevos melanocíticos, vimos que não houve diferença significativa.

Kallicreína-7

Os níveis de expressão protéica de kallicreína- 7 em melanomas primários e metastáticos foram determinados por imuno-histoquímica (Figura 46).

As análises realizadas com amostras individuais (Figura 46), que estão de acordo com (WINNEPENNINCKX et al. 2006), estimularam-nos a determinar os níveis de expressão de kallicreína-7 em um conjunto maior de amostras – 12 melanomas primários e 08 metastáticos. Nesta análise, kallicreína-7 apresentou maior expressão em melanomas primários em relação aos metastáticos, cuja diferença, segundo o teste de *Mann-Whitney*, foi significativa ($p=0,030$). Este resultado corrobora com o observado por *cDNA microarray* (Figura 46).

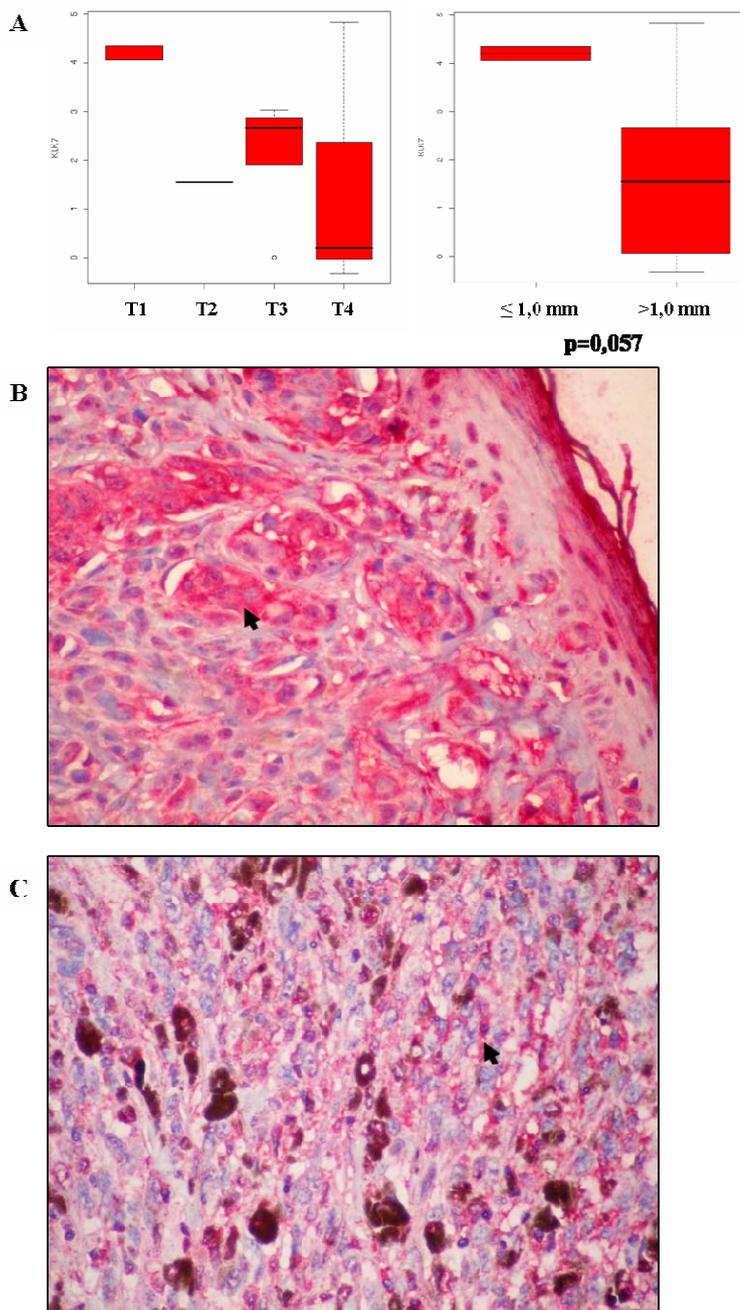
Embora não tenha sido estatisticamente significativa a diferença de expressão de kallicreína-7, segundo a espessura do melanoma, observamos que 70% dos melanomas ($>1,0$ mm) apresentavam positividade para kallicreína-7, contra 83,3% dos melanomas ($\leq 1,0$ mm). Esta mesma tendência foi observada na análise de expressão diferencial segundo o índice de Breslow, embora sem significância estatística ($p=0,057$) (Figura 47).



Legenda: Gráfico *box-plot* gerado com base na intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) de *KLK7*, segundo o grupo de melanoma (A). Imunoreatividade citoplasmática positiva de *KLK7* em melanoma cutâneo primário (B) e negativa em metastático (C). À direita controle negativo (BSA). Aumento 400X.

Metástases - LF: Linfonodal; CUT: Cutânea; PM: Pulmonar; e VSC: visceral.

Figura 46 – Expressão gênica e protéica de kaliceína-7 em melanomas cutâneos.



Legenda: Gráfico *box-plot* gerado com base na intensidade de expressão relativa à amostra referência (\log_2) de *KLK7*, segundo o índice de Breslow (A). Imunoreatividade citoplasmática positiva de *KLK7* (em destaque) em melanomas cutâneos primários $\leq 1,0$ mm (B) e $> 4,0$ mm (C). Aumento 400X.

Índice de Breslow - T1: $< 1,0$ mm; T2: 1,01-2,0 mm; T3: 2,01-4,0 mm; T4: $> 4,0$ mm.

Figura 47 – Expressão gênica e protéica de kaliceína-7 em melanomas cutâneos, segundo o índice de Breslow.

6 DISCUSSÃO

6.1 AMOSTRAS DE MELANOMA

Segundo dados da literatura, o melanoma cutâneo apresenta maior prevalência em indivíduos jovens (62% <65 anos), de pele clara, do sexo masculino, sendo mais comum em peles fotossensíveis tipo I e II, e indivíduos de olhos e cabelos claros (RIES et al. 2002; RAGER et al. 2005).

A idade mediana dos nossos pacientes está em concordância ao esperado, sendo de 57,4 anos (RAGER et al. 2005). No entanto, quanto ao tipo de pele (I e II) e cor de olhos e cabelos foram discordantes. Isto se deve provavelmente à divergência étnica entre a população caucasóide avaliada e a nossa. Além disso, ao contrário do demonstrado pela literatura, a frequência entre homens e mulheres mostrou-se muito próxima.

Como discutido por CHUDNOVSKY et al. (2005), o melanoma extensivo superficial constitui o subtipo mais comum (70%) seguido do nodular (15 a 30%) e do acral lentiginoso (5% em brancos; 30 a 70% em negros) (CHUDNOVSKY et al. 2005). A partir destes dados, vemos que a frequência observada em nossa casuística concorda com os da literatura.

Em nosso estudo, as metástases não-viscerais foram as mais frequentes, em concordância ao esperado.

Mesmo com o limite da técnica de dissecação manual em trabalhar com melanomas finos, conseguimos ao final uma amostragem consideravelmente

homogênea onde, respectivamente, 42,9% e 57,1% dos melanomas primários eram T1-3 ($< 4,0$ mm) e T4 ($\geq 4,0$ mm).

Se considerarmos todos os melanomas, independente do grupo de melanoma, se primário ou metastático, cerca de 50% das amostras apresentava doença em estadio clínico avançado.

Vale ressaltar que o perfil de expressão gênica identificado nestes melanomas cutâneos foi analisado segundo o seu comportamento clínico-patológico na tese de doutorado de Otávio Machado (2007).

6.2 QUALIDADE DOS DADOS

As nossas lâminas por não apresentarem variações sistemáticas espaciais não necessitaram de normalizações locais do tipo *within-tip-group*, ou ainda, do tipo *scale* (YANG et al. 2002).

Apesar de termos detectado uma distribuição não-linear para alguns elementos conseguimos corrigir com sucesso este desvio através da normalização não-linear por LOWESS.

6.3 MÓDULOS FUNCIONAIS E REDES DE RELEVÂNCIA

6.3.1 A importância das kalicreínas na progressão dos melanomas

Assim como para a autonomia do crescimento celular, a capacidade de sobrevivência celular, migração e escape à apoptose estão relacionadas às

alterações da sinalização extracelular, e ainda, às alterações da transdução de sinal transcelular e intracelular (HANAHAN e WEINBERG 2000).

Para os melanomas cutâneos, destacam-se neste cenário os sinais provindos da interação com os queratinócitos.

A partir do estudo da variação no estado de ativação dos módulos funcionais entre melanomas primários e metastáticos, vimos que o módulo desenvolvimento da epiderme representa uma ferramenta útil para o estudo dos mecanismos de escape que as células de melanoma desenvolvem em relação aos sinais antiproliferativos mediados pela interação com os queratinócitos.

De fato, ao avaliarmos esta rede de relevância, deparamos com um fato interessante, a rede de correlações se faz entre genes cuja função se associa à diferenciação e descamação dos queratinócitos, e ainda, adesão celular. Dentre estes, destaca-se *KLK7* que se correlaciona à quase todos os componentes desta rede - *KLK7* x *LAMA3*, *KLK7* x *EVPL*, *KLK7* x *BNC*, e *KLK7* x *SCEL*.

KLK7 codifica para a protease *KLK7* ou *SCCE* (*Stratum corneum chymotryptic enzyme*) (HANSSON et al. 1994) membro da família das kaliceínas (YOUSEF et al. 2000; DIAMANDIS et al. 2000), um subgrupo de serina-proteases consideradas como potenciais biomarcadores para prognóstico e, ou diagnóstico de alguns cânceres humanos, como o de ovário (KYRIAKOPOULOU et al. 2003; YOUSEF et al. 2003).

KLK7 foi primeiramente identificada como uma quimotripsina-*like* proteinase por LUNDSTROM e EGELRUD em 1991, estando envolvida no processo de descamação da camada córnea da epiderme (LUNDSTROM e EGELRUD 1991; EGELRUD 1993; EK HOLM et al. 2000), onde uma vez

secretada pelos queratinócitos da camada granular parece clivar componentes de corneodesmosomas – desmogleína-1 (*DSG1*), desmocolina-1 (*DSCI*) e corneodesmosina (*CDSN*) (CAUBET et al. 2004).

A ação proteolítica de KLK7, conforme ensaios *in vitro*, é dependente de pH cuja atividade é controlada ou por ativação mediada pela serina-protease KLK5 (BRATTSAND et al. 2005), ou por inibição mediada por SLPI (*Secretory Leukocyte Protease Inhibitor*) (FRANZKE et al. 1996); por SKALP (*Skin-derived Antileukoproteinase*); e ainda, por A2ML1 (*α 2-macroglobulin like-1*) (GALLIANO et al. 2006).

Além de participar na manutenção da homeostase da epiderme, KLK7 parece desempenhar um importante papel no processo de invasão das células de melanoma, correlacionando-se, por exemplo, com o índice de Breslow, conforme o demonstrado por WINNEPENNINCKX e colaboradores em 2006. A partir da análise de sua expressão diferencial segundo o grupo de melanoma, demonstramos sua maior expressão em melanomas primários, sendo mais intensa naqueles com espessura $\leq 1,0$ mm.

Além disso, vimos em nossas análises que KLK7 apresentou em melanomas primários uma significativa correlação positiva com *EVPL* e *SCEL*, os quais codificam componentes do envelope corneificado presentes em queratinócitos da camada córnea da epiderme, respectivamente, envoplaquina e cielina. O envelope corneificado é formado durante o estágio terminal do processo de diferenciação dos queratinócitos (ECKERT e RORKE 1989). À medida que os queratinócitos se diferenciam e migram para a camada córnea há um aumento do fluxo de cálcio e outros íons (GREEN 1979) que induz à ativação da

queratinócito-específica transglutaminase responsável pela catálise da formação do envelope (RICE e GREEN 1979; THACKER e RICE 1985).

Há dados na literatura que suportam o envolvimento de *KLK7* na formação e *turnover* dos queratinócitos corneificados (SONDELL et al. 1996; EKHOLM et al. 2000).

Vale ressaltar também a correlação entre *KLK7* e o fator de transcrição *BNC* (*basonuclin-1*) cuja função se relaciona à diferenciação de queratinócitos (REBHAN et al. 1997).

Além de *KLK7*, destacamos também *KLK6* (*Kallikrein-6 precursor*), *KLK8* (*Kallikrein 8, neuropsin/ovasin*) e *KLK13* (*Kallikrein-13 precursor*) que codificam serina-proteases pertencentes à família das kaliceínas (DIAMANDIS et al. 2000). *KLK6*, *KLK8* e *KLK13*, assim como *KLK7*, estão localizados em uma mesma região do braço longo do cromossomo 19q 13.3-13.4 (YOUSEF et al. 2000).

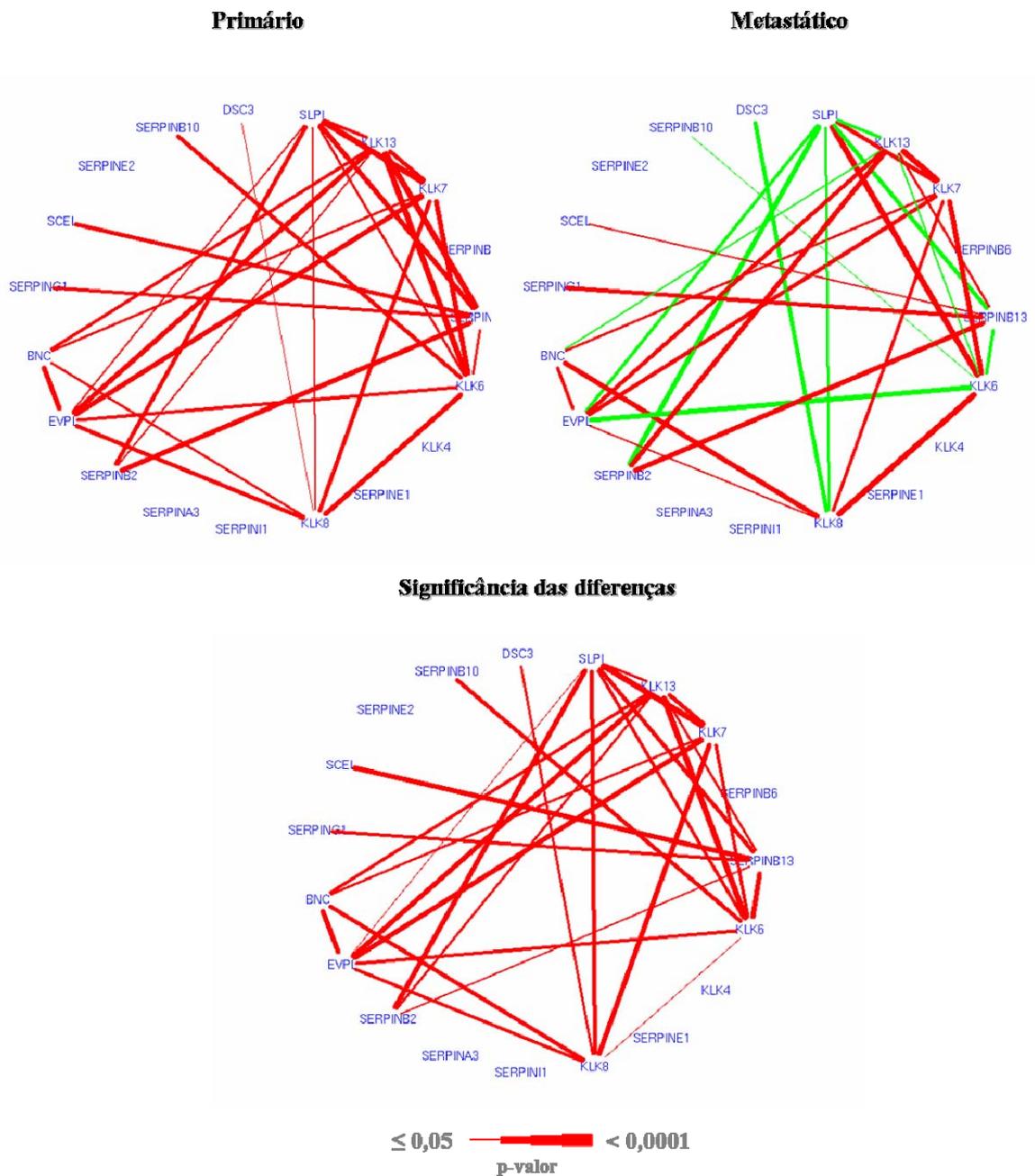
Tanto *KLK6* quanto *KLK13* parecem estar envolvidos na carcinogênese de alguns cânceres humanos (REBHAN et al. 1997), além de desempenhar um papel semelhante ao de *KLK7* no processo de descamação dos queratinócitos (BORGONHO et al. 2006). O mesmo foi sugerido para a *KLK8*.

A partir destas informações biológicas, construímos uma rede de relevância específica para o processo de descamação da epiderme, além daqueles relacionados ao desenvolvimento da epiderme (Figura 48).

Vemos nesta rede que além de *KLK7* outras kaliceínas (*KLK6*, 8 e 13) apresentaram correlação positiva nos melanomas primários com o componente do envelope corneificado (*SCEL*), e ainda com *KLK7* e *BNC*. A partir deste

resultado, sugerimos que estas kalicreínas desempenhem um importante papel no processo de invasão das células de melanoma primário, sinalizando tanto para a transposição da lâmina basal quanto na migração intra-epidérmica, conforme proposto na Figura 49.

Todavia, para melanomas metastáticos, estas serina-proteases parecem não exercer nenhuma função, conforme vimos em nossos dados de expressão gênica.



Legenda: Representamos os pares de genes cuja alteração na correlação entre os melanomas primários e metastáticos foi significativa (p -valor $\leq 0,005$). Correlação positiva está representada por linhas vermelhas, e correlação negativa por linhas verdes. A espessura do traçado da linha correlaciona-se diretamente com a significância das diferenças.

Figura 48 – Rede de relevância baseada no processo de descamação da epiderme.

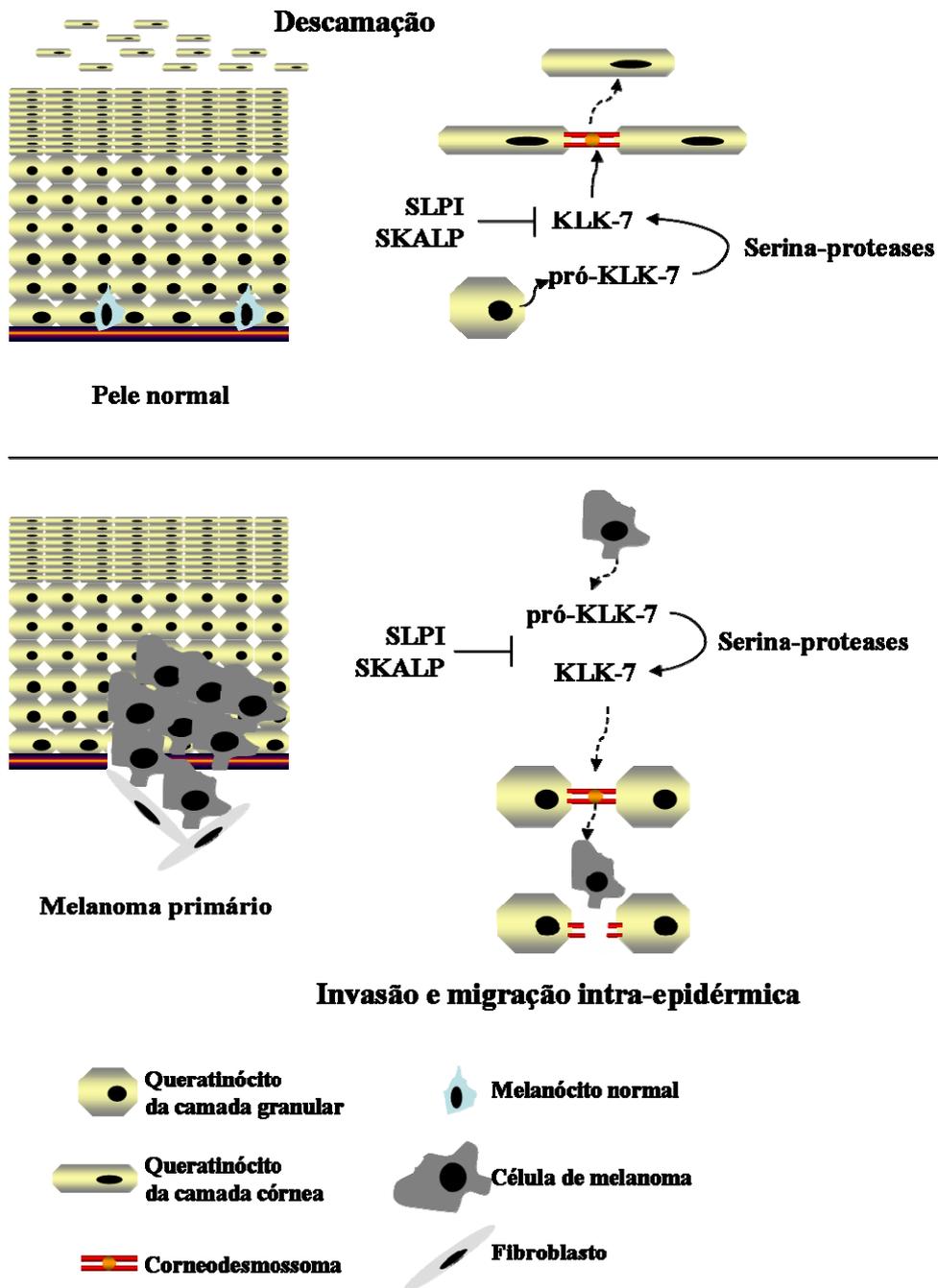


Figura 49 – Papel de KLK7 na descamação da epiderme e, invasão e migração das células de melanoma primário.

6.3.2 Comunicação e adesão celular nos melanomas humanos

Durante a transformação maligna dos melanócitos ocorrem alterações nas comunicações intercelulares que conferem às células de melanoma habilidade de migrar para sítios à distância ou locoregionais (LI et al. 2002, 2003). Dentre estas alterações destacamos aquelas mediadas por componentes de matriz extracelular e por moléculas de adesão celular.

A partir da rede comunicação celular, mostramos algumas correlações de expressão entre genes que estão envolvidos no processo de invasão, assim como no controle da homeostase celular modulada pela interação célula-célula e célula-matriz. Dentre eles, destacamos os genes *COL3A1* e *COL6A3*.

COL3A1 que codifica para a unidade alfa 1 do colágeno tipo III mostrou uma significativa alteração em sua correlação com a unidade alfa 3 do colágeno tipo VI (*COL6A3*) segundo o tipo de melanoma.

A diminuição da expressão de ambos os colágenos (III e VI) em melanomas metastáticos já foi demonstrada em outro estudo de expressão gênica (HAQQ et al. 2005), mas a correlação deste perfil segundo o grupo de melanoma é inédita. Vale ressaltar que a sua expressão também se correlaciona com a de outros genes, o que contribui bastante para o melhor entendimento do seu papel no processo de invasão dos melanomas humanos.

A partir da rede de relevância adesão celular, vemos que a expressão de *GPR56* e *POSTN* mostrou-se negativamente correlacionada em melanomas primários.

GPR56 codifica para o receptor GPR56 (*G protein-coupled receptor 56*) que parece modular interação célula-célula (REBHAN et al. 1997), sendo muito

expresso em gliomas (SHASHIDHAR et al. 2005) e câncer de esôfago (SUD et al. 2006).

Em linhagens de melanoma, XU et al. (2006), mostraram que a expressão de *GPR56* contribuía para a supressão de metástase em pulmão e proliferação tumoral ao se ligar a transglutaminase (TG) 2 (XU et al. 2006). Interessantemente, vimos uma menor expressão de *GPR56* em metástase pulmonar de melanoma cutâneo (Figura 21). Apesar desta análise de expressão gênica partir somente de um único caso, este resultado corrobora com o proposto por XU et al. em 2006, onde havendo uma menor expressão de *GPR56* há um significativo aumento ($p=0,012$) no número de metástases pulmonares.

POSTN codifica para periostina que parece modular motilidade celular em carcinoma de ovário ao se ligar às integrinas $\alpha v\beta-3$ e $\alpha v\beta-5$ (GILLAN et al. 2002). Além disso, promove angiogênese em tumores de mama via super-regulação do VEGF-R2 (SHAO et al. 2004); e ainda sobrevivência em câncer de cólon pela ativação da via AKT ao se ligar à integrina $\alpha v\beta 3$ (BAO et al. 2004).

Baseando-se em dados da literatura e em nossos resultados podemos inferir que células de melanoma que mostram expressão de *POSTN* e *GPR56* negativamente correlacionada apresentem um fenótipo mais agressivo. Isto por que expressam, em \log_2 , mais *POSTN* (2 a 6 vezes) e menos *GPR56* (-1 a -4 vezes) em relação à amostra referência. E o fato de expressar menos *GPR56* possa predizer metástase pulmonar.

6.3.3 Assinatura metastática

Segundo a literatura, o processo metastático está correlacionado a fatores mecânicos (capacidade de intravasão e extravasão das células neoplásicas ao longo dos capilares e vênulas); à capacidade de sobrevivência destes tumores na circulação hematogênica ou linfática; ao tipo de invasão (hematogênica ou linfática); aos aspectos moleculares referidos como “assinatura metastática”; e ainda aos fatores de compatibilidade biológica *seed-soil* (CHAMBERS et al. 2002; RAMASWAMY et al. 2003).

Um dos fatores que preconiza um prognóstico ruim para o melanoma é a sua incrível capacidade metastática. Muitos trabalhos têm demonstrado perfis de expressão gênica diferenciais em melanomas metastáticos (STADELMANN et al. 1998; BITTNER et al. 2000; WEERARATNA et al. 2002; DE WIT et al. 2002; CLARK et al. 2001; CARR et al. 2003; NAMBIAR et al. 2004; HAQQ et al. 2005). No entanto, por seguirem o conceito de análise dos dados baseada em hipóteses, pouca informação quanto ao aspecto biológico e funcional foi provida.

Para identificarmos correlações entre pares de genes até, então, não associados ao fenótipo metastático, analisamos hipóteses baseadas em dados, usando-se justamente uma lista de genes cujos perfis diferenciais já tenham sido mostrados em melanomas humanos.

A partir desta abordagem, conseguimos mostrar mudanças de correlação entre pares de genes cuja função gênica associa-se à habilidade de invasão (*LUM* e *COL6A3*), sobrevivência celular e escape à apoptose (*IGF2* e *IGFBP4*).

LUM codifica para o proteoglicano *lumican* (*Keratan sulfate proteoglycan lumican*) que atuando na formação de fibrilas de colágeno (REBHAN et al. 1997)

pode contribuir na modulação de sinais célula-matriz entre células de melanoma e o componente de matriz colágeno tipo VI (COL6A3).

Na rede de assinatura metastática observamos, também, correlação positiva na expressão entre IGF2 e seu potencial antagonista IGFBP4 nos melanomas primários, sendo perdida nos melanomas metastáticos.

O mecanismo modulado pelo *insulin-like growth factor* (IGF) consiste de dois peptídeos (IGF1 e 2), dois receptores principais (IGF1R e 2R), seis diferentes *IGF binding proteins* (IGFBP1-6) e quatro *IGFBP related peptides* (IGFBP Rp 1-4). Este sistema IGF medeia proliferação celular, apoptose, transformação e diferenciação de forma parácrina, endócrina e autócrina em alguns cânceres humanos, principalmente em tumores de próstata, mama e cólon, como revisado por DURAI et al. 2006.

Como revisto por OESTERREICHERT et al. (2005) e DURAI et al. (2006), a maioria dos IGFBPs inibe o crescimento celular induzido pelos IGFs por diminuir sua biodisponibilidade. Contudo, alguns IGFBPs estimulam, também, proliferação presumidamente via ligação aos seus receptores, sendo sua atividade controlada por proteinases.

Como a proteólise limitada de IGFBPs parece ser o principal mecanismo para a biodisponibilidade de IGFs (OESTERREICHERT et al. 2005), é de se esperar que tanto as serina-proteases (KLKs e MMPs) quanto suas enzimas reguladoras desempenhem um importante papel neste processo.

De fato, há dados na literatura que suportam o papel das kalicreínas, tais como KLK2 e KLK3, na degradação de IGFBP4 (RÉHAULT et al. 2001). Já a

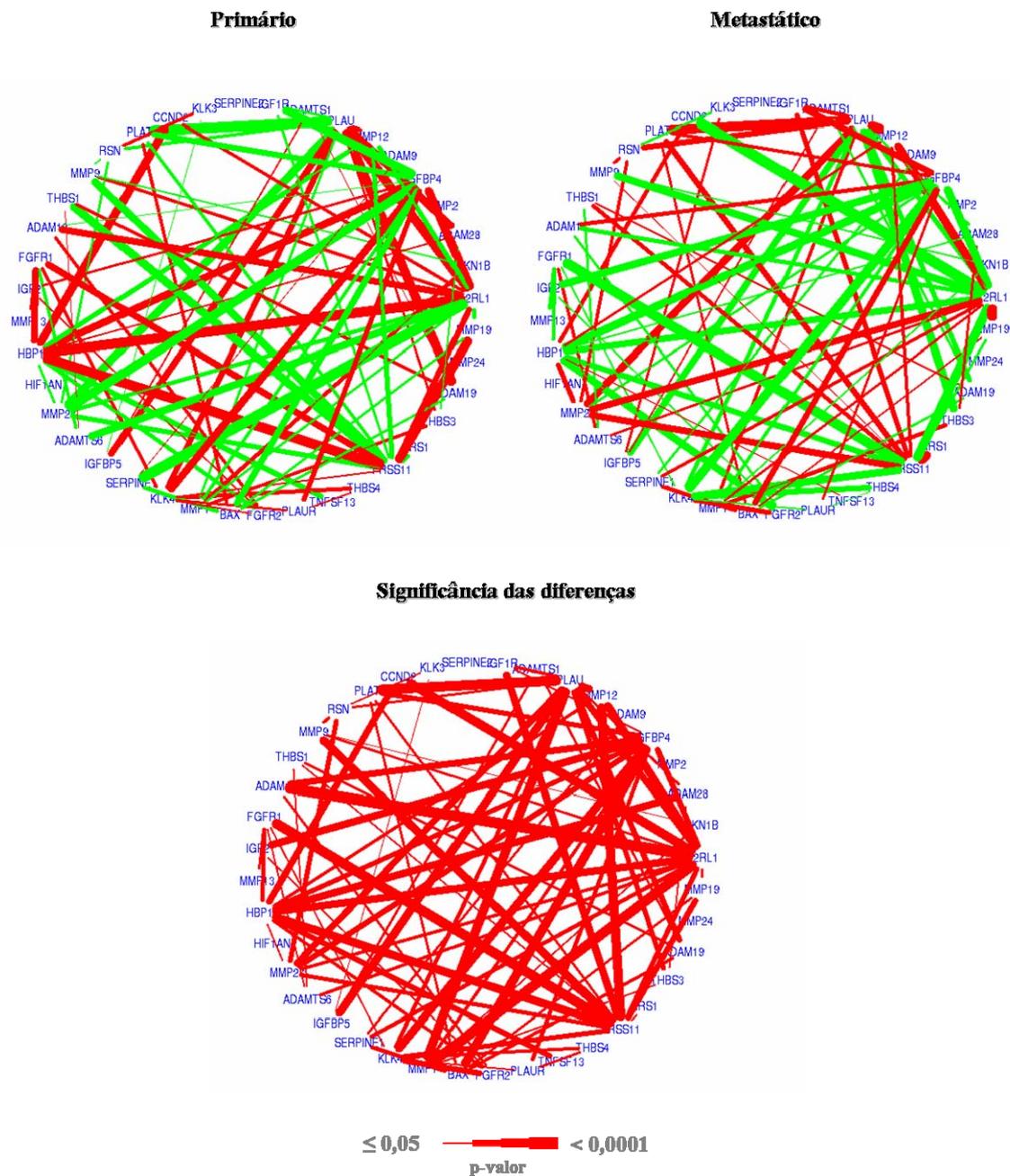
ativação de KLK3 é promovida pela KLK4 em tumores de próstata (MATSUMURA et al. 2005)

Embora não haja dados na literatura que comprovem a inibição de IGFBP4 pelas MMPs, há aqueles que demonstram o seu papel (MMP3, 7, 9 e 19) na degradação de outros membros da família IGFBPs (IGFBP1 e 3) (SADOWSKI et al. 2003; COPPOCK et al. 2004; MIYAMOTO et al. 2004; NAKAMURA et al. 2005).

No entanto, há ainda mecanismos regulatórios ajuzantes à inibição de IGFBPs (IGFBP4 e 5), onde componentes de matriz extracelular, como por exemplo, heparina e outros glicosaminoglicanos desempenham um papel importante ao inibir as serina-proteases responsáveis pela degradação de IGFBPs (ARAI et al. 1994; FOWLKES et al. 1997).

Baseando-se nestas informações construímos uma rede de relevância constituída por genes que possam estar potencialmente relacionados ao sistema IGF (Figura 50).

A partir dos dados de correlação demonstrados nesta rede, sugerimos que o mecanismo regulatório IGF possa ser importante para a progressão dos melanomas humanos, assim como demonstrado para vários outros tipos de tumores humanos (DURAI et al. 2006).



Legenda: Representamos os pares de genes cuja alteração na correlação entre os melanomas primários e metastáticos foi significativa (p -valor $\leq 0,05$). Correlação positiva está representada por linhas vermelhas, e correlação negativa por linhas verdes. A espessura do traçado da linha correlaciona-se diretamente com a significância das diferenças.

Figura 50 – Rede de relevância baseada no sistema IGF.

A partir, então, de nossos resultados e de dados da literatura, propomos que IGFBP4 em melanoma possa ser degradado pelas serina-proteases tais como as kalicreínas (KLKs) e metaloproteinases (MMPs), fazendo com que haja maior biodisponibilidade de IGF2 que por sua vez ao se ligar ao seu receptor IGF1R sinaliza sobrevivência e proliferação celular via ativação de ATK, Figura 51.

Segundo a rede, no grupo dos melanomas primários a correlação positiva entre a expressão de *IGFBP4* x *IGF2*, e a negativa observada entre *IGFBP4* x *MMP27* e *IGFBP4* x *IRS1* parecem ser os principais moduladores do sistema IGF. O balanço coordenado de suas proteínas é que direciona a biodisponibilidade de IGF2. Assim, parece que em melanomas primários ainda há um controle dos sinais proliferativos e de sobrevivência, assim como de escape à apoptose mediados por IGF2.

Já nos melanomas metastáticos parece haver uma quebra nestas correlações o que levaria a uma ativação deste programa de sobrevivência.

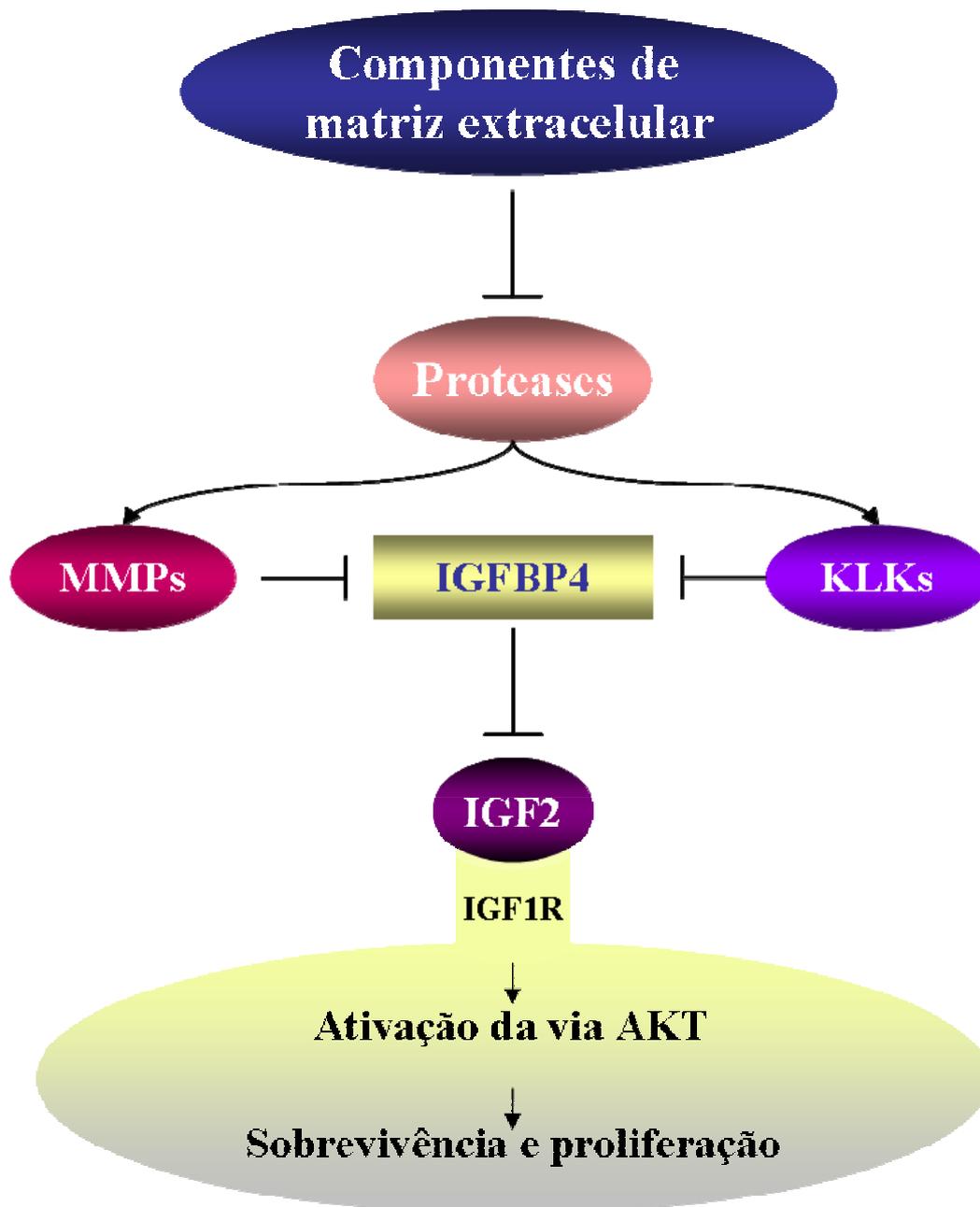


Figura 51 – Mecanismo regulatório de IGF em melanomas humanos.

6.4 VALIDAÇÕES DOS DADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA

6.4.1 Desmocolina-3

Confirmamos o nível de expressão de *DSC3*, aplicando-se a técnica de *RT-PCR* o que corrobora com o observado no *cDNA microarray*, no qual vimos também uma diferença significativa segundo o índice de Breslow.

Quanto à sua detecção a nível protéico por imuno-histoquímica, não conseguimos avaliar a sua imunoreatividade adequadamente.

6.4.2 Galectina-3

Embora não tenhamos confirmado o dado de expressão gênica diferencial entre os grupos de melanomas primários e metastáticos através da análise de sua expressão citoplasmática ou nuclear, por imuno-histoquímica em *TMA*, mostramos que a sua expressão citoplasmática estava significativamente correlacionada ao índice de Breslow.

LGALS3 membro da *beta-galactoside-binding gene family* codifica para a glicoproteína galectina-3, uma proteína multifuncional que apresenta importante papel em uma variedade de funções biológicas, incluindo adesão celular tumoral; proliferação; diferenciação celular; angiogênese; progressão tumoral e metástase (KRZESLAK e LIPINSKA 2004).

Como reportado pela literatura, galectina-3 se co-localiza com β -catenina, tanto no citoplasma quanto no núcleo. O acúmulo de beta-catenina no citoplasma decorre, principalmente, da dissociação com E-caderina transmembrana e da ativação da via WNT na qual GSK3 β é inativado com conseqüente inibição da

degradação de beta-catenina pelo proteassoma (SHIMURA et al. 2004; SHIMURA et al. 2005).

Uma vez acumuladas no citoplasma, galectina-3 e β -catenina são translocadas para o núcleo onde ativam a transcrição de fatores que promovem diferenciação, crescimento celular e migração (SHIMURA et al. 2004; SHIMURA et al. 2005).

Interessantemente, em nosso estudo vimos que a expressão citoplasmática de galectina-3 mostrou-se significativamente correlacionada ao índice de Breslow, aumentando-se à medida que se aumenta a espessura do tumor.

Sugerimos, então, que galectina-3 represente um importante fator no processo de invasão dos melanomas primários, principalmente, para aqueles cujo crescimento vertical (T4) limita-se à camada mais profunda da pele. Neste nível de invasão, as células de melanoma apresentaram um grande acúmulo de galectina-3 tanto no citoplasma quanto no núcleo.

Como a capacidade de invasão na junção dermo-epidérmica pode estar diretamente associada à ativação da via WNT, é factível pensarmos que havendo tal ativação haveria um aumento no acúmulo de beta-catenina, com conseqüente aumento de galectina-3 no citoplasma.

O desafio agora é tentar relacionar estas hipóteses com o perfil imunohistoquímico de beta-catenina, APC e GSK3 β , componentes da via WNT, em um conjunto de melanomas humanos.

6.4.3 Kalicreína-7

Validamos com sucesso o nível de expressão de *KLK7* a nível protéico por imuno-histoquímica em um conjunto de melanomas humanos. Embora não tenhamos conseguido significância estatística ($p=0,057$) quanto ao nível de expressão de *KLK7* segundo o índice de Breslow, nossos dados indicam uma possível associação, em concordância ao demonstrado por (WINNEPENNINCKX et al. 2006).

7 CONCLUSÃO

1. Mostramos seis módulos funcionais significativamente alterados segundo o grupo de melanoma: desenvolvimento da epiderme; atividade de peptidase; comunicação celular; adesão celular; receptor neuroativo ligante e assinatura metastática.
2. A partir do conceito de hipótese baseada em dados, construímos centenas de redes de relevâncias, nas quais identificamos milhares de correlações entre pares de genes funcionalmente relacionados.
3. Propomos um mecanismo de transposição da lâmina basal ou de migração intra-epidérmica modulado, principalmente, por kalicreína-7 e por suas proteases-inibidoras (SLPI e SKALP).
4. Propomos um mecanismo de sobrevivência e proliferação modulado por IGFBP4 e por suas proteases reguladoras (KLKs e MMPs).
5. Confirmamos os dados de expressão gênica diferencial detectado por *cDNA microarray* para desmocolina-3, galectina-3 e kalicreína-7.

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Aitken J, Welch J, Duffy D, et al. CDKN2A variants in a population-based sample of Queensland families with melanoma. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91:446-52.

Arai T, Arai A, Busby WJ, Clemmons DR. Glycosaminoglycans inhibit degradation of insulin-like growth factor-binding protein-5. **Endocrinology** 1994; 135:2358-63.

Churchill GA. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. **Nature Genet Suppl** 2002; 32:490-4.

Auroy S, Avril MF, Chompret A, et al. Sporadic multiple primary melanoma cases: CDKN2A germline mutations with a founder effect. **Genes Chromosomes Cancer** 2001; 32:195-202.

Balch CM, Buzaid AC, Atkins MB, et al. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. **Cancer** 2000; 88:1484-91.

Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. **J Clin Oncol** 2001a; 19:3622-34.

Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. **J Clin Oncol** 2001b; 19:3635-48.

Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, et al. New TNM melanoma staging system: linking biology and natural history to clinical outcomes. **Semin Surg Oncol** 2003; 21:43-52.

Ball CA, Chen Y, Panavally S, et al. An introduction to microarrays bioinformatics. In: Bowtell D, Sambrook J, editors. **DNA microarrays: a molecular cloning manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003. p.509-94.

Bao S, Ouyang G, Bai X, et al. Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. **Cancer Cell** 2004; 5:329-39.

Baugh LR, Hill AA, Brown EL, Hunter CP. Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. **Nucleic Acids Res** 2001; 29:E29.

Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM, et al. Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. **J Natl Cancer Inst** 2002; 94:894-903.

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

Bittner M, Butow R, Derisi J, et al.: Expression analysis of RNA. In: Bowtell D, Sambrook J, editors. **DNA microarrays: a molecular cloning manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003. p.101-279.

Borgoño CA, Michael IP, Komatsu N, et al. A potential role for multiple tissue kallikrein serine proteases in epidermal desquamation. **J Biol Chem** 2006 Dec 11; [Epub ahead of print]

Brattsand M, Stefansson K, Lundh C, Haasum Y, Egelrud T. A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. **J Invest Dermatol** 2005; 124:198-203.

Brentani H et al. The generation and utilization of a cancer-oriented representation of the human transcriptome by using expressed sequence tags. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2003; 100 (23):

Brentani RR, Carraro DM, Verjovski-Almeida S, et al. Gene expression arrays in cancer research: methods and applications. **Crit Rev Oncol Hematol** 2005; 54:95-105.

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

Bruce JA, Brodland DG. Overview of skin cancer detection and prevention for the primary care physician. **Mayo Clin Proc** 2000; 75:491-500.

Busca R, Abbe P, Mantoux F, et al. Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. **EMBO J** 2000; 19:2900-10.

Busca R, Ballotti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. **Pigment Cell Res** 2000; 13:60-9.

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 U S A.** 2000; 97:12182-6.

Camargo AA, Samaia HP, Dias-Neto E, Simao DF et al. The contribution of 700,000 ORF sequence tags to the definition of the human transcriptome. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2001; 98(21):12103-8. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101 (1):414.

Carr KM, Bittner M, Trent JM. Gene-expression profiling in human cutaneous melanoma. **Oncogene** 2003; 22:3076-80.

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.

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:563-72.

Chandrasekharappa S, Holloway A, Iyer V, Monte D, Murphy M, Nowak NJ. Generation of probes for spotted microarrays. In: Bowtell D, Sambrook J, editors. **DNA microarrays: a molecular cloning manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003. p.1-51.

Childs G, DeRisi J, Harris T, et al. Printing spotted glass microarrays. In: Bowtell D, Sambrook J, editors. **DNA microarrays: a molecular cloning manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003. p.61-97.

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. [Errata publicada na Nature 2001; 411:974].

Coppock HA, White A, Aplin JD, Westwood M. Matrix metalloprotease-3 and-9 proteolyze insulin-like growth factor-binding protein-1. **Biol Reprod** 2004; 71:438-43.

Cox WG, Singer VL. Fluorescent DNA hybridization probe preparation using amine modification and reactive dye coupling. **Biotechniques** 2004; 36:114-22.

Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. **N Engl J Med** 2005; 353:2135-47.

Danen EH, de Vries TJ, Morandini R, Ghanem GG, Ruiter DJ, van Muijen GN. E-cadherin expression in human melanoma. **Melanoma Res** 1996; 6:127-31.

Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature** 2002; 417:949-54.

de Wit NJW, Burtscher HJ, Weidle UH, Ruiter DJ, Van Muijen GNP. Differentially expressed genes identified in human melanoma cell lines with differentiated metastatic behaviour using high density oligonucleotides arrays. **Melanoma Res** 2002; 12:57-69.

Degen WG, Weterman MA, van Groningen JJ, et al. Expression of NMA, a novel gene, inversely correlates with the metastatic potential of human melanoma cell lines and xenografts. **Int J Cancer** 1996; 65:460-5.

Devary Y, Gottlieb RA, Smeal T, Karin M. The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. **Cell** 1992; 71:1081-91.

Diamandis EP, Yousef GM, Luo LY, Magklara A, Obiezu C. The new kallikrein gene family – implications in carcinogenesis. **Trends Endocrinol Metab** 2000; 11:54-60.

Dudoit S, Yang YH, Callow MJ, Speed TP. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarrays. **Statistica Sinica** 2002; 12:111-39.

Dudoit S, Gentleman RC, Quackenbush J. Open source software for the analysis of microarray data. **Biotechniques** 2003; Suppl:45-51.

Durai E, Davies M, Yang W, et al. Biology of insulin-like growth factor binding protein-4 and its role in cancer. **Int J Oncol** 2006; 28:1317-25.

Eckert RL, Rorke EA. Molecular biology of keratinocyte differentiation. **Environ Health Perspect** 1989; 80:109-16.

Egelrud T. Purification and preliminary characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme: a proteinase that may be involved in desquamation. **J Invest Dermatol** 1993; 101:200-4.

Ekholm IE, Brattsand M, Egelrud T. Stratum corneum tryptic enzyme in normal epidermis: a missing link in the desquamation process? **J Invest Dermatol** 2000; 114; 56-63.

Elwood JM, Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. **Int J Cancer** 1997; 73:198-203.

Esteller M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. **Eur J Cancer** 2000; 36:2294-300.

Florell SR, Coffin CM, Holden JA, et al. Preservation of RNA for functional genomic studies: a Multidisciplinary Tumor Bank Protocol. **Mod Pathol** 2001; 14:116-28.

Fountain JW, Bale SJ, Housman DE, Dracopoli NC. Genetics of melanoma. **Cancer Surv** 1990; 9:645-71.

Fowlkes JL, Thraikill KM, George-Nascimento C, Rosenberg CK, Serra DM. Heparin-binding highly basic regions within the thyroglobulin type-I repeat of insulin-like growth factor (IGF) – binding proteins (IGFBPs)-3, -5, and 6 inhibit IGFBP4 degradation. **Endocrinology** 1997; 138:2280-5.

Franzke CW, Baici A, Bartels J, Christophers E, Wiedow O. Antileukoprotease inhibits stratum corneum chymotryptic enzyme: evidence for a regulative function in desquamation. **J Biol Chem** 1996; 271:21886-90.

Furuta J, Umebayashi Y, Miyamoto K, et al. Promoter methylation profiling of 30 genes in human malignant melanoma. **Cancer Sci** 2004; 95 12:962-8.

Galliano MF, Toulza E, Gallinaro H, et al. A novel protease inhibitor of the alpha2-macroglobulin family expressed in the human epidermis. **J Biol Chem** 2006; 281:5780-9.

Gilchrest BA, Eller MS. DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses. **J Invest Dermatol Symp Proc** 1999; 4:35-40.

Gillan L, Matei D, Fishman DA, Gerbin CS, Karlan BY, Chang DD. Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5) integrins and promotes cell motility. **Cancer Res** 2002; 62:5358-64.

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.

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

Green H. The keratinocyte as differentiated cell type. **Harvey Lect** 1979; 74:101-39.

Grizzle WE, Aamodt R, Clausen K, LiVolsi V, Pretlow TG, Qualman S. Providing human tissues for research: how to establish a program. **Arch Pathol Lab Med** 1998; 122:1065-76.

Grossman D, Altieri DC. Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets. **Cancer Metastasis Rev** 2001; 20:3-11.

Guldberg P, Thor Straten P, Birck A, Ahrenkiel V, Kirkin AF, Zeuthen J. Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. **Cancer Res** 1997; 57:3660-3.

Gumbiner MB. Regulation of cadherin adhesive activity. **Cell Biol** 2000; 48:399-404.

Hakansson N, Floderus B, Gustavsson P, et al. Occupational sunlight exposure and cancer incidence among Swedish construction workers. **Epidemiology** 2001; 12:552-7.

Halpern AC, Altman JF. Genetic predisposition to skin cancer. **Curr Opin Oncol** 1999; 11:132-8.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

Hansson L, Stromqvist M, Backman A, Wallbrandt P, Carlstein A, Egelrud T. Cloning, expression and characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme: a skin-specific human serine proteinase. **J Biol Chem** 1994; 269:19420-6.

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

Helfand M, Krages KP. **Counseling to prevent skin cancer: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force**. Rockville, Md.: Agency for Healthcare Research and Quality, 2003. Available from: <URL:<http://www.ahrq.gov/clinic/3rduspstf/skacoun/skcounsum.htm>>. [2006 set 12].

Helmbach H, Rossmann E, Kern MA, Schadendorf D. Drug-resistance in human melanoma. **Int J Cancer** 2001; 93:617-22.

Hendrix MJC, Seftor EA, Meltzer PS, et al. Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. **Proc Natl Acad Sci** 2001; 98:8018-23.

Hendrix MJC, Seftor EA, Hess AR, Seftor REB. Vasculogenic mimicry and tumours-cell plasticity: lessons from melanoma. **Nature** 2002; 3:411-21.

Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor REB. Molecular plasticity of human melanoma cells. **Oncogene** 2003; 22:3070-5.

Hess AR, Seftor EA, Gardner LM, et al. Molecular regulation of tumor cell vasculogenic mimicry by tyrosine phosphorylation: role of epithelial cell kinase (Eck/EphA2). **Cancer Res** 2001; 61:3250-5.

Hewitt C, Lee Wu C, et al. Germline mutation of ARF in a melanoma kindred. **Hum Mol Genet** 2002; 11:1273-9.

Homsí J, Kashani-Sabet M, Messina JL, Daud A. Cutaneous melanoma: prognostic factors. **Cancer Control** 2005; 12:223-9.

Hoon DS, Spugnardi M, Kuo C, Huang SK, Morton DL, Taback B. Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumors and plasma from cutaneous melanoma patients. **Oncogene** 2004; 23:4014-22.

Hsu MY, Andl T, Li G, Meinkoth JL, Herlyn M. Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. **J Cell Sci** 2000a; 113:1535-42.

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** 2000b; 156:1515-25.

Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn MJ. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. **Invest Dermatol Symp Proc** 1996; 1:188-94.

Hussein MR. Genetic pathways to melanoma tumorigenesis. **J Clin Pathol** 2004; 57:797-801.

Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nat Rev Cancer** 2002; 2(4):277-88.

Ihaka R, Gentleman R. R: a language for data analysis and graphics. **J Comput Graph Statist** 1996; 5:299-314.

Jhappan C, Noonan FP, Merlino G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. **Oncogene** 2003; 22:3099-112.

Junqueira LC e Carneiro J. **Histologia Básica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2004. p.359 – 370.

Kawaguchi Y, Mori N, Nakayama A. Kit(+) melanocytes seem to contribute to melanocyte proliferation after UV exposure as precursor cells. **J Invest Dermatol** 2001; 116:920-5.

Kennedy C, ter Huurne J, Berkhout M, et al. Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. **J Invest Dermatol** 2001; 117:294-300.

Krzeslak A, Lipinska A. Galectin-3 as a multifunctional protein. **Cell Mol Biol Letter** 2004; 9:305-28.

Kyriakopoulou LG, Yousef GM, Scorilas A, et al. Prognostic value of quantitatively assessed KLK7 expression in ovarian cancer. **Clin Biochem** 2003; 36:135-43.

Kyveris A, Maruscak E, Senchyna M. Optimization of RNA isolation from human ocular tissues and analysis of prostanoid receptor mRNA expression using RT-PCR. **Mol Vision** 2002; 8:51-8.

Li G, Schaidler H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Herlyn M. Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. **Oncogene** 2001; 20:8125-35.

Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development. **Crit Rev Oral Biol Med** 2002; 13:62-70.

Li G, Satyamoorthy K, Meier F, Berking C, Bogenrieder T, Herlyn M. Function and regulation of melanoma-stromal fibroblasts interactions: when seeds meet soil. **Oncogene** 2003; 22:3162-71.

Lundstrom A, Egelrud T. Stratum corneum chymotryptic enzyme: a proteinase which may be generally present in the stratum corneum and with a possible involvement in desquamation. **Acta Dermatol Venereol** 1991; 71:471-4.

Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. **Am J Pathol** 1999; 155:739-52.

Masci P, Borden EC. Malignant melanoma: treatments emerging, but early detection is still key. **Cleavel Clin J Med** 2002; 69:529, 533-534, 536-538.

Matsumura M, Bhatt AS, Andress D, et al. Substrates of the prostate-specific serine protease prostase/KLK4 defined by positional-scanning peptide libraries. **Prostate** 2005; 62:1-13.

Medline Plus, Medical encyclopedia, 2004.
<URL:<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/9620.htm>> [2007 jan 12]

McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, et al. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. **Cell** 2002; 109:707-18.

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.

Miyamoto S, Yano K, Sugimoto S, et al. Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 3. **Cancer Res** 2004; 64:665-71.

Nachbar F, Stolz W, Merkle T, et al. The ABCD rule of dermatoscopy: high prospective value in the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. **J Am Acad Dermatol** 1994; 4:551-9.

Nakamura M, Miyamoto S, Maeda H, et al. Matrix metalloproteinase-7 degrades all insulin-like growth factor binding proteins and facilitates insulin-like growth factor bioavailability. **Biochem Biophys Res Commun** 2005; 333:1011-6.

Nambiar S, Mirmohammadsadegh A, Bar A, Bardenheuer W, Roeder G, Hengge UR. Applications of array technology: melanoma research and diagnosis. **Expert Rev Mol Diagn** 2004; 4:549-57.

Neves RI, Mendes ASP, Sá BCS, et al. Manual de condutas terapêuticas para o tratamento do melanoma do Departamento de Oncologia Cutânea do Hospital do Câncer São Paulo – 2003. **Acta Oncol Bras** 2003; 23:466-70.

Newell-Price J, King P, Clark AJL. The CpG island promoter of the human proopiomelanocortin gene is methylated in nonexpressing normal tissue and tumors and represses expression. **Mol Endocrinol** 2001; 15:338-48.

Newton JA, Bataille V, Griffiths K, et al. How common is the atypical mole syndrome phenotype in apparently sporadic melanoma? **J Am Acad Dermatol** 1993; 29:989-96.

Oesterreichert S, Blum WF, Schmidt B, Braulket T, Kühler B. Interaction of insulin-like growth factor II (IGFII) with multiple plasma proteins. **J Biol Chem** 2005; 280:9994-10000.

Palmer JS, Duffy DL, Box NF, et al. Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? **Am J Hum Genet** 2000; 66:176-86.

Phillips J, Eberwine JH. Antisense RNA amplifications: a linear amplification method for analyzing the mRNA population from single living cells. **Methods** 1996; 10:283-8.

Quackenbush J. Computational analysis of microarray data. **Nature** 2001; 2:418-27.

Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation. **Nature Genet** 2002; Suppl 32:496-501.

Radler-Pohl A, Sachsenmaier C, Gebel S, et al. UV-induced activation of AP-1 involves obligatory extranuclear steps including Raf-1 kinase. **EMBO J** 1993; 12:1005-12.

Rager EL, Bridgeford EP, Ollila DW. Cutaneous melanoma: update on prevention, screening, diagnosis and treatment. **Am Family Phys** 2005; 72:269-76.

Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. Molecular signature of metastasis in primary solid tumors. **Nat Genet** 2003; 33:49-54.

Rebhan M, Chalifa-Caspi V, Prilusky J, Lancet D. **GeneCards: encyclopedia for genes, proteins and diseases**. Weizmann Institute of Science, Bioinformatics Unit and Genome Center (Rehovot, Israel), 1997. GeneCard for [gene]. Available from: <URL:[http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=\[gene\]](http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=[gene])> [2006 Set 12]

Réhault S, Monget P, Mazerbourg S, et al. Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) as potential physiological substrates for human kallikreins hk2 and hk3. **Eur J Biochem** 2001; 268:2960-8.

Rice RH, Green H. Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions. **Cell** 1979; 18:681-94.

Ries LAG, Eisner MP, Kosary Cl, et al. **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2003**. Available from: <URL:http://seer.cancer.gov/csr/1975_2003/results_merged/sect_16_melanoma.pdf> [2006 dez 12].

Rivers JK. Is there more than one road to melanoma? **Lancet** 2004; 363:728-30.

Rouzaud F, Kadekaro AL, Abdel-Malek ZA, Hearing VJ. MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. **Mutat Res** 2005; 571:133-52.

Sadowski T, Dietrich S, Koschinsky F, Sedlacek R. Matrix metalloproteinase 19 regulates insulin-like growth factor-mediated proliferation, migration, and adhesion in human keratinocytes through proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3. **Mol Biol Cell** 2003; 14:4569-80.

Sauter ER, Herlyn M. Molecular biology of human melanoma development and progression. **Mol Carcinog** 1998; 23:132-43.

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.

Segal E, Wang H, Koller D. Discovering molecular pathways from protein interaction and gene expression data. **Bioinformatics** 2003; 19 Suppl 1:264-71.

Shahbazi M, Pravica V, Nasreen N, et al. Association between functional polymorphism in EGF gene and malignant melanoma. **Lancet** 2002; 359:397-401.

Shanley SM, Chenevix-Trench G, Palmer J, Hayward N. Glutathione S-transferase GSTM1 null genotype is not overrepresented in Australian patients with nevoid basal cell carcinoma syndrome or sporadic melanoma. **Carcinogenesis** 1995; 16:2003-4.

Shao R, Bao S, Bai X, et al. Acquired expression of periostin by human breast cancers promotes tumor angiogenesis through up-regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 expression. **Mol Cell Biol** 2004; 24:3992-4003.

Shashidhar S, Lorente G, Nagavarapu U, et al. GPR56 is a GPCR that is overexpressed in gliomas and functions in tumor cell adhesion. **Oncogene** 2005; 24:1673-82.

Shimura T, Takenaka Y, Fukumori T, et al. Implication of galectin-3 in Wnt signaling. **Cancer Res** 2005; 65:3535-7.

Shimura T, Takenaka Y, Tsutsumi S, Hogan V, Kikuchi A, Raz A. Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. **Cancer Res** 2004; 64:6363-7.

Slominski A, Wortsman J, Nickoloff B, McClatchey K, Mihm MC, Ross JS. Molecular pathology of malignant melanoma. **Am J Clin Pathol** 1998; 110:788-94.

Slominski A, Wortsman J, Carlson AJ, Matsuoka LY, Balch CM, Mihm MC. Malignant melanoma. **Arch Pathol Lab Med** 2001; 125:1295-306.

Smith AP, Weeraratna AT, Spears JR, Meltzer PS, Becker D. SAGE identification and fluorescence imaging analysis of genes and transcripts in melanomas and precursor lesions. **Cancer Biol Ther** 2004; 3:104-9.

Smith-Sorensen B, Hovig E. CDKN2A (p16INK4A) somatic and germline mutations. **Hum Mutat** 1996; 7:294-303.

Snoo FA, Hayward NK. Cutaneous melanoma susceptibility and progression genes. **Cancer Letters** 2005; 230:153-86.

Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene** 2003; 22:3138-5.

Sondell B, Dyberg P, Anneroth GK, Ostman PO, Egelrud T. Association between expression of stratum corneum chymotryptic enzyme and pathological keratinization in human oral mucosa. **Acta Dermatol Venereol** 1996; 76:177-81.

Soufir N, Avril MF, Chompret A, et al. Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France: The French Familial Melanoma Study Group. **Hum Mol Genet** 1998; 7:209-16.

de Souza SJ, Camargo AA, Briones MR, Costa FF, Nagai MA, Verjovski-Almeida et al. Identification of human chromosome 22 transcribed sequences with ORF expressed sequence tags. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2000; 97(23):12690-3

Spugnardi M, Tommasi S, Dammann R, Pfeifer GP, Hoon DS. Epigenetic inactivation of RAS association *domain* family protein 1 (RASSF1A) in malignant cutaneous melanoma. **Cancer Res** 2003; 63:1639-43.

Stadelmann WK, Rapaport DP, Soon SJ, Reintgen, DS, Buzaida, AC, Balch, MC. Predictive factors that influence melanoma outcome: prognostic, clinical and pathologic features. In: Balch MC, Houghton AN, Sober AJ, Soon SJ, editors. **Cutaneous melanoma**. 3rd ed. St. Louis: Q. M. Publishing I.; 1998. p.11-35.

Strange RC, Ellison T, Ichii-Jones F, et al. Cytochrome P450 CYP2D6 genotypes: association with hair colour, Breslow thickness and melanocyte stimulating hormone receptor alleles in patients with malignant melanoma. **Pharmacogenetics** 1999; 9:269-76.

Sud N, Sharma R, Ray R, Chattopadhyay TK, Ralhan R. Differential expression of G-protein coupled receptor 56 in human esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Lett** 2006; 233:265-70.

Suzuki I, Im S, Tada A, et al. Participation of the melanocortin-1 receptor in the UV control of pigmentation. **J Invest Dermatol Symp Proc** 1999; 4:29-34.

Takeuchi H, Kuo C, Morton DL, Wang H, Hoon DSB. Expression of differentiation melanoma-associated antigen genes is associated with favorable outcome in advanced-stage melanomas. **Cancer Res** 2003; 63: 441-8.

Tang A, Eller MS, Hara M, Yaar M, Hirohashi S, Gilchrist BA. E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro. **Cell Sci** 1994; 107:983-92.

Teng DH, Hu R, Lin H, et al. MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines. **Cancer Res** 1997; 57:5221-5.

Thacker SM, Rice RH. Keratinocyte-specific transglutaminase of cultured human epidermal cells: relation to cross-linked envelope formation and terminal differentiation. **Cell** 1985; 40:685-95.

Tovo FLR, Belfort FA, Sanches JA. Melanoma cutâneo abordagem da lesão primária. **Acta Oncol Bras** 2003; 23:454-8.

Tucker MA, Goldstein AM. Melanoma etiology, where are we? **Nature** 2003; 22:3042-52.

Van Gelder RN, Von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. **Proc Natl Acad EUA** 1990; 87:1663-7.

Wan YS, Wang ZQ, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Ultraviolet irradiation activates PI 3-kinase/AKT survival pathway via EGF receptors in human skin in vivo. **Int J Oncol** 2001; 18:461-6.

Wang E, Marincola FM. A natural history of melanoma: Serial gene expression analysis. **Immunol Today** 2000; 21:619-23.

Wang E, Miller LD, Ohnmacht GA, Liu ET, Marincola FM. High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. **Nature** 2000; 18:457-9.

Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, et al. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. **Cancer Cell** 2002; 1:279-88.

Weeraratna AT, Nagel JE, de Mello-Coelho V, Taub DD. Gene expression profiling: from microarrays to medicine. **J Clin Immunol** 2004; 24:213-24.

Whiteman DC, Whiteman CA, Green AC. Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. **Cancer Causes Control** 2001; 12:69-82.

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.

Xu L, Begum S, Hearn JD, Hynes RO. GPR56, an atypical G protein-coupled receptor, binds tissue transglutaminase, TG2, and inhibits melanoma tumor growth and metastasis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2006; 103:9023-8.

Yang YH, Speed T. Design issues for cDNA microarray experiments. **Nature** 2002; 3:579-88.

Yang YH, Dudoit S, Luu P, et al. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. **Nucleic Acids Res** 2002; 30:1-10.

Yang YH, Buckley MJ, Speed TP. Analysis of cDNA microarray images. **Brief Bioinform** 2001; 2:341-9.

Yousef GM, Polymeris M, Yacoub GM, et al. Parallel overexpression of seven kallikrein genes in ovarian cancer. **Cancer Research** 2003; 63:2223-7.

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.

Zhai S, Yaar M, Doyle SM, Gilchrest BA. Nerve growth factor rescues pigment cells from ultraviolet-induced apoptosis by upregulating BCL-2 levels. **Exp Cell Res** 1996; 224:335-43.

Zuo L, Weger J, Yang Q, et al. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. **Nat Genet** 1996; 12:97-9.