

**ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA EM  
MELANOMAS CUTÂNEOS MALIGNOS MURINOS  
APÓS TRATAMENTO SISTÊMICO COM O FATOR DE  
NECROSE TUMORAL (TNF) ASSOCIADO OU NÃO A  
MELFALANO (MEL)**

**VLADMIR CLÁUDIO CORDEIRO DE LIMA**

**Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-  
Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Fundação  
Antônio Prudente**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientador: Dr. Luiz Fernando Lima Reis**

**Co-orientador: Dra. Adriana Abalen Martins Dias**

**São Paulo**

**2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Lima, Vladimir Cláudio Cordeiro de

**Análise do perfil de expressão gênica em melanomas cutâneos malignos murinos após tratamento sistêmico com o fator de necrose tumoral (TNF) associado ou não a melfalano (MEL)** / Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima – São Paulo, 2007.

166p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Luiz Fernando Lima Reis

Descritores: 1. MELANOMA MALÍGNO. 2. EXPRESSÃO GÊNICA. 3. TNF. 4. MELFALAN.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria de Lourdes e Francisco (*in memoriam*), pelo apoio incondicional a todas as minhas iniciativas; a minha esposa querida, Ana Carolina, por seu amor e carinho; e a minha amada filhinha, Sarah, por ter me dado a infinita alegria de ser seu pai.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer aos meus pais, Maria de Lourdes e Francisco, e irmãos, Yuri, Margareth, Tânia e Claudinho, por serem o alicerce da minha alma;

À minha esposa, Ana Carolina, pelo incentivo e carinho constantes;

Ao meu orientador, Dr. Luiz Fernando, pela orientação, bom humor e amizade;

À minha co-orientadora, Dra. Adriana Abalen, pela paciência, atenção, dedicação, discussões e amizade;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Experimentação Animal, Mariana, Graziela e Vivian, pela ajuda imprescindível com as análises de densidade vascular, amplificação dos RNA e Real-Time PCR, sem a qual este trabalho não estaria concluído e pela amizade acima de tudo, Juliana, Emerson, Suzana e Andréia, pelos bons momentos de conversa;

Ao Dr. Alex Fiorini, pela sempre presente calma e positividade e orientações sobre as hibridizações dos “microarrays”;

À Sarah e Chamberlain pela ajuda na realização dos experimentos de “microarray” e amplificação dos RNA;

À Regina, pela ajuda com as culturas de células;

À Dra. Karina Ribeiro, pela inestimável ajuda com as análises estatísticas e amizade incondicional;

Ao Dr. Gilles Landman e ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo, pela orientação nas análises histológicas dos tumores;

À Dra. Helena Brentani e à equipe do Laboratório de Bio-Informática, principalmente, ao César, pelas análises dos dados de microarray;

À Aline, pela presteza, bom humor e solução rápida para os problemas do dia-a-dia;

Aos meus primeiros orientadores, Dra. Vilna Maia e Dr. Arnaldo Medeiros, pelo estímulo inicial e exemplos de dedicação à pesquisa básica;

Aos amigos e colegas do LABRI, Ana Pagotto, Nair, Bianca, Ana Coló, Waleska, Luciana, Beatriz, Sibebe, Letícia, pela ajuda com os experimentos de microarray, pelos risos, pelas músicas, conversas, desenhos, vassouras de aço e sandálias de pau;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Virologia, Patrícia Sávio, Lara, Enrique, Zé Carlos, Joãozinho, Lepique, Tatiana, Aline, Laura, Karina e Zanith por terem me agüentado várias vezes, pelas conversas mais divertidas do mundo e pela assessoria para assuntos aleatórios;

Aos meus colegas de trabalho, passados e atuais, e residentes, Andrea, José Augusto, Ulisses, Marcello, Olavo, Agnaldo, Cíntia Abreu, Lucianno Henrique, Cíntia Givigi, Samantha, Carolina Mathias, Tatiane, Joseane, Gray, Aldo, Daniel Gimenes, Daniel Cubero, Ronald, Celso, Edilson, Mariângela, Solange, Sueli, Antônio Alencar, Thiago, Tadeu, Lázaro, Markus Giffoni, Duílio, Dálvaro, Débora, Andréia Santin, Marcelo Hajime, Ana Carolina, Tatiana, Adriana, Adrana Valadares, Simone, Rosane, Álvaro, Rodrigo e Bertha pelo estímulo constante;

À equipe da biblioteca, Sueli, pela ajuda na formatação do trabalho, Rose e Francine, pela eficiência e gentileza na disponibilização e busca dos artigos;

À equipe do Biotério, Wanderley, Éder e Oraci, pela ajuda nos experimentos com animais;

À Carlinhos e Sueli da Patologia, pela preparação dos blocos e lâminas para análise histológica;

À Ana Christina e Eduardo Abrantes, pela simpatia e carinho;

À Isabel e Léia, pelo bom humor e ajuda com as vidrarias e soluções;

Aos meus pacientes, por me permitirem exercer a minha profissão;

Ao Hospital A. C. Camargo e à Fundação Antônio Prudente por terem permitido a realização deste trabalho em suas dependências e sob sua tutela;

À FAPESP, pelo suporte financeiro.

## RESUMO

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

ILP (Perfusão Isolada de Membro) com melphalan (MEL) é uma abordagem alternativa no tratamento de melanomas cutâneos avançados, não-resseáveis, de extremidades, poupando o membro da amputação. A ILP é um procedimento loco-regional que permite a administração de altas doses de drogas ao membro com efeitos sistêmicos mínimos, e toxicidade local leve. A associação do Fator de Necrose Tumoral (TNF) melhora a taxa de resposta completa de 40-50% para 70-90%. Os mecanismos moleculares subjacentes a este efeito sinérgico são pouco compreendidos. O objetivo do nosso estudo foi determinar o perfil de expressão gênica do melanoma e sua modificação após tratamento com TNF, MEL ou TNF+MEL. Para atingir tal objetivo, células das linhagens B16F1 e B16F10 foram expostas a MEL (36,9 $\mu$ M), TNF (10ng/ml) ou ambos durante 3 horas, para os ensaios com “microarrays”, ou durante 24, 48 e 72 horas, para os ensaios de citotoxicidade. Paralelamente, camundongos C57BL6 machos, de 6 a 8 semanas, foram injetados subcutaneamente, em ambos os flancos, com  $5,0 \times 10^5$  células de B16F10 e B16F1. Animais cujos tumores atingiram  $1,0 \pm 0,3 \text{ cm}^2$  (n=9-10 mice/group) receberam uma injeção intravenosa de TNF (0,05 $\mu$ g/Kg), MEL (12mg/Kg), TNF+MEL ou salina (controle). Um dos tumores foi removido cirurgicamente após 3 horas para extração de RNA e análise histológica e o tumor remanescente foi acompanhado para avaliação do crescimento tumoral. Os perfis de expressão gênica das células e dos tumores foram determinados através da estratégia de “microarray”, empregando um “biochip” contendo 16.128 oligonucleotídeos. O tratamento das células de melanoma com MEL durante 48h esteve associado com uma maior taxa de morte celular. O TNF não exerceu nenhuma atividade citotóxica sobre as células de melanoma *in vitro*. A administração de melfalano promoveu uma menor velocidade



de crescimento tumoral ( $p < 0,001$ ), efeito este que não foi modificado pela co-administração de TNF. Entretanto, tumores tratados com TNF apenas ou em combinação com MEL apresentaram mais necrose ( $p = 0,017$  e  $p = 0,014$ , respectivamente) e menos mitoses ( $p = 0,001$ ). Um número menor de mitoses também foi observado em resposta a MEL. O tratamento com MEL ou MEL+TNF esteve associado com aumento da sobrevida livre de progressão. O tratamento com MEL ou TNF durante 3 horas não afetou a densidade vascular. Um grupo de genes grande teve sua expressão modulada pelo tratamento *in vitro*. Entre estes, nós identificamos Aff1, um regulador do ciclo celular, positivamente regulado por MEL. O mesmo efeito foi observado *in vivo* para este gene em especial. Da comparação entre os perfis de expressão gênica dos tumores por ANOVA, nós identificamos 118 genes diferencialmente expressos com  $p < 0,05$ . Entre os elementos diferencialmente expressos estão genes que codificam proteínas envolvidas em adesão celular (Pecam1, Pard3, Dlg5), apoptose (Bcl111), vias de sinalização (Arhgef6, Flt-1), regulação de transcrição (Tcf3, Ifi202b, Irak1bp1, Fabp4, Trp73, Trim24), ciclo celular (Cdc7, Aff1), metabolismo de drogas (Akr1b7), potencial metastático (Trpm1, Mib2) e várias outras funções biológicas.

Suporte: FAPESP

## SUMMARY

Lima VCC. [Gene expression profile of murine malignant melanoma after systemic treatment with with tumor necrosis factor (TNF) associated or not with melphalan (MEL)]. São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

ILP (Isolated Limb Perfusion) with melphalan (MEL) is an alternative approach in the treatment of non-resectable locally advanced cutaneous melanomas of extremity, sparing the limb from amputation. ILP is a locoregional procedure to deliver high doses of drugs to a limb with minimal systemic and mild local toxicity. The association with the Tumor Necrosis Factor (TNF) improves total complete response rates from 40-50% to 70-90%. The molecular mechanisms underlining this synergistic effect are poorly understood. The aim of our study was to determine the gene expression profile of melanoma and its alterations after the treatment with TNF, MEL and TNF+MEL. To reach this objective B16F1 and B16F10 cells were exposed to MEL (36,9 $\mu$ M), TNF (10ng/ml) or both during 3 hours for microarray assays or for 24h, 48h and 72h for cytotoxicity assays. At same time, 6-8 weeks-old male C57BL6 mice were injected subcutaneously, on both flanks, with  $5,0 \times 10^5$  of B16F10 and B16F1 melanoma cells. Animals bearing tumors of  $1,0 \pm 0,3 \text{ cm}^2$  (n=9-10 mice/group) received an intravenous injection of TNF (0,05 $\mu$ g/Kg), MEL (12mg/Kg), TNF+MEL or saline (control). One of the tumors was surgically removed 3h after for RNA extraction and histology and the other one was left for growth measurements. Gene expression profiles from cells and tumors were determined by microarray strategy using a biochip containing 16.128 oligonucleotides. Treatment of melanoma cells with MEL for 48h was associated with a significantly higher cell death rate. TNF exerted no cytotoxic effects on melanoma cells *in vitro*. The administration of melphalan led to slower tumor growth rate (p<0,001), effect that was not modified by the TNF co-administration. Nevertheless, tumors treated with TNF alone or in combination with MEL presented more necrosis (p=0,017 and p=0,014, respectively) and less mitosis (p=0,001). Less

mitosis was also observed in response to MEL alone. Treatment with MEL or MEL+TNF was associated with a longer progression free survival. Three-hour-treatment with MEL or TNF did not affect vascular density. A whole set of genes had its expression modulated by treatment *in vitro*. Amongst them, we identified Aff1, a regulator of cell proliferation, as positively regulated by MEL. The same effect was observed *in vivo* for this specific gene. From the comparison between the gene expression profile by ANOVA, we identified 118 genes differentially expressed with  $p < 0,05$ . Among the differentially expressed elements are genes coding for proteins involved in cell adhesion (Pecam1, Pard3, Dlg5), apoptosis (Bcl111), signaling pathways (Arhgef6, Flt-1), regulation of transcription (Tcf3, Ifi202b, Irak1bp1, Fabp4, Trp73, Trim24), cell cycle (Cdc7, Aff1), drug metabolism (Akr1b7), metastatic potential (Trpm1, Mib2) and many other diverse biological functions.

Supported by: FAPESP

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Diagrama esquemático do procedimento de uma perfusão isolada de membro.	5
<b>Figura 2</b>	Molécula de melfalano.	7
<b>Figura 3</b>	Mecanismo de ação das mostardas nitrogenadas.	8
<b>Figura 4</b>	Estrutura tridimensional do TNF – forma solúvel.	11
<b>Figura 5</b>	Via de sinalização de TNFR-1.	13
<b>Figura 6</b>	Diagrama com o desenho experimental do presente estudo.	35
<b>Figura 7</b>	Diagrama da estratégia experimental adotada no estudo.	50
<b>Figura 8</b>	Avaliação <i>in vitro</i> da toxicidade de melfalano e TNF contra células B16F10.	56
<b>Figura 9</b>	Avaliação <i>in vitro</i> da toxicidade de melfalano e TNF contra células B16F1.	57
<b>Figura 10</b>	Curva de crescimento tumoral de B16F10 em camundongos C57BL/6 após tratamento com melfalano e/ou TNF.	59
<b>Figura 11</b>	Curvas de sobrevida livre de progressão tumoral de camundongos C57BL/6 inoculados com B16F10 após tratamento com melfalano e/ou TNF.	60
<b>Figura 12</b>	Curvas de sobrevida livre de eventos de camundongos C57BL/6 inoculados com B16F10 após tratamento com melfalano e/ou TNF.	60
<b>Figura 13</b>	Curva de crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 inoculados com B16F1.	62
<b>Figura 14</b>	Curvas de sobrevida livre de progressão de animais inoculados com B16F1.	63
<b>Figura 15</b>	Curvas de sobrevida livre de eventos de animais inoculados com B16F1.	63
<b>Figura 16</b>	Curva de crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 inoculados com B16F1 e B16F10 agrupados após tratamento com melfalano e/ou TNF.	65

<b>Figura 17</b>	Curvas de sobrevida livre de progressão agrupada de animais inoculados com B16F1 e B16F10.	66
<b>Figura 18</b>	Curvas de sobrevida livre de eventos agrupada de animais inoculados com B16F1 e B16F10.	66
<b>Figura 19</b>	Eletroforese das amostras de RNA extraídas de linhagens de melanoma após tratamento com melfalano e/ou TNF.	71
<b>Figura 20</b>	Eletroforese em gel de agarose 1% das amostras de RNA extraídas de células de melanoma e tumores.	72
<b>Figura 21</b>	Eletroforese das amostras de RNA extraídas de tumores após tratamento <i>in vivo</i> com melfalano.	72
<b>Figura 22</b>	Fracionamento eletroforético do RNA extraído das culturas de melanoma após o primeiro ciclo de amplificação.	74
<b>Figura 23</b>	Fracionamento eletroforético do RNA extraído das culturas de melanoma após o segundo ciclo de amplificação.	74
<b>Figura 24</b>	Exemplo da normalização dos dados obtidos para uma das lâminas do experimento onde a amostra (cultura da linhagem B16F10 tratada com PBS) foi marcada com Alexa 555 e a referência com Alexa 647 (Lâmina “main”).	76
<b>Figura 25</b>	Exemplo da normalização dos dados obtidos para uma das lâminas do experimento onde a amostra (cultura da linhagem B16F10 tratada com PBS) foi marcada com Alexa 647 e a referência com Alexa 555 (lâmina “swap”).	77
<b>Figura 26</b>	Exemplo da normalização dos dados obtidos para uma das lâminas do experimento onde a amostra (tumor desenvolvido a partir da inoculação de células da linhagem B16F10 e tratada com melfalano e TNF) foi marcada com Alexa 555 e a referência com Alexa 647 (Lâmina “main”).	78
<b>Figura 27</b>	Representação gráfica tipo MM-plot (razão lâmina “main” X razão lâmina “swap”) para a amostra CF10C1.	79
<b>Figura 28</b>	Representação gráfica tipo MM-plot (razão lâmina “main” X razão lâmina “swap”) para a amostra F10MT11.	80

<b>Figura 29</b>	Gráficos do tipo MA-plot gerados a partir dos dados das amostras de células da linhagem B16F1 e B16F10, tratadas com melfalano, e comparados com a curva correspondente a 99% dos pontos das respectivas amostras-controle.	82
<b>Figura 30</b>	Agrupamento hierárquico das amostras e dos genes diferencialmente expressos em tumores removidos de camundongos tratados com Salina (C), TNF (T), melfalano (M) ou TNF+melfalano (MT).	110
<b>Figura 31</b>	Representação gráfica do Cluster 8 gerado pelo “Self Organizing Map” (SOM).	112
<b>Figura 32</b>	Representação gráfica do Cluster 3 gerado pelo “Self Organizing Map” (SOM).	113
<b>Figura 33</b>	Gráfico de dispersão da razão de intensidade entre a amostra e a referência do gene Mib2 em resposta a cada um dos tratamentos, tanto na cultura das células de melanoma (verde - abordagem <i>in vitro</i> ), quanto nos tumores extraídos dos animais (vermelho - abordagem <i>in vivo</i> ).	116
<b>Figura 34</b>	Gráfico de dispersão da razão de intensidade entre a amostra e a referência do gene Flt1 em resposta a cada um dos tratamentos, tanto na cultura das células de melanoma (verde - abordagem <i>in vitro</i> ), quanto nos tumores extraídos dos animais (vermelho - abordagem <i>in vivo</i> ).	117
<b>Figura 35</b>	Gráficos de dispersão comparando o padrão de expressão gênica para as abordagens <i>in vitro</i> (verde) e <i>in vivo</i> (vermelho) para alguns genes que se foram modulados de forma significativa ( $p > 0,05$ e “fold” $\geq 2,0$ ) nos tumores.	118-9
<b>Figura 36</b>	Diagrama das possíveis interações entre as células do modelo <i>in vivo</i> , tratamentos administrados e genes modulados.	143

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Comparação dos parâmetros histopatológicos dos tumores de camundongos submetidos a tratamento sistêmico com salina (controle), melfalano (MEL), TNF (TNF) ou melfalano + TNF (MEL+TNF).	68
<b>Tabela 2</b>	Comparação dos parâmetros histopatológicos relacionados à densidade vascular dos tumores de camundongos submetidos a tratamento sistêmico com salina controle), melfalano (MEL), TNF (TNF) ou melfalano + TNF (MEL+TNF).	70
<b>Tabela 3</b>	Lista dos genes modulados negativamente por melfalano após tratamento <i>in vitro</i> das linhagens de melanoma B16F1 e B16F10.	83
<b>Tabela 4</b>	Lista dos genes modulados negativamente por TNF após tratamento <i>in vitro</i> das linhagens de melanoma B16F1 e B16F10.	85
<b>Tabela 5</b>	Lista dos genes modulados negativamente por melfalano+TNF após tratamento <i>in vitro</i> das linhagens de melanoma B16F1 e B16F10.	86
<b>Tabela 6</b>	Lista dos genes modulados positivamente por melfalano após tratamento <i>in vitro</i> das linhagens de melanoma B16F1 e B16F10.	87
<b>Tabela 7</b>	Lista dos genes modulados positivamente por TNF após tratamento <i>in vitro</i> das linhagens de melanoma B16F1 e B16F10.	88
<b>Tabela 8</b>	Lista dos genes modulados positivamente por melfalano+TNF após tratamento <i>in vitro</i> das linhagens de melanoma B16F1 e B16F10.	90
<b>Tabela 9</b>	Lista dos genes modulados negativamente na linhagem B16F10 após tratamento <i>in vitro</i> .	91
<b>Tabela 10</b>	Lista dos genes modulados positivamente na linhagem B16F10 após tratamento <i>in vitro</i> .	93
<b>Tabela 11</b>	Lista dos genes modulados negativamente na linhagem B16F1 após tratamento <i>in vitro</i> .	95

<b>Tabela 12</b>	Lista dos genes modulados positivamente na linhagem B16F1 após tratamento <i>in vitro</i> .	96
<b>Tabela 13</b>	Lista dos “Gene symbol” e descrição dos 118 genes diferencialmente expressos.	98
<b>Tabela 14</b>	Lista dos 118 genes com os respectivos p valores encontrados para cada comparação (M = melfalano, C= controle, T=TNF e MT= melfalano + TNF) após a realização do teste de Tukey.	101
<b>Tabela 15</b>	Lista dos 118 genes com os respectivos valores de “fold” encontrados para cada comparação (M = melfalano, C= controle, T=TNF e MT= melfalano + TNF) após a realização do teste de Tukey.	104
<b>Tabela 16</b>	Relação dos genes diferencialmente expressos entre os grupos de tratamento <i>in vivo</i> e o grupo controle que apresentaram $p < 0,05$ ou “fold” $\geq 1,5$ .	107
<b>Tabela 17</b>	Relação dos genes diferencialmente expressos entre os grupos de tratamento <i>in vivo</i> e o grupo controle que apresentaram $p < 0,05$ ou “fold” $\geq 2,0$ .	108
<b>Tabela 18</b>	Clusters obtidos a partir da lista dos 118 genes que apresentaram significância estatística pelo ANOVA, agrupados de acordo com a técnica de SOM (“self organizing map”) onde as amostras se segregaram de acordo com o perfil de expressão imposto por cada um dos tratamentos (MEL, TNF, TNF+MEL ou salina).	111
<b>Tabela 19</b>	Lista de alguns dos genes componentes do SOM 8 (em amarelo) e 3 (verde) e seus respectivos valores de razão encontrados para cada comparação (M = melfalano, C= controle, T=TNF e MT= melfalano + TNF) após a realização do teste de Tukey.	114



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Aff1</b>	AF4/FMR2 family, member 1
<b>ANOVA</b>	Analysis of variance
<b>Aph1c</b>	Anterior pharynx defective 1c homolog
<b>aPKC</b>	Atypical protein kinase
<b>Arhgef6</b>	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor 6
<b>Art5</b>	ADP-ribosyltransferase 5
<b>ASK-1</b>	Apoptosis signal-regulating kinase
<b>BAD</b>	bcl-2 antagonist of cell death
<b>BAX</b>	bcl-2 associated X membrane protein
<b>BCG</b>	bacilo de Cálmette-Guerin
<b>Cbl</b>	Casitas B-lymphoma
<b>Cck</b>	Cholecystokinin
<b>CD34</b>	Cluster of differentiation 34
<b>CD44</b>	Cluster of differentiation 44
<b>CD45</b>	Cluster of differentiation 45
<b>Cdc6</b>	Cell division cycle 6
<b>Cdk1</b>	Cyclin dependent kinase 1
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CHO</b>	Cells of hamster ovary
<b>CLACSF9</b>	C-type lectin domain family 4, member E
<b>CRIB</b>	Cdc42/Rac-interacting binding
<b>cRNA</b>	RNA complementar
<b>DD</b>	death domain
<b>DEPC</b>	Dietileno-pirocarbonato
<b>DL50</b>	dose letal 50%
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified Eagle medium
<b>DMSO</b>	dimetil-sulfóxido
<b>DNA-PK</b>	Proteína-quinase DNA-dependente

<b>dNTP</b>	desoxi-ribonucleotídeos
<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor
<b>ELAM-1</b>	Endothelial-leukocyte adhesion molecule-1
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immuno-sorbent assay
<b>EphB2R</b>	Ephrin B2 receptor
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinase
<b>Fabp4</b>	Fatty acid binding-protein 4
<b>FADD</b>	Fas-associating protein with DD
<b>FLICE</b>	Fas-associated death domain protein interleukin-1beta-converting enzyme
<b>Flt1</b>	FMS-like tyrosine kinase 1
<b>GDP</b>	Guanina-desoxi-ribonucleotídeo-difosfato
<b>GEF</b>	Guanine exchange factor
<b>GIT1</b>	G-protein-coupled receptor kinase-interacting target
<b>Glul</b>	Glutamate-ammonia ligase
<b>gp100</b>	glicoproteína 100
<b>GRB10</b>	Growth factor receptor-bound protein 10
<b>GSR</b>	Glutathiona-redutase
<b>GSTT1</b>	Glutathiona S-transferase $\theta$ 1
<b>GTP</b>	Guanina-desoxi-ribonucleotídeo-trifosfato
<b>HLA</b>	Human Leukocyte Antigen
<b>HUVEC</b>	Human umbilical cord vein endothelial cell
<b>ICAM-1</b>	Intercellular Adhesion Molecule 1
<b>Ifi202b</b>	Interferon activated gene 202B
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>Igfbp3</b>	Insulin growth factor binding-protein 3
<b>IKK-<math>\alpha</math></b>	I $\kappa$ B kinase $\alpha$
<b>IKK-<math>\beta</math></b>	I $\kappa$ B kinase $\beta$
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>IL-4</b>	Interleucina 4

<b>ILK</b>	Integrin-linked kinase
<b>ILP</b>	Isolated Limb Perfusion
<b>iNOS</b>	NO-sintase induzível
<b>JAM2/3</b>	Junctional adhesion molecule 2/3
<b>JNK</b>	c-Jun n-terminal kinase
<b>KD</b>	kilodáton
<b>kif2C</b>	Kinesin family member 2C
<b>L1CAM</b>	L1 cell adhesion molecule
<b>LOWESS</b>	Locally Weighted Scatter-plot Smoothing
<b>LPS</b>	lipopolissacarídeo
<b>MART1</b>	Melanoma Antigen Recognized by T-cells
<b>MCM4</b>	Minichromosome maintenance protein 4
<b>MCM6</b>	Minichromosome maintenance protein 6
<b>MEF</b>	Mouse embrionic fibroblast
<b>MEL</b>	Melphalan
<b>MHC</b>	Major Hystocompatibility Complex
<b>MTT</b>	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
<b>Nck</b>	non-catalytic region of tyrosine kinase
<b>NES</b>	sinal de exportação nuclear
<b>NF-κB</b>	Nuclear factor κB
<b>NIK</b>	NF-κB inducing protein
<b>NK</b>	natural killer
<b>NLS</b>	sinal de localização nuclear
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>p38/MAPK</b>	Mitogen activated protein kinase
<b>PAK</b>	p21-activated kinase
<b>Pard3</b>	Partitioning defective 3 homolog
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered saline
<b>PDGFR</b>	Platelet-derived growth factor receptor
<b>PECAM-1</b>	Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol-3 kinase
<b>PIGF</b>	Placenta growth factor

<b>PLAB</b>	Prostate differentiation factor
<b>PMT</b>	Power of scanner photomultiplier
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$
<b>rh</b>	recombinant human
<b>RIP</b>	Receptor interacting protein
<b>RNA<math>m</math></b>	RNA mensageiro
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute medium
<b>RT – PCR</b>	Reverse transcription - polymerase chain reaction
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate
<b>SEER</b>	Surveillance Epidemiology and End Results
<b>SODD</b>	Silencer of death domain
<b>SOM</b>	Self Organizing Map
<b>SSC</b>	Saline sodium citrate
<b>TACE</b>	TNF-converting enzyme
<b>TAGAP</b>	T-cell activation GTPase activating protein
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor $\beta$
<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>TMA</b>	Tissue-microarrays
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>TNFR</b>	TNF receptor
<b>TRADD</b>	TNF-associated DD protein
<b>TRAF-2</b>	TNF receptor associated factor
<b>TUNEL</b>	Terminal UDP Nick End Labeling
<b>VCAM-1</b>	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
<b>VEGFR</b>	Vascular endothelial growth factor receptor
<b>Zc3hav1</b>	Zinc finger CCCH type, antiviral 1
<b>ZO-1</b>	Zonula occludens 1

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	O melanoma cutâneo	1
1.2	A perfusão isolada de membro (Isolated Limb Perfusion – ILP)	4
1.3	O melfalano	6
1.4	O fator de necrose tumoral	8
1.5	TNF: modelos pré clínicos	13
1.6	Ensaio clínico de perfusão isolada de membro	18
1.7	Hipóteses para o mecanismo de ação da combinação de melfalano e TNF	22
1.8	Análise de expressão gênica global e melanoma	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
2.1	Objetivo Geral	33
2.2	Objetivos Específicos	33
<b>3</b>	<b>ESQUEMA DA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
4.1	Linhagens celulares	37
4.2	Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	38
4.3	Animais	39
4.4	Inoculação e desenvolvimento experimental de tumores	40
4.5	Tratamento <i>in vivo</i> com melfalano e TNF	40
4.6	Remoção cirúrgica dos tumores	41
4.7	Análise histológica dos tumores	42
4.8	Avaliação de densidade vascular dos tumores	43
4.9	Extração de RNA das células e dos tumores	43
4.10	Amplificação de RNA	45
4.11	Preparação do RNA de referência	47
4.12	Marcação de RNA para “microarray”	48

4.13	Análise da expressão gênica por “microarray”	48
4.13.1	Hibridização e leitura das lâminas de “microarray”	50
4.13.2	Análise da qualidade das hibridizações	51
4.14	Outras análises estatísticas	52
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>55</b>
5.1	Avaliação da atividade do melfalano e TNF <i>in vitro</i> contra células de melanoma cutâneo murino	55
5.2	realização dos experimentos <i>in vivo</i> em camundongos inoculados com a linhagem de melanoma B16F10	58
5.2.1	Curvas de crescimento tumoral de B16F10 após tratamento <i>in vivo</i>	58
5.2.2	Curvas de sobrevida livre de progressão e sobrevida livre de eventos de camundongos inoculados com B16F10 após tratamento <i>in vivo</i>	59
5.3	Realização dos experimentos <i>in vivo</i> em camundongos inoculados com a linhagem de melanoma B16F1	61
5.3.1	Curvas de crescimento tumoral de C16F1 após tratamento <i>in vivo</i>	61
5.3.2	Curvas de sobrevida livre de progressão e sobrevida livre de eventos de camundongos inoculados com B16F1 após tratamento <i>in vivo</i>	62
5.4	Análise das curvas de crescimento e sobrevida agrupando os dados de B16F10 e B16B1	64
5.4.1	Curvas de crescimento tumoral de B16F10+B16F1 após tratamento <i>in vivo</i>	64
5.4.2	Curvas de sobrevida livre de progressão e sobrevida livre de eventos de camundongos inoculados com B16F1+B16F10 após tratamento <i>in vivo</i>	65
5.5	Análise histopatológica dos tumores desenvolvidos a partir da inoculação de B16F10 e B16F1 após tratamento <i>in vivo</i>	67
5.6	Análise de densidade vascular dos tumores desenvolvidos a partir da inoculação de B16F1 E B16F10 após tratamento <i>in vivo</i>	69
5.7	Avaliação da qualidade e integridade dos RNA extraídos e amplificados	70
5.8	Análise da qualidade das lâminas de oligonucleotídeos	75
5.9	Análise da expressão gênica após tratamento <i>in vitro</i> de linhagens Celulares de melanoma	80

5.10	Análise do perfil de expressão gênica dos tumores após tratamento <i>in vivo</i>	97
5.11	Comparação entre os dados obtidos pela abordagem <i>in vitro</i> com a <i>in vivo</i>	114
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>120</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>144</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>148</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>150</b>

#### **ANEXOS**

<b>Anexo 1</b>	Determinação da dose tumorigênica e das curvas de crescimento tumoral de cada linhagem celular
<b>Anexo 2</b>	Determinação da dose de melfalano e de TNF e avaliação de resposta ao tratamento <i>in vivo</i>
<b>Anexo 3</b>	Padronização do método de hibridização dos “arrays”
<b>Anexo 4</b>	Gráficos de dispersão (“scatter-plots”) dos valores das razões de intensidade entre a amostra e a referência para alguns genes diferencialmente expressos nos experimentos <i>in vivo</i>





# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O MELANOMA CUTÂNEO

O melanoma cutâneo é uma neoplasia maligna que se origina de melanocitos. Os melanócitos, por sua vez, são células derivadas são células provenientes de precursores celulares derivados primordialmente da crista neural (LOTZE et al. 2002). O melanoma corresponde a 4% de todos os cânceres dermatológicos, mas é responsável por 80% das mortes por câncer de pele, e só 14% dos pacientes com melanoma metastático sobrevivem 5 anos (MILLER e MIHM 2006).

A incidência mundial da neoplasia varia de 0,2:100000 a 40:100000 pessoas por ano, dependendo da região geográfica considerada (LOTZE et al. 2002). No Brasil, no ano de 2006, foram previstos 2.710 casos novos em homens e 3.050 casos novos em mulheres. As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região Sul (Ministério da Saúde 2005). Segundo o *Surveillance Epidemiology and End Results-SEER*, nos EUA, 59.940 indivíduos serão diagnosticados com melanoma e 8.110 morrerão devido à doença no ano de 2007. É o câncer mais incidente entre mulheres dos 20 aos 29 anos de idade, sendo o sétimo câncer mais incidente entre mulheres e o quinto entre homens (TSAO et al. 2004).

Um terço dos pacientes com melanoma cutâneo apresentará progressão da doença em algum momento. Dois terços dos casos de doença metastática ocorrem como metástases loco-regionais, incluindo satelitose, metástases em trânsito (correspondem juntas a 21% dos casos metastáticos) e metástases para linfonodos loco-regionais (correspondem a 50% dos casos). Satelitose é definida como o

surgimento de nódulos metastáticos a não mais que 2,0 cm da lesão primária. Metástases em trânsito são aquelas que surgem dentro da área de drenagem linfática do tumor, a mais de 2,0 cm da lesão primária, mas antes da primeira bacia de drenagem linfática. Estas metástases podem preceder o surgimento de metástases linfonodais regionais. Todos estes casos são considerados como estágio III. Os tumores localizados nos membros inferiores têm uma tendência maior a sofrerem disseminação loco-regional, antes de originarem metástases à distância, quando comparados a tumores da cabeça, pescoço, tronco e membros superiores. A sobrevida global em cinco anos nestes casos gira em torno de 50% (LEITER et al. 2004).

A excisão cirúrgica ampla é o tratamento de escolha do melanoma cutâneo nos estágios iniciais, na doença localmente avançada e, eventualmente, em casos selecionados de doença metastática. Os pacientes com tumores iniciais com mais de 1,0 mm de espessura ( $\geq T2a$ ), ou tumores mais finos, mas com características de mau prognóstico, são submetidos à pesquisa de linfonodo sentinela (primeiro linfonodo que drena diretamente a lesão primária), e quando este é positivo ( $\geq pN1a$ ), são submetidos à linfadenectomia seletiva e eventual tratamento adjuvante (ROSSI et al. 2002; TSAO et al. 2004). A sobrevida global em 5 anos destes pacientes varia de 89% (para tumores  $pT2apN0M0$ ) a 26,7% (para tumores  $pT$ qualquer $N3M0$ ), quando submetidos apenas à cirurgia (BALCH et al. 2001). O tratamento adjuvante quando necessário, emprega interferon em doses altas e está associado a uma redução no risco relativo no risco relativo de recorrência (HR-0.83, 95%IC 0.77 - 0.90,  $p=0,000003$ ), mas sem impacto significativo na sobrevida global (HR-0.93, 95%IC 0.85 - 1.02,  $p=0.1$ ) (WHEATLEY et al. 2003).

De forma geral, o melanoma é uma neoplasia pouco sensível à radioterapia e à quimioterapia sistêmica, o que dificulta o tratamento de casos avançados (LOTZE et

al. 2002). Pacientes com metástases à distância apresentam uma sobrevida mediana de 6 a 10 meses, com menos de 5% vivos após 5 anos. As drogas mais empregadas no tratamento da doença sistêmica são a interleucina-2, com taxas de resposta em torno de 16% e maior sobrevida livre de progressão naqueles que atingem resposta completa, e a dacarbazina, com taxas de resposta de 15 a 20%. Nenhum estudo mostrou de forma consistente que os resultados da poliquimioterapia ou da combinação de quimioterapia e imunoterapia são superiores aos obtidos com a dacarbazina isolada até o momento (TSAO et al. 2004).

Nos casos em que se observam metástases em trânsito ou em casos localmente avançados e irresssecáveis, acometendo extremidades, o tratamento convencional é a amputação do membro afetado, o que leva a taxas de cura a longo prazo de 21 a 33% (CORNETT et al. 2006). Entretanto, atualmente a perfusão isolada de membro (ILP) tem se apresentado como uma alternativa menos mórbida e mutilante (ROSSI et al. 2002); muito embora em casos onde o número e o tamanho das lesões são pequenos, outras opções de tratamento como fulguração, ablação com laser, crioterapia, ablação por radiofrequência, excisão cirúrgica simples ou injeção local de citotóxicos devam ser tentadas antes (De WILT e THOMPSON 2004).

## **1.2 A PERFUSÃO ISOLADA DE MEMBRO (ISOLATED LIMB PERFUSION – ILP)**

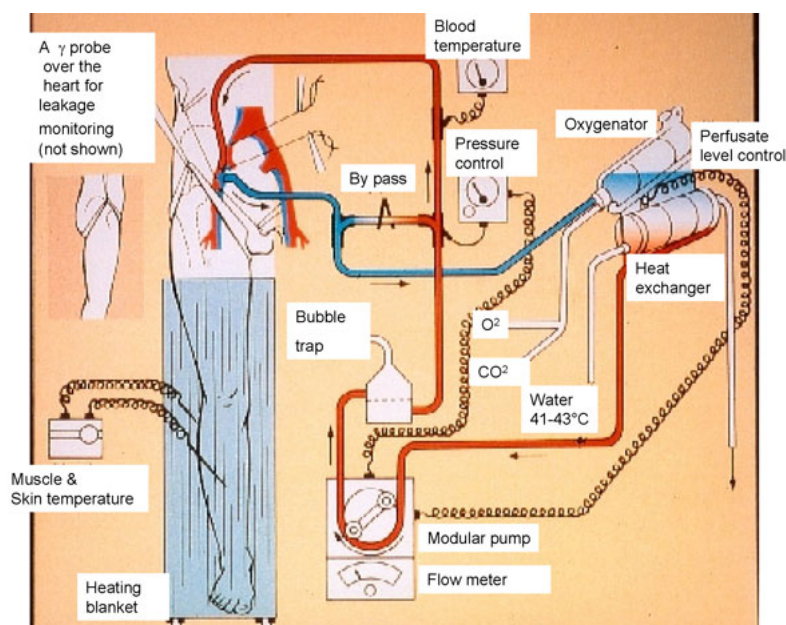
A perfusão isolada de membro (ILP) foi inicialmente concebida nos EUA no final da década de 50, por CREECH et al. (1958), e seu racional era poder oferecer doses elevadas de uma determinada droga a um membro acometido por uma neoplasia avançada, no intuito de obter controle local do tumor com preservação do membro. Posteriormente, observou-se que quando o membro perfundido era mantido em estado de hipertermia isso provoca um efeito sinérgico com a droga que estava sendo administrada no membro doente (STEHLIN 1969).

A perfusão hipertérmica isolada de membro consiste na canulação da veia e artéria principais que irrigam o membro afetado pelo tumor, associada à ligadura dos vasos colaterais a fim de reduzir a difusão sistêmica das drogas empregadas no procedimento. O membro é, então, perfundido continuamente durante aproximadamente 90 minutos com sangue contendo uma solução colóide, onde as drogas utilizadas são diluídas. O perfusato é aquecido no intuito de manter o membro tratado a aproximadamente 38°C e oxigenado.

Ao término do procedimento, o membro é perfundido com solução colóide (Dextran) para lavar o excesso de drogas na vasculatura e é, outrossim, restabelecido o fluxo sanguíneo normal (Figura 1) (EGGERMONT et al. 1996). A ILP permite atingir concentrações das drogas no leito tumoral cerca de 20 vezes maiores do que as obtidas com a administração sistêmica, sem aumento significativo da toxicidade (LIENARD et al. 1994). A ILP empregando MEL alcança taxas de resposta completa que variam entre 40 e 50% (LIENARD et al. 1994, DE WILT e THOMPSON 2004). Além disso, a qualidade de vida dos pacientes, após recuperação do procedimento, é

semelhante ou melhor do que a de indivíduos saudáveis da população geral, embora exponham alguns problemas específicos relacionados à doença e ao tratamento empregado numa frequência mais alta que a da população geral: medo de recorrência da doença e ou de metástases, preocupações cosméticas e queixas relacionadas à função do membro tratado (NOORDA et al. 2007).

Atualmente, a ILP é um procedimento reservado para o tratamento de pacientes com metástases em trânsito ou tumores acometendo isoladamente uma extremidade, com grande volume de doença (tumores maiores que 3,0cm ou mais de 15 lesões em trânsito), mas sem metástases à distância (GRUNHAGEN et al. 2006a).



**Legenda:** Na ILP, após canulação da veia e artéria principais do membro a ser perfundido e ligação dos vasos colaterais para evitar escape sistêmico das drogas, o membro é perfundido com quimioterápico (melfalano) associado ou não à bioterápicos (fator de necrose tumoral, interferon gama) diluídos em sangue, que é aquecido e oxigenado continuamente. Ao término da perfusão o membro é lavado com uma solução de Dextran.

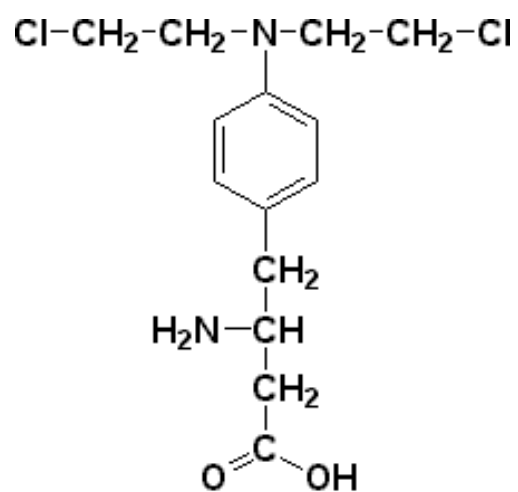
**Fonte:** LEJEUNE et al. (2006)

**Figura 1** - Diagrama esquemático do procedimento de uma perfusão isolada de membro.

### 1.3 O MELFALANO

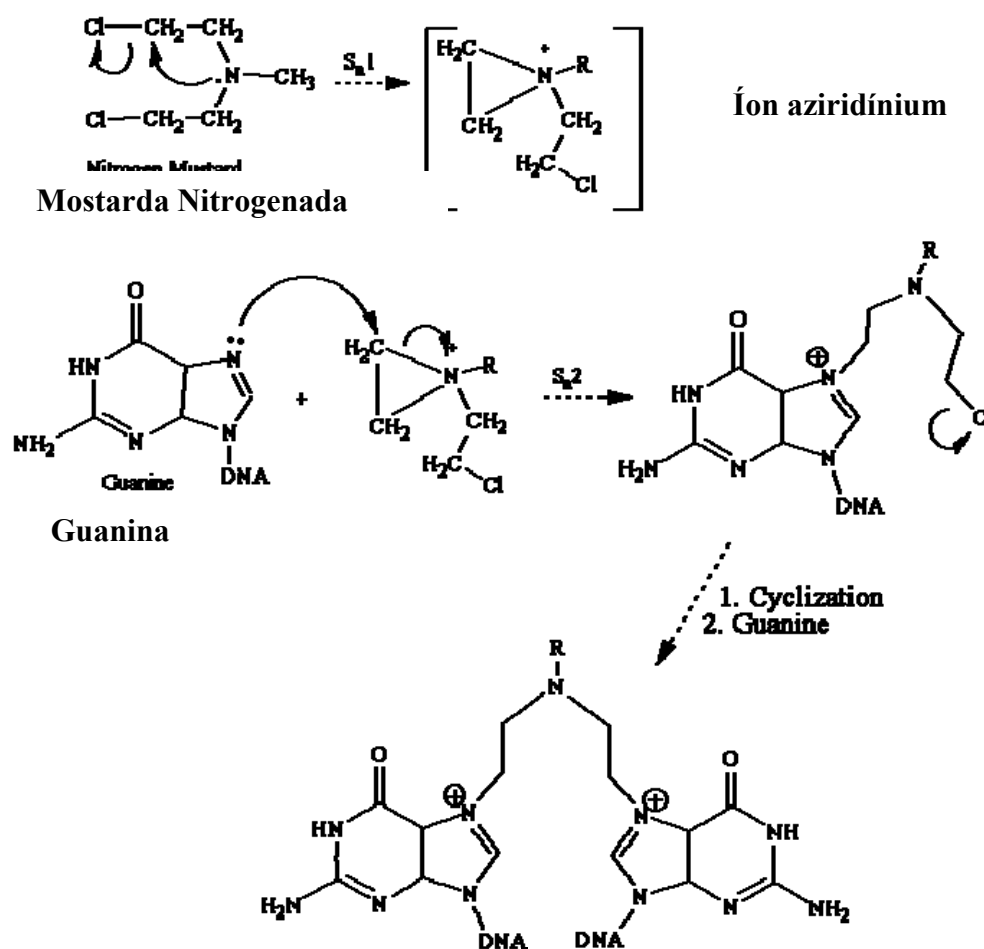
O melfalano (MEL) (Figura 2) é uma droga alquilante bifuncional do grupo das mostardas nitrogenadas e age basicamente pela formação de ligações cruzadas entre bases nitrogenadas da molécula de DNA, mediada pelo ataque de compostos intermediários altamente reativos a sítios nucleofílicos, interferindo no processo de síntese e replicação do DNA (CALABRESI e CHABNER 1996). Em solução aquosa cada uma das cadeias cloro-etil laterais do melfalano pode ciclizar e originar um íon aziridínium capaz de reagir com sítios nucleofílicos no DNA. O mono-aduto resultante pode gerar um novo íon aziridínium e reagir com o solvente ou com outro sítio nucleofílico próximo, formando uma ligação cruzada entre o DNA e uma proteína, ou entre duas bases nitrogenadas da molécula de DNA (Figura 3) (BAUER et al. 1997). O melfalano reage em grande parte com a guanina na posição N7, formando ligações cruzadas interfitas onde houver as seqüências GGC, GGCC e GAC; em menor proporção ele reage com a adenina na posição N3, em regiões ricas em AT, formando ligações cruzadas com guaninas próximas. A segunda reação de alquilação mediada pelo melfalano, embora mais lenta, é mais estável, o que, talvez, explique a maior citotoxicidade da droga quando comparada a outras mostardas nitrogenadas (POVIRK e SHUKER 1994; BAUER et al. 1997).

O melfalano é utilizado com maior freqüência no tratamento de doenças hematológicas, principalmente o mieloma múltiplo ou em protocolos de condicionamento pré-transplantes de medula óssea (ATTAL et al. 1996; GARBAN et al. 2006; PALUMBO et al. 2006). O melanoma cutâneo é habitualmente uma neoplasia resistente aos efeitos do melfalano quando este é administrado de forma sistêmica, sendo ILP, portanto, a única aplicação desta droga em melanoma.



**Legenda:** Estrutura planar da molécula de melfalano

**Figura 2** - Molécula de melfalano.



**Legenda:** Sequência de eventos durante a formação de adutos com o DNA da molécula de mostarda nitrogenada. A cadeia alquil lateral sofre ciclização formando um íon aziridínium que reage com radicais nucleofílicos (nitrogênio na posição 7 da molécula de guanina) formando um mono-aduto inicialmente. Posteriormente, a outra cadeia alquil sofre também ciclização e reage com outro radical nucleofílico, no caso, outra guanina, formando uma ligação cruzada intra-fita.

**Figura 3** - Mecanismo de ação das mostardas nitrogenadas.

## 1.4 O FATOR DE NECROSE TUMORAL

CARSWELL et al. (1975) foram os primeiros a descrever o fator de necrose tumoral (tumor necrosis factor – TNF) como um fator solúvel protéico mediador dos processos associados à necrose hemorrágica de tumores em camundongos, inoculados subcutaneamente com várias linhagens tumorais (sarcoma, leucemia, mastocitoma) e infectados com bacilo de Cálmette-Guerin (BCG), após tratamento com endotoxina.



O efeito do TNF foi mais pronunciado em tumores bem estabelecidos (implantes com sete dias) e a máxima intensidade de necrose foi observada 24h após a administração, embora alguma reação já fosse evidente após 3 a 4 horas.

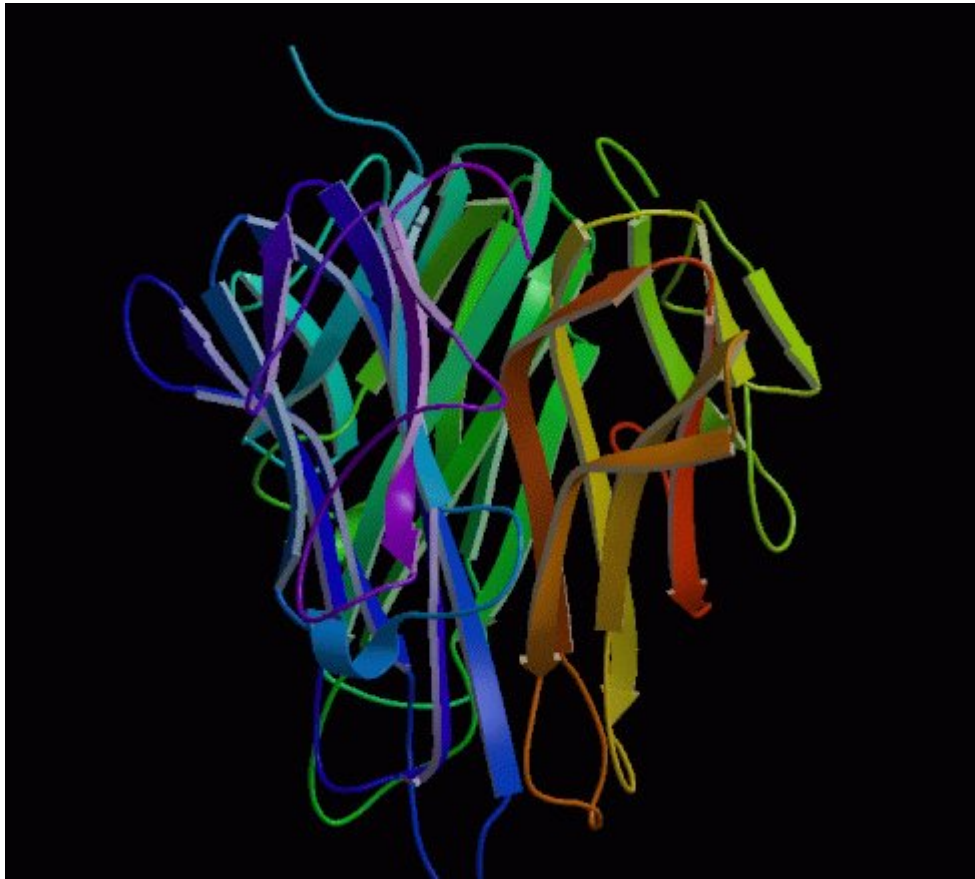
O fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF) é sintetizado como uma proteína de 233 aa ancorada à membrana celular chamada pró-TNF. Esta sofre clivagem na sua porção justa-membranal por uma protease semelhante às metaloproteinases chamada TACE (TNF-converting enzyme), liberando uma proteína trimérica de 39 KD e 157 aa, com formato de sino, onde o terminal-amino encontra-se voltado para o ápice. A proteína solúvel é formada por três subunidades de 17KD, com estrutura predominantemente  $\beta$ -pregueada anti-paralela, dobrada sobre si mesma como um rocambole (Figura 4). Em pH ácido esta estrutura assume conformação em  $\alpha$ -hélice, tornando-se capaz de inserir-se em membranas e funcionar como um canal, eventualmente participando dos mecanismos de toxicidade celular diretamente (revisado em ZHANG e TRACEY 1998).

Os principais tipos celulares produtores de TNF são os fagócitos mononucleares ativados, embora células NK, mastócitos estimulados por interleucina-3 e linfócitos citotóxicos também a produzam em menor escala. Os principais estímulos para a síntese de TNF são agonistas de receptores do tipo TOLL (TLR) tais como LPS ou outros produtos microbianos. A modulação da expressão de TNF também é feita por vários outros fatores e citocinas capazes tanto de estimular (IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$ , complemento, NF- $\kappa$ B, AP-1), quanto inibir (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , corticóides) sua síntese (revisado em ZHANG e TRACEY 1998).

O TNF está envolvido na regulação do processo inflamatório promovendo, por exemplo, quimiotaxia e ativação de polimorfonucleares, aumento das propriedades pró-coagulantes do endotélio, redução da atividade da proteína C, indução da

produção de proteínas de fase aguda, aumento da expressão de moléculas de HLA classe I pelo endotélio e fibroblastos dérmicos, atividade mitogênica sobre fibroblastos (revisado em WALLACH 2001). Além disso, TNF apresenta atividade tumoricida contra várias linhagens celulares *in vitro* e *in vivo*, podendo potencializar a atividade antineoplásica de várias drogas e ativar a resposta imune antitumoral. Essa citotoxicidade é observada mesmo contra linhagens celulares não malignas, como células endoteliais. O TNF também promove o rearranjo dos filamentos de actina do citoesqueleto celular e a desorganização de “tight-junctions”, com conseqüente síndrome de extravasamento capilar quando atua sobre o endotélio (revisado em ZHANG e TRACEY 1998; LEJEUNE et al. 2006).

Existem dois tipos de receptores de alta afinidade para o TNF: tipo I (TNF-R1 ou p55/p60) e tipo II (TNF-R2 ou p75/p80). Ambos são proteínas transmembrana com um domínio extracelular, contendo repetições de 40 aa, rico em cisteína e um domínio intracelular sem atividade enzimática intrínseca. O TNFR1, diferentemente do receptor do tipo 2, possui um domínio de morte (DD –“death domain”) na região intracelular. A maior parte da atividade pró-inflamatória de TNF é mediada por TNF-R1 (adesão de leucócitos, indução de VCAM-1, ICAM-1, CD44, MHC de classe I e NF- $\kappa$ B, proliferação celular, citotoxicidade e citostase), presente em todos os tipos celulares. A função de TNF-R2, encontrado em células do sistema imune, hematopoiéticas, miócitos cardíacos, próstata e endotélio, é menos clara, mas parece estar associada à citotoxicidade e proliferação de timócitos e células B e T (revisado em AGGARWAL et al. 2001).



**Fonte:** [www.nanea.dk/cytokinesnps](http://www.nanea.dk/cytokinesnps)

**Legenda:** Modelo tridimensional de fita da molécula trimérica de TNF (forma solúvel). Cada subunidade da estrutura trimérica está ressaltada por cores diferentes (azul e violeta, verde, e laranja e vermelho). As setas indicam as regiões de conformação  $\beta$ -pregueada.

**Figura 4** – Estrutura tridimensional do TNF – forma solúvel.

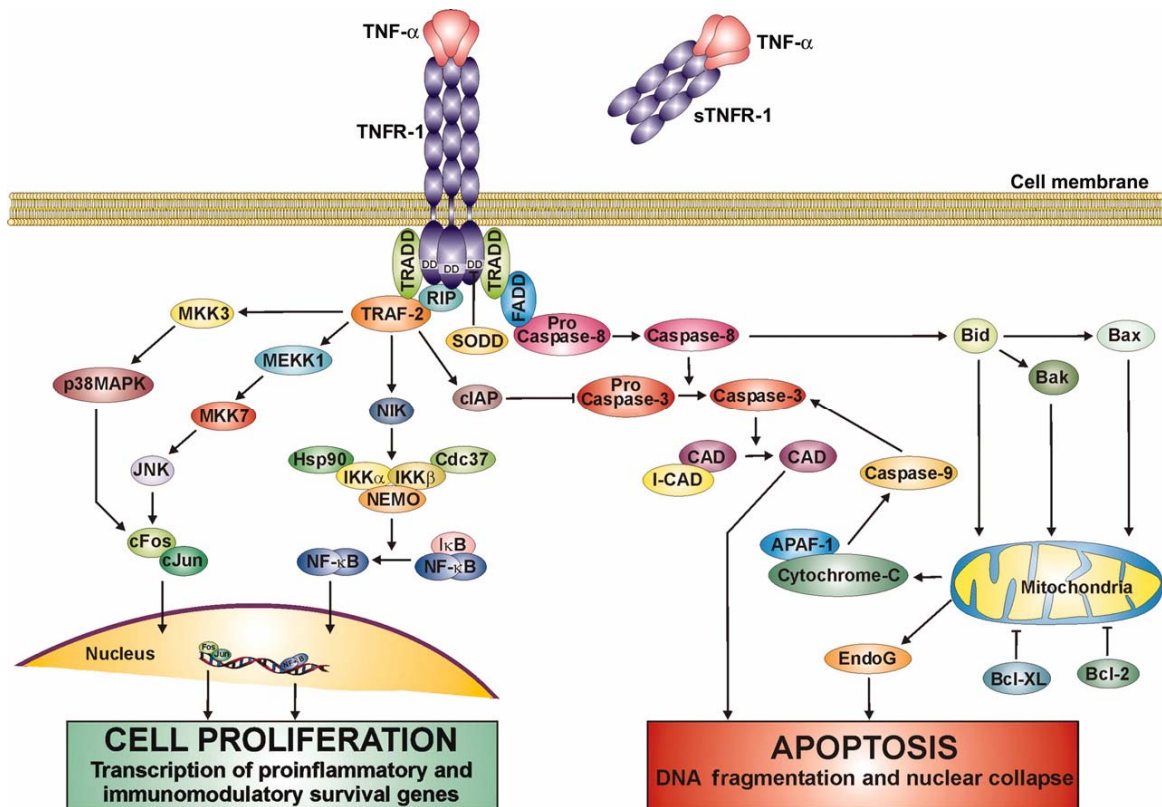
O TNF-R1 tem 55 KD e o TNF-R2, 75 KD, e ambos possuem 03 sítios extracelulares para N-glicosilação. A porção intracelular do receptor do tipo I contém uma região de 80 resíduos de aminoácidos, chamada de “death domain” (DD) (domínio de morte), homóloga à Fas, “death receptor” (DR)-3, DR-4, DR-5 e DR-6. O receptor do tipo II tem no lugar do DD uma região rica em serina que sofre fosforilação após interação com o ligante. Após a interação do receptor com o ligante, ocorre a formação de um complexo trimérico pela ligação de mais duas moléculas do receptor.

Os receptores de TNF existem na forma ligada à membrana ou livre, que resulta da ação da enzima TACE sobre a primeira, que modula ou inibe a ação de TNF ou funciona como um reservatório de TNF, dependendo do contexto.

O receptor humano e o murino compartilham cerca de 64% de homologia para TNF-R1, e 62% para TNF-R2. O TNF-R1 humano é capaz de ligar tanto TNF humano, quanto murino; enquanto que o TNF-R2 humano não reconhece o TNF murino (revisado em AGGARWAL et al. 2001; van HORSSSEN et al. 2006). Em camundongos, por sua vez, só o TNFR1 é ativado quando se liga ao TNF humano (GLOSLI et al. 2004).

Após a ligação de TNF, o TNF-R1 sofre trimerização, libera SODD (silencer of death domain), e recruta TRADD (TNF-associated DD protein) através do DD. Esta, por sua vez, liga-se a TRAF-2 (TNF receptor associated factor) ou FADD (Fas-associating protein with DD). TRAF-2 pode-se ligar à NIK (NF- $\kappa$ B inducing protein), que fosforila IKK- $\alpha$  (I $\kappa$ B kinase  $\alpha$ ) e IKK- $\beta$  (I $\kappa$ B kinase  $\beta$ ), que fosforilam I $\kappa$ B e liberam NF- $\kappa$ B, ou ainda, ligar-se a ASK-1 ou RIP (receptor interacting protein), que assim, fosforilam e ativam JNK (c-Jun n-terminal kinase) e p38/MAPK (mitogen activated protein kinase). A ligação de TRADD a FADD ativa FLICE (caspase 8) que, desta feita, ativa várias caspases, induzindo apoptose e morte celular. TNF-R2 parece interagir diretamente com TRAF-1 ou TRAF-2, ativando NF- $\kappa$ B e JNK à semelhança do TNF-R1 (Figura 5) (revisado em AGGARWAL et al. 2001; SZLOSAREK e BALKWILL 2003; van HORSSSEN et al. 2006).

O TNF-R2 parece ligar-se a TRAF-2 diretamente, ativando NF- $\kappa$ B e JNK de forma semelhante ao receptor do tipo I (revisado em AGGARWAL et al. 2001).



Fonte: VAN HORSSSEN et al. (2006)

Legenda: Após ligação de TNF ao receptor 1 de TNF este sofre trimerização, liberando SODD e recrutando TRADD, TRAF-2 e RIP que ativam vias de sobrevivência e proliferação celular, ou TRADD e FADD, que ativam vias de apoptose.

Figura 5 – Via de sinalização de TNFR-1.

## 1.5 TNF: MODELOS PRÉ CLÍNICOS

Em ensaios pré-clínicos o TNF mostrou atividade antitumoral, promovendo necrose e regressão tumoral, quando empregado isolado ou em combinação com o interferon- $\gamma$  no tratamento de tumores (melanomas e sarcomas) murinos e humanos.

Helson e colaboradores mostraram inibição de crescimento *in vitro* de uma linhagem de melanoma tratada com TNF (HELSON et al. 1975). O tratamento de camundongos inoculados subcutaneamente com uma linhagem de carcinoma mamário e tratados com TNF e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) induziu destruição do endotélio vascular tumoral, necrose e apoptose das células tumorais, precedidos por migração de polimorfonucleares, adesão de plaquetas ao endotélio e eritróstase. Observou-se

também elevação dos níveis de mRNA para TNF, TNF-R1(TNF receptor 1 - receptor 1 do fator de necrose tumoral), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1 – molécula de adesão intercelular 1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1 – molécula de adesão vascular 1), P-selectina e interleucina-6 (IL-6) (DE KOSSODO et al. 1995). A associação de rhTNF (recombinant human TNF – TNF recombinante humano) à ciclofosfamida, 5- fluorouracil ou doxorubicina, no tratamento de camundongos inoculados com uma linhagem imunogênica de sarcoma humano, mostrou um aumento significativo da taxa e duração da resposta, quando comparada com os tratamentos com o tratamento com os citotóxicos ou o rhTNF isoladamente. A combinação de ciclofosfamida e rhTNF, contudo, não foi efetiva contra uma linhagem de sarcoma não-imunogênica (KROSNICK et al. 1989).

A administração de rhTNF (6-10 $\mu$ g) a camundongos portando sarcomas promoveu necrose central importante dos tumores 24h após a inoculação da droga, provocando redução do tamanho dos tumores quando comparado aos controles, e aumento de sobrevivência dos camundongos inoculados com linhagens imunogênicas; nestas as áreas de necrose eram substituídas por células inflamatórias. Neste caso, via-se o crescimento do tumor ao redor da área central de necrose 72h após a administração do rhTNF. Além disso, os autores observaram maior mortalidade dos camundongos portadores de tumor, quando tratados com rhTNF na dose de 10 $\mu$ g, em comparação aos controles, 48h depois do tratamento, apesar da meia-vida da droga ser de apenas 30 $\pm$ 2min (ASHER et al. 1987).

Semelhantemente, verificou-se que a administração paralesional ou intraperitoneal de TNF recombinante humano (5 $\mu$ g ou 25 $\mu$ g) ou murino (10 $\mu$ g), isoladamente ou em combinação com IFN- $\gamma$ , foi capaz de causar redução ou retardo de crescimento de tumores induzidos pela inoculação subcutânea de 5,0x10<sup>6</sup> células

de melanoma da linhagem B16BL6. No caso da via de inoculação paralesional, o efeito de redução tumoral só foi observado nas doses maiores de rTNF humano. A aplicação de rTNF humano ou IFN- $\gamma$  isoladamente por via intraperitoneal mostrou-se significativamente inferior, induzindo apenas retardo de crescimento do tumor, mas sem promover necrose tumoral total, enquanto que o rTNF murino isolado foi capaz de promover necrose tumoral total, embora após um período de latência maior (13 dias). A co-administração intraperitoneal de rTNF e IFN- $\gamma$ , contudo, foi capaz de desencadear necrose dos tumores. Apesar do rhTNF ter-se mostrado ativo *in vivo*, sua atividade anti-tumoral foi significativamente aumentada pela associação do IFN- $\gamma$ , enquanto que a adição do IFN- $\gamma$  ao rTNF murino basicamente não modificou a intensidade do efeito tumoricida. O tratamento da linhagem B16BL6 *in vitro* com rTNF não induz citotoxicidade, a não ser após tratamento com IFN- $\gamma$  murino (BROUCKAERT et al. 1986).

HARANAKA et al. (1984) mostraram que o tratamento com TNF murino, por via intravenosa, de camundongos inoculados subcutaneamente com oito linhagens diferentes de tumor (MethA, Colon26, Lewis lung, B16, sarcoma 180, Erlich, MM46 e MH134) induziu necrose e redução dos tumores para todas as linhagens testadas, com início da necrose após 24h e redução dos tumores após 2 a 3 dias. Observaram também hemorragia nos tumores derivados de B16 e Colon26. O TNF murino também se mostrou ativo contra tumores derivados de linhagens tumorais humanas inoculadas em camundongos “nude”, tratados por via intravenosa ou intratumoral, embora esta última via tenha sido mais efetiva.

Foi demonstrado, em modelos animais, que a administração combinada de MEL e TNF, utilizando ILP leva a um aumento da atividade antitumoral contra sarcomas de partes moles e melanoma.

MANUSAMA et al. (1996) trataram ratos da linhagem BN, portadores de implantes subcutâneos de sarcomas da linhagem BN175, sensível ao TNF *in vitro*, implantados subcutaneamente, com perfusão isolada do membro afetado com salina, melfalano (40µg), TNF (50µg) ou a combinação das duas drogas. Nos animais tratados com salina ou TNF apenas não foi observada inibição do crescimento tumoral ou progressão da doença. Nos animais que receberam melfalano somente, verificou-se parada do crescimento do tumor em todos os animais tratados por pelo menos 4 dias. Já a combinação promoveu remissão completa dos tumores em 12 animais de 16 tratados. Reaparecimento do tumor foi observado em 8 animais cerca de 11 dias após a perfusão. A análise histológica demonstrou necrose hemorrágica em todos os animais que receberam TNF, contudo esta foi muito mais extensa quando se administrou a combinação de TNF e melfalano.

Outro estudo mostrou resultados semelhantes. Nos animais tratados com melfalano isoladamente havia mais de 80% do tumor viável após a perfusão, com áreas de necrose de coagulação e células com núcleo fragmentado, compatíveis com células em apoptose. Nos tumores coletados após 2 horas do tratamento com TNF, via-se, nos cortes histológicos, intenso edema intersticial, congestão vascular e extravasamento focal de eritrócitos. Após 4 horas, detectava-se intensa congestão vascular e hemorragia difusa. E após 24 horas, observava-se 20-60% de hemorragia e necrose central. Os tumores de animais tratados com a combinação de TNF e melfalano apresentavam achados semelhantes aos acima descritos, no entanto, a necrose e hemorragia observadas 24 horas após a perfusão eram muito mais extensas (80-90%). A eletromicroscopia revelou eritrostase e degeneração das células endoteliais (células com citoplasma lucente e edema mitocondrial) nos tumores perfundidos com TNF isolado ou em combinação, sendo as alterações mais intensas



neste último grupo (NOOIJEN et al. 1996). Essa potencialização da atividade antitumoral pelo TNF na ILP foi observada contra sarcoma, mesmo empregando outros quimioterápicos como actinomicina - D no estudo de SEYNHAEVE et al. (2002).

BAUER et al. (2003) avaliaram o efeito da ILP com melfalano isolado ou em combinação com TNF recombinante humano (50µg/membro) no tratamento de um modelo de xeno - enxerto de melanoma cutâneo humano em ratos “nude” e verificaram uma redução média da área de tumor viável de 0%, 22±13%, 61±14% e 100%, respectivamente, para os animais tratados com salina, TNF, melfalano e TNF+melfalano. Não houve, neste estudo, um aumento significativo do nível de melfalano livre intratumoral quando comparados os grupos tratados com melfalano apenas e melfalano e TNF. Não se observou sinergismo entre o melfalano e o TNF *in vitro* contra a linhagem de melanoma empregada (NIH1286). FURRER et al. (1997), entretanto, não observaram uma maior redução de tumores em camundongos “nude” portadores de xeno - enxertos de melanoma humano (Mel197.2) após tratamento com a combinação de rTNF humano e melfalano. O melfalano inibiu o crescimento tumoral em todos os animais tratados nas duas doses empregadas (9mg/Kg por 3 doses ou 6mg/Kg por 3 doses), mas não houve diferença na intensidade do efeito quer seja entre as duas doses empregadas, ou após adição do rTNF (50µg/Kg). O crescimento dos tumores nos animais tratados com rTNF humano foi igual ao do grupo controle. Contudo, as drogas foram administradas por via intraperitoneal e foi usado rTNF humano (o TNF humano age apenas sobre o receptor de 55KD murino) o que pode ter contribuído para os resultados negativos (FURRER et al. 1997).

DE WILT et al (1999) observaram aumento da concentração tissular de melfalano, medida por cromatografia gasosa – espectrometria de massa, após ILP de

ratos portadores de sarcoma, nos animais tratados com a combinação TNF+melfalano em comparação com aqueles que receberam melfalano apenas (DE WILT et al. 2000). O mesmo autor demonstrou, em modelo animal com ratos, que a hipóxia era capaz de aumentar a atividade antitumoral do TNF ou melfalano isolados na ILP, mas não da combinação. A temperatura do perfusato também parece interferir nos resultados do tratamento. Em temperaturas variando entre 24-26°C toda atividade antitumoral é perdida, enquanto que acima de 42°C havia um aumento dramático da toxicidade local com perda da função do membro. Os melhores resultados foram obtidos com temperaturas na faixa de 38-39°C.

Outro grupo verificou que a atividade do melfalano na ILP era aumentada quando se induzia acidose no perfusato, que tal resposta era mediada, pelo menos em parte, pela síntese de óxido nítrico (NO), uma vez que a inibição da NO-sintase induzível (iNOS) bloqueava o efeito de melfalano sobre a redução dos tumores e reduzia o número de células em apoptose no tumor (KELLEY et al. 2002).

## **1.6 ENSAIOS CLÍNICOS DE PERFUSÃO ISOLADA DE MEMBRO**

Várias séries e estudos de fase II mostraram que a combinação de TNF e melfalano, associado ou não a interferon -  $\gamma$ , na ILP para o tratamento de metástases em trânsito de melanoma e melanomas de extremidades irresssecáveis, se correlaciona com taxas de resposta objetiva variando de 66-100% e de resposta completa de 40-90% (a taxa de resposta completa com o melfalano isolado varia de 45-52%), permitindo evitar ou retardar a amputação do membro afetado em 84% dos casos (LIENARD et al. 1994; EGGERMONT et al. 1996; LIENARD et al. 1999; van ETTEN et al. 2003; NOORDA et al. 2004; GRUNHAGEN et al. 2004;

GRUNHAGEN et al. 2006b; HAYES et al. 2007). A sobrevida global em 5 anos varia de 29 a 42%, muito semelhante à esperada para os pacientes tratados cirurgicamente que é de 25-30% (TYLER 2004; GRUNHAGEN et al. 2006a). Sexo feminino e estágio IIIA parecem estar associados a maiores taxas de resposta, enquanto pacientes com história de tratamento sistêmico prévio e tumores maiores que 1,4cm<sup>2</sup> apresentaram piores resultados clínicos após este tratamento (ZOGAKIS et al. 2001; NOORDA et al. 2004). O desenvolvimento de resposta completa e tumores com menos de 3,0cm se correlacionaram com aumento de sobrevida (NOORDA et al. 2004).

ROSSI et al. (2004) relataram uma série de 20 pacientes portadores de metástases em trânsito de melanoma de grande volume (>15 lesões ou pelo menos uma lesão > 3 cm – doença “bulky”) submetidos à ILP hipertérmica com melfalano e doses baixas de TNF (1mg) e observaram taxas de resposta completa de 70% e parcial de 25%, com baixa toxicidade sistêmica (95% de toxicidade grau 1 e 2). Além disso, estudos de farmacodinâmica com ILP em sarcomas de partes moles, mostraram que esta dose de TNF era suficiente para alcançar uma concentração no perfusato 20 vezes superior a necessária para toxicidade *in vitro*.

Um estudo de fase III, randomizado, com 103 pacientes, comparando ILP com melfalano isolado versus ILP com melfalano associado a TNF e IFN –  $\gamma$  no tratamento de pacientes com metástases em trânsito de melanoma de extremidades mostrou um aumento da taxa de resposta completa para quem recebeu a combinação (58% x 72%), principalmente nos pacientes com grande volume tumoral (58% x 19%). Contudo, não houve diferença quanto à taxa de resposta global (96% x 81%), a taxa de recorrência local (58% x 58%), sobrevida mediana livre de doença (14 meses x 12 meses) ou sobrevida global (56% x 56%) (FRAKER et al. 2002).

O estudo Z0020, do American College of Surgeons Oncology Group, comparou a eficácia da ILP hipertérmica com melfalano ou melfalano+TNF no tratamento de melanomas cutâneos de extremidade localmente avançados. O estudo incluiu 133 pacientes, sendo o tratamento concluído em 124 destes, de Março de 1999 a Janeiro de 2004. As taxas de resposta completa em três meses nos braços com melfalano apenas e melfalano+TNF foram, respectivamente, de 25% x 26% ( $p=0,890$ ), e as taxas de resposta objetiva foram de 64% x 69% ( $p=0,435$ ). Significativamente mais eventos adversos grau 4 foram observados nos pacientes que receberam melfalano+TNF (17% x 11%,  $p=0,028$ ). A taxa de resposta completa em seis meses foi superior nos pacientes tratados com melfalano+TNF, embora não estatisticamente significativa (42% x 20%,  $p=0,101$ ), e 80% dos pacientes que atingiram resposta completa após 3 meses mantiveram esta resposta aos 6 meses nos pacientes tratados com melfalano+TNF, comparado a apenas 65% nos pacientes que receberam melfalano isolado (CORNETT et al. 2006).

A utilização de ILP com melfalano de forma profilática após excisão cirúrgica foi avaliada num estudo prospectivo, fase III, com 832 pacientes, comparando cirurgia apenas versus cirurgia seguida de ILP hipertérmica com melfalano no tratamento de indivíduos portadores de melanoma com Breslow  $\geq 1,5$ mm de extremidade, sem satelitose, metástases em trânsito, metástases sistêmicas ou em linfonodos regionais. Após um seguimento mediano de 6,4 anos, não houve diferença em sobrevida global ou livre de metástases entre os dois braços do estudo. Contudo, observou-se um maior intervalo livre de doença (ILD) ( $p=0,018$ ) no grupo que recebeu ILP às custas da redução das metástases em trânsito (6,6% x 3,3%) e das metástases em linfonodos regionais (16,7% x 12,6%), tal benefício foi maior nos pacientes que não foram submetidos à dissecação linfonodal extensa. Além disso, a análise de subgrupos

mostrou que pacientes com tumores com Breslow  $\geq 3,0$ mm não obtiveram redução do ILD, devido a uma maior taxa de recorrência sistêmica (KOOPS et al. 1998). Uma revisão sistemática de quatro estudos, englobando 1038 pacientes, avaliando o papel da ILP profilática após ressecção cirúrgica, incluindo o estudo citado acima, não encontrou evidência suficientemente sólida de um benefício inequívoco do procedimento e os autores consideram que o mesmo não pode ser recomendado como rotina nesta indicação (LENS e DAWES 2003).

Desta forma a ILP com melfalano é uma alternativa eficaz à amputação no tratamento de melanomas de extremidades ou metástases em trânsito de melanoma que permite a preservação do membro afetado sem prejuízo da sobrevida global em mais de 85% dos casos. A adição do TNF parece melhorar o resultado do tratamento, particularmente quando existe doença “bulky” ou doença recorrente após ILP com melfalano isolado (GRUNHAGEN et al. 2006a; LEJEUNE et al. 2006).

Estudos de fase I e II mostraram que a administração sistêmica de TNF se associa à toxicidade no sítio de administração e sistêmica grave em doses tão baixas quanto  $200\mu\text{g}/\text{m}^2$ , incluindo febre, calafrios, hipotensão, cefaléia e fadiga (CHAPMAN et al. 1987; LEJEUNE et al. 2006).

Estudos mais recentes, entretanto, empregando manipulações farmacológicas da molécula de TNF (encapsulamento do TNF em lipossomas conjugados à poli-etileno-glicol) (TEN HAGEN et al. 2002), uso de vetores virais dirigidos ao tumor e que permitem o aumento da expressão de TNF intra-tumoral (KIRCHEIS et al. 2002) ou a conjugação de TNF a peptídeos que, por exemplo, ligam-se ao leito vascular intratumoral (CNGRC) (CURNIS et al. 2002), demonstraram, em modelos animais, que estas abordagens são capazes de inibir o crescimento tumoral ou potencializar o

efeito da quimioterapia ou radiação, sem o aumento concomitante da toxicidade esperado com o uso sistêmico de TNF (LEJEUNE et al. 2006).

## **1.7 HIPÓTESES PARA O MECANISMO DE AÇÃO DA COMBINAÇÃO DE MELFALANO E TNF**

O mecanismo proposto para o aumento da atividade da combinação do TNF com o melfalano é de que o TNF age de forma seletiva sobre o endotélio do leito tumoral aumentando a permeabilidade do mesmo e reduzindo o fluxo sanguíneo. Desta maneira, haveria uma redução da pressão intersticial intratumoral, possibilitando o acesso de concentrações mais altas do quimioterápico ao tumor e aumentando o tempo de exposição à droga. Além disso, as células do tumor ficariam expostas a um ambiente hipóxico e pobre em nutrientes, o que incrementaria a susceptibilidade das células tumorais aos efeitos tóxicos do melfalano (LEJEUNE et al. 2006).

Um dos primeiros trabalhos que sustentam a idéia de que o TNF agiria sobre o endotélio foi realizado por PALLADINO et al. (1987), onde relatam que sarcomas experimentalmente implantados por via intraperitoneal ou subcutânea em camundongos apresentam susceptibilidades diferentes aos efeitos do TNF, embora a linhagem tumoral empregada (Meth A) seja resistente aos efeitos tóxicos do TNF *in vitro*. Os tumores implantados intraperitonealmente (tumores não vascularizados) nos camundongos são insensíveis aos efeitos do TNF, ao contrário do que se observa quando o mesmo tumor é inoculado de forma subcutânea (quando se formam tumores altamente vascularizados), sugerindo que as ações do TNF sobre os vasos sanguíneos

e não seus efeitos citotóxicos seriam suficientes para causar a morte das células tumorais *in vivo*.

A administração intravenosa de TNF a camundongos portadores de sarcomas Meth-A provocou hemorragia capilar 1 a 2 horas após infusão da droga, observada por estereomicroscopia através de uma janela de vidro implantada na pele sobre o tumor. Após 4 a 6 horas foi vista a congestão dos vasos nutrientes, com extensa formação de trombos intravasculares o que era completamente evitada pela administração concomitante de heparina, e depois de 24 horas, perda completa do fluxo sanguíneo vascular. Não foi visto diferença no crescimento tumoral, necrose tumoral ou taxa de resposta completa entre os animais que receberam ou não heparina e não foi observada qualquer alteração em vasos da pele, aorta ou veia cava abdominal nos animais que receberam TNF (WATANABE et al. 1988).

MULE et al. (1988) mostraram que a resposta antitumoral mediada por TNF *in vivo*, tanto em sítios viscerais, quanto no subcutâneo, se correlacionava com o tamanho dos tumores (ausência de resposta em tumores menores que 5-6 mm), sendo maior em tumores maiores e com um suporte vascular melhor desenvolvido.

A análise de amostras clínicas de melanomas de indivíduos tratados com ILP mostrou que o melfalano é capaz de aumentar a expressão de PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1) no endotélio vascular intratumoral e de ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) e PECAM-1 no tumor. O TNF induziu aumento da expressão de ELAM-1 (endothelial-leukocyte adhesion molecule-1) e VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) no endotélio de melanomas, com pico de efeito após 3 horas e de ICAM-1 nas células de melanoma. O TNF também provocou ativação das células endoteliais intratumorais (células inchadas e com marginação do núcleo em direção ao lúmen) e acúmulo de intravascular e perivascular de

polimorfonucleares. Tais alterações precederam o desenvolvimento de necrose (RENARD et al. 1994).

Em modelo murino, o efeito do TNF promovendo aumento da permeabilidade vascular no leito tumoral já é percebido 1 hora após sua administração, com pico de ação em 3 horas, sendo observada redução do fluxo sanguíneo intratumoral 2 horas após a administração intravenosa do TNF. Tais efeitos não foram observados nos tecidos normais (VARGAS et al. 1996).

RUEGG et al. (1998) mostraram que a exposição de células endoteliais humanas *in vitro* a TNF e IFN- $\gamma$  causava inibição seletiva de adesão celular mediada por integrina  $\alpha V\beta 3$  e que a administração destas drogas a pacientes portadores de melanoma provocava descolamento e apoptose das células endoteliais  $\alpha V\beta 3$  - positivas da vasculatura tumoral *in vivo*, mas não dos vasos dos músculos. Esta inibição da adesão foi mediada por inibição da ativação da integrina, e não pela diminuição de sua expressão na superfície celular ou uma alteração da transdução de sinais do exterior. Observou-se ainda, através da técnica de TUNEL (Terminal UDP Nick End Labeling), que o melfalano era capaz de induzir apoptose nas células do tumor apenas, no entanto, a combinação de TNF ao melfalano induzia apoptose tanto nas próprias células tumorais quanto nas células do endotélio tumoral.

YILMAZ et al. (1998) também demonstraram que a exposição de células HUVEC à TNF *in vitro* era capaz de promover inibição reversível da proliferação destas células, bem como alteração da morfologia das células que adotam uma forma alongada com o surgimento de descontinuidades na monocamada (“gaps” intercelulares). Num estudo extremamente elegante, STOELCKER et al. (2000) demonstraram que a administração sistêmica de TNF murino induziu necrose tumoral em tumores de camundongos do tipo selvagem (wt) e nocauteados para o receptor p75



(TNFRp75  $-/-$ ), mas não nos tumores implantados em camundongos nocauteados para o receptor p55 (TNFRp55  $-/-$ ). Além disso, o TNF induzia necrose dos tumores derivados de células wt ou TNFRp55  $-/-$  quando estes cresciam em camundongos wt, excluindo um efeito tumoricida direto do TNF neste modelo. A administração de TNF promovia leucostase intratumoral em animais wt ou TNFRp75  $-/-$ , não tendo sido verificado o mesmo em animais TNFRp55 $-/-$ . A reconstituição da medula óssea de camundongos TNFRp55  $-/-$  com células hematopoiéticas de animais wt era suficiente para restabelecer a leucostase induzida por TNF, mas não para promover necrose tumoral.

Deve existir também um efeito modulador da resposta imune antitumoral mediada pelo TNF, uma vez que tumores imunogênicos implantados artificialmente em camundongos são aparentemente mais sensíveis aos efeitos do TNF, quando comparados a tumores não-imunogênicos. Observa-se, nos primeiros casos, o desenvolvimento de anticorpos com atividade citotóxica contra as células tumorais. Além disso, os animais adquirem resistência contra re-infusão de células neoplásicas quando previamente tratados com TNF. Em ensaios clínicos de ILP existem casos de regressão tumoral tardia mesmo quando não houve necrose hemorrágica aguda extensa associada com o procedimento de perfusão (NOOIJEN et al. 1998).

Existem inclusive dados mostrando que, embora apresente a capacidade de inibir o crescimento de células endoteliais *in vitro*, o TNF pode apresentar uma atividade pró-angiogênica *in vivo* como demonstrado pela exposição de córneas de coelho à citocina em questão (FRATER-SCHRODER et al. 1987).

Essa discussão fica ainda mais complexa se levarmos em consideração que existem dados na literatura, que pelo menos em células alveolares ou brônquicas, o melfalano é capaz de ativar ERK1/2 e p38, após 5 minutos de exposição à droga,

aumentar a translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo após apenas 45 min. e promover o aumento da expressão do RNAm de TNF após 2 horas da exposição a este alquilante (OSTERLUND e LILLIEHOOK 2005).

O nosso grupo, avaliou a modificação do perfil de expressão gênica de linhagens de melanoma humano após tratamento *in vitro* com melfalano (MEL), TNF ou a combinação das duas drogas (MEL+TNF). Foram encontrados genes cuja expressão foi induzida exclusivamente por TNF, FLJ10979 (função desconhecida), TAGAP (T-cell activation GTPase activating protein) e NFKBIA (I $\kappa$ B); genes induzidos exclusivamente por MEL, como THBS3; e alguns genes modulados exclusivamente pela combinação de MEL+TNF, como o gene CLACSF9 (C-type lectin domain family 4, member E). Esses dados sugerem que o TNF tem atividade direta sobre as células de melanoma, podendo inclusive facilitar o processo de apoptose desencadeado pelo melfalano (PAGOTTO 2005).

Destarte, nem todas as facetas da atividade antitumoral do TNF estão devidamente esclarecidas no nível celular e molecular, nem os mecanismos pelos quais ele potencializa a atividade do melfalano contra melanomas.

## **1.8 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL E MELANOMA**

A identificação dos genes modulados nos diferentes tipos celulares que compõem o tumor em resposta ao tratamento com melfalano e TNF pode ajudar na elucidação dos mecanismos de ação destes agentes terapêuticos.

A análise de expressão gênica diferencial empregando a técnica de “microarrays” permite a avaliação do perfil de expressão de milhares de genes ao mesmo tempo numa mesma amostra. A análise do padrão obtido permite identificar

os genes envolvidos com o fenômeno biológico em questão em escala genômica (SCHENA et al. 1995; DeRISI et al. 1996; FREEMAN et al. 2000).

Nos últimos anos, vários trabalhos empregando a tecnologia dos “arrays” têm buscado identificar o padrão de expressão dos genes de melanoma nos diversos estágios de evolução da doença, tentando correlacionar tais genes com prognóstico ou caracterizar marcadores moleculares da progressão tumoral e de resposta ao tratamento (VALÉRY et al. 2001; revisado em KIM et al. 2002; CARR et al. 2003;).

BITTNER et al. (2000), empregando esta estratégia, avaliaram de 39 amostras de melanomas cutâneos humanos e conseguiram identificar dois subgrupos com padrões de expressão gênica distintos, embora estes não tenham se correlacionado com dados clínicos ou sobrevida, talvez pelo pequeno tamanho da amostra. Ademais, não foi realizada nenhuma avaliação do impacto do perfil de expressão gênica na resposta ao tratamento. Entretanto, a técnica permitiu a individualização de um conjunto de genes num dos subgrupos que esteve estatisticamente associado com características como menor motilidade celular, menor invasividade e menor mimetismo vasculogênico.

Em outro trabalho, utilizando uma plataforma contendo cDNA correspondentes a 205 genes humanos, os autores compararam a expressão gênica diferencial entre melanócitos normais e células de melanoma de tumores metastáticos de 10 pacientes e encontraram o gene GRB10 (growth factor receptor-bound protein 10) super-expresso e os genes BAX (bcl-2 associated X membrane protein), BAD (bcl-2 antagonist of cell death), GSTT1 (glutathione S-transferase  $\theta$ 1) e GSR (glutathione-reductase) sub-expressos nos melanomas metastáticos (MIRMOHAMMADSADEGH et al. 2004).

A comparação de 45 amostras de melanoma primário, 18 nevos de pele e sete amostras de pele normal, empregando o microarray Affymetrix Hu133A com 22.000 elementos, permitiu a identificação de um conjunto de genes capazes de separar as amostras de tumor das amostras de tecido de pele normal ou nevo. A partir deste conjunto de genes foi avaliada a expressão diferencial de dois genes (L1CAM – L1 cell adhesion molecule e PLAB – prostate differentiation factor), cuja combinação se mostrou a melhor para separar melanomas primários ou metastáticos de amostras sem melanoma (nevo, pele normal e linfonodo normal), em amostras de melanoma primário, nevo benigno, pele normal e metástases linfonodais de melanoma através de RT – PCR (reverse transcription - polymerase chain reaction) e a capacidade destes de separar adequadamente tais amostras quando comparados a marcadores convencionais de melanoma como tirosinase, gp100 e MART1. A combinação destes dois novos marcadores se mostrou superior aos marcadores convencionais (TALANTOV et al. 2005).

A técnica de microarray, empregando cRNA (RNA complementar) de amostras de tumor de 58 pacientes com melanoma cutâneo hibridado contra um microarray pangenômico de oligonucleotídeos de 60-mer com 44K, possibilitou a identificação de um conjunto de 254 genes associados com sobrevida livre de recorrência à distância, destes 23 foram validados através de imuno-histoquímica em tissue-microarrays (TMA) e dois deles, MCM4 (minichromosome maintenance protein 4) e MCM6 (minichromosome maintenance protein 6), proteínas envolvidas no reconhecimento dos sítios de início de replicação e posicionamento da helicase, estiveram correlacionados de forma independente com sobrevida global (WINNEPENNINCKX et al. 2006).

Utilizando linhagens celulares de melanoma que recapitulam as diversas fases de progressão tumoral e as características críticas dos tumores das quais derivaram e analisando-as através da técnica de cDNA microarray e “clusterização” hierárquica não-supervisionada, RYU et al. (2007) conseguiram dividir estas linhagens em duas subclasses moleculares distintas separando linhagens de comportamento metastático agressivo de linhagens menos agressivas. Uma análise mais apurada das assinaturas associadas com progressão usando notações funcionais categorizou os transcritos em três classes de genes: super-expressão de genes ativadores da progressão do ciclo celular, reparo e replicação do DNA; perda de expressão de genes associados com adesão celular e diferenciação do melanócito e super-expressão de genes associados com resistência à apoptose.

JAEGER et al. (2007) identificaram 308 genes diferencialmente expressos na comparação de 19 amostras de melanoma primário e 22 amostras de melanoma metastático, empregando um “oligonucleotide microarray”, com com algumas categorias de ontologia gênica super-representadas (regulação do ciclo celular, adesão celular, mitose e comunicação celular). Dentre os genes positivamente regulados foram identificados Cdc6, Cdk1, septina 6, mitosina, kif2C, osteopontina e fibronectina. Entre os genes regulados negativamente estavam E-caderina, FGF binding-protein, and desmocolina 1 e desmocolina 3, 14-3-3sigma e quimiocina CCL2.

Em nosso laboratório foram desenvolvidos até o momento três trabalhos avaliando expressão gênica diferencial em melanomas empregando a técnica de cDNA microarray. Num destes foi comparada a expressão gênica diferencial entre 23 amostras de nevo e 18 de melanoma primário, empregando-se uma plataforma de cDNA “microarray” com 4800 sequências gênicas fixadas. A abordagem permitiu

separar com precisão as amostras benignas das malignas, utilizando técnicas de agrupamento não-supervisionado (hierárquico, SOM e K-means). Além disso, o agrupamento hierárquico identificou um subgrupo de nevos provenientes de pacientes com nevos múltiplos ou atípicos ou história familiar/antecedente pessoal. Foi observado ainda que os genes que se mostraram capazes de diferenciar as amostras se agrupavam em módulos funcionais relacionados à (de acordo com o GeneDeck e o Gene Ontology) adesão celular (periostina, desmocolina 3, CD44, contactina 1), comunicação celular (colágeno 4, colágeno 17A1, colágeno 3A1, desmocolina3), ligantes de receptores neuro-ativos (neuromedina U), morte celular / apoptose (caspase 6, MDM4, serina-treonina quinase 3), biosíntese de esteróides (farnesil - difosfato sintase), desenvolvimento de epiderme (laminina -  $\alpha$ 3), potencial metastático (CYR61 - cysteine-rich angiogenic inducer 61) e proliferação celular / regulação do ciclo celular (CDK2 - cyclin dependent kinase 2, TPX2 - microtubule associated protein) (MUTO 2007).

Um segundo estudo comparou o perfil de expressão gênica, empregando a mesma plataforma usada no estudo anterior, entre melanomas primários e metastáticos e encontrou um conjunto de genes relacionados a desenvolvimento da epiderme (laminina -  $\alpha$ 3, KLK7 - kallikrein-7 precursor), atividade de peptidase (KLK6 - kallikrein-6 precursor, KLK13 - kallikrein-13 precursor), comunicação celular (trombospondina - 1, desmocolina - 3, colágeno 3 $\alpha$ 1), adesão celular (desmocolina - 3, fibulina - 1, periostina), ligantes de receptores neuro-ativos (neuromedina U, P2RX1 - purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1) e comportamento metastático (LUM - lumican precursor, IGFBP4 - insulin-like growth factor binding protein - 4) diferencialmente expressos. Com base em dados de módulos funcionais e redes de relevância o trabalho sugere que na progressão de

melanoma primário para metastático o aumento da expressão de serina-proteases como kalikreínas e metaloproteinases promoveriam ou facilitariam a degradação de IGFBP4, permitindo que haja uma maior biodisponibilidade de IGF2 (insulin-like growth factor – 2) e conseqüente ativação de vias de sobrevivência e proliferação celular via ativação de Akt (MARTINS 2007).

O terceiro estudo realizado em nosso grupo avaliou a modificação do perfil de expressão gênica de linhagens de melanoma humano após tratamento *in vitro* com melfalano (MEL), TNF ou a combinação das duas drogas (MEL+TNF). Foram encontrados cuja expressão foi induzida exclusivamente por TNF: FLJ10979 (função desconhecida), TAGAP (T-cell activation GTPase activating protein) e NFKBIA (I $\kappa$ B). TAGAP funciona inativando a proteína Rho, uma importante mediadora de eventos associados com rearranjo do citoesqueleto e motilidade celular, além de ativar de CDK2 e inibir a ciclina D1, favorecendo a progressão no ciclo celular de G1 para fase S. NFKBIA é o principal inibidor de NF- $\kappa$ B, proteína com importante papel na ativação de vias de sobrevivência e proliferação celular. Dentre os genes induzidos exclusivamente por MEL estava THBS3 que codifica uma proteína com atividade anti-angiogênica. Alguns genes foram modulados exclusivamente pela combinação de MEL+TNF, como o gene CLACSF9 (C-type lectin domain family 4, member E) envolvido com adesão celular, sinalização célula-célula, inflamação e resposta imune. Desta forma, o TNF parece ter efeitos diretos sobre as células de melanoma, podendo inclusive facilitar o processo de apoptose desencadeado pelo melfalano (PAGOTTO 2005).

Propomos o emprego da análise comparativa do padrão de expressão gênica de células de melanoma murino tratadas *in vitro* e *in vivo* com TNF, melfalano ou com a combinação dos dois, empregando a técnica de “oligonucleotide microarray”, no

intuito de identificar possíveis genes envolvidos na resposta a estes tratamentos e correlacionar as variações no padrão de expressão gênica com esta resposta. O melhor entendimento dos mecanismos de ação antitumoral do TNF, melfalano e da combinação destas drogas contra o melanoma cutâneo pode possibilitar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas colaterais e fornecer informações que poderão levar à eventual caracterização de marcadores capazes de prever a resposta ao tratamento com estas drogas, além de contribuir para a melhor compreensão da biologia do melanoma.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

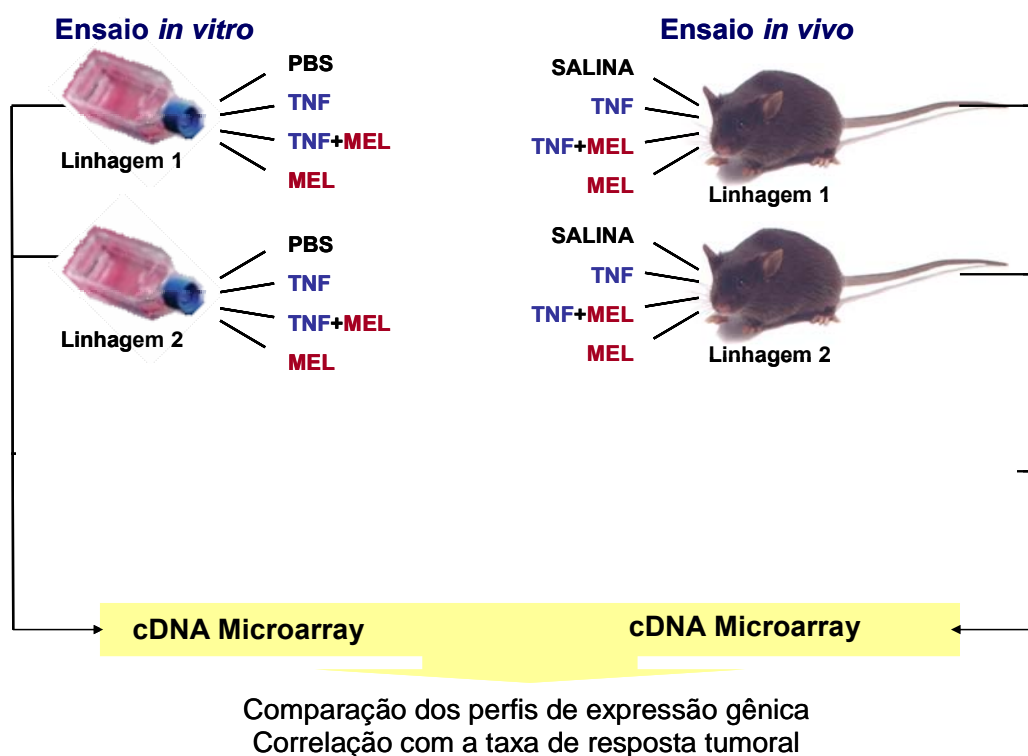
Identificar potenciais alvos celulares e moleculares da ação biológica do quimioterápico Melfalano e do Fator de Necrose Tumoral (TNF) no melanoma, e detectar os possíveis responsáveis pelo aumento da atividade antitumoral da combinação Melfalano e TNF.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar e comparar o perfil dos genes expressos em linhagens de melanoma murino após tratamento com TNF, MEL ou ambas as drogas utilizando a técnica de “oligonucleotide microarray”;
- Determinar e comparar o perfil de expressão de melanomas implantados experimentalmente em camundongos e tratados *in vivo* com TNF, MEL ou TNF+MEL pela técnica de “oligonucleotide microarray”;
- Identificar os genes diferencialmente expressos nas linhagens celulares e nos tumores em resposta a cada tratamento pela comparação do perfil de expressão obtido através da análise dos “arrays”;
- Determinar a curva de desenvolvimento de tumores experimentalmente induzidos em camundongos pela injeção subcutânea de células de melanoma e tratados com MEL, TNF e TNF em combinação com MEL;

- Correlacionar o perfil de expressão gênica com a taxa de resposta tumoral e a curva de sobrevida dos animais.

### 3 ESQUEMA DA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



**Figura 6** – Diagrama com o desenho experimental do presente estudo.

Células de melanoma das linhagens B16F10 e B16F1 foram cultivadas *in vitro* e, após terem atingido confluência de 70 a 90%, tratadas por 3 horas com o fator de necrose tumoral (TNF), melfalano (MEL), TNF+MEL ou solução salina tamponada (PBS). Foi avaliado o efeito de cada tratamento sobre a proliferação celular e, além disso, o RNA total de cada linhagem submetida aos diferentes tratamentos foi extraído para posterior análise da expressão gênica por “oligonucleotide microarray”.

Tumores foram experimentalmente induzidos em ambos os flancos traseiros de camundongos C57BL/6 pela injeção subcutânea de  $5 \times 10^5$  células das linhagens de melanoma B16F10 e B16F1. Quando os tumores atingiram  $1,0 \pm 0,3 \text{ cm}^2$ , os animais

receberam por via intravenosa (i.v.) TNF, MEL, TNF+MEL ou Salina. Após 3 horas do tratamento, um dos tumores foi removido cirurgicamente. Metade do tumor removido foi utilizado para análise histológica e da outra metade foi extraído o RNA para análise da expressão gênica por “oligonucleotide microarray”. O tumor remanescente teve o crescimento monitorado para verificação da resposta aos tratamentos administrados.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 LINHAGENS CELULARES

A linhagem K1735M2 foi originalmente isolada de camundongos C3H/HeN, induzido por luz ultravioleta e óleo de cróton e caracterizada como uma variante metastática da linhagem K1735CL10. Estas células nos foram gentilmente cedidas pelo Dr. Jan Vilcek (New York University School of Medicine).

As linhagens B16F1 e B16F10 são linhagens provenientes de melanoma surgido espontaneamente em camundongo C57BL/6J e obtidas após uma ou 10 passagens no pulmão de camundongos singênicos (FIDLER 1973). As células B16F10 usadas em nosso estudo são provenientes do banco de células do laboratório de Oncologia da EPM/UNIFESP, e nos foram gentilmente cedidas pelo Dra. Elaine Rodrigues e as B16F1 do banco de células do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer.

A linhagem M2R é uma linhagem murina de melanoma amelanótica, gentilmente cedida pela Dra. Shigeko Sonehara da Faculdade de Medicina – USP.

As linhagens B16F10 e B16F1 foram cultivadas em meio RPMI (GibcoBRL 31800022) e as linhagens M2R e K1735 em DMEM (GibcoBRL 31600034) ambos enriquecidos com soro bovino fetal inativado (SBF) (Cultilab) a 10% e suplementado com L-glutamina (2mM) (Sigma) e gamicina (40µg/ml) (Schering-Plough), em estufa à 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C.

Após duas passagens para expansão do número de células, culturas com 70 a 90% de confluência foram congeladas numa densidade de  $1,0 \times 10^6$  células por

criotubo (Nunc) em meio RPMI ou DMEM acrescido de 20% SBF e 10% DMSO (Sigma), e conservadas em N<sub>2</sub> líquido. De cada linhagem foram congeladas 20 alíquotas, constituindo um estoque que permitiu o uso da mesma passagem em todos os procedimentos experimentais.

## **4.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO***

Para a realização dos ensaios de citotoxicidade, as células (B16F1 e B16F10) foram cultivadas em RPMI contendo SBF 10% até atingirem cerca de 70 a 90% de confluência e, em seguida, distribuídas na densidade de  $1,0 \times 10^4$  células/poço em placas de cultura de 96 poços de fundo chato (Nunc). As células foram, então, colocadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% a 37°C, pelo período de 3 horas para aderirem ao fundo da placa. Após esse tempo, o meio foi aspirado e substituído por 200µL de meio contendo melfalano (Alkeran®, Glaxo-Smith-Kline) na concentração final de 36,9µM, TNF recombinante murino 10ng/mL (R&D) ou 30ng/mL, melfalano 36,9µM+TNF 10ng/mL, melfalano 36,9µM + TNF 30ng/mL ou PBS (controle). Cada grupo de tratamento foi feito em sextuplicata. Após 24, 48 e 72h, o meio foi aspirado e substituído por 200µL de meio contendo MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma) 500µg/mL e recolocadas na estufa por mais 3 horas. Em seguida, o meio foi aspirado e o precipitado azul (correspondente aos cristais de MTT-formazan) solubilizado em 200µL de SDS 10% (Sigma,) + N, N'-dimetilformamida (1:1 v/v). A absorbância de 100µL da solução foi medida no comprimento de onda de 540nm, empregando um leitor de ELISA (Bio Rad), sendo a quantidade de cor azul proporcional ao número de células viáveis na cultura. A

citotoxicidade foi avaliada pela relação entre a absorbância dos grupos tratados e o grupo controle.

A dose de melfalano foi escolhida com base nos resultados dos dados de RODRIGUEZ-VICENTE et al. (1998) que mostraram que 36,9 $\mu$ M de melfalano correspondem à DL50 (dose letal 50%) para linhagem B16F10 quando tratada com melfalano isolado. A dose do TNF empregada foi escolhida a partir de dados do nosso próprio laboratório e outros que indicam que estas doses é suficiente para induzir expressão de genes modulados por TNF (LEE et al. 1990).

Toda a manipulação do melfalano foi realizada em fluxo laminar utilizando, o operador, luvas de vinil. O material contaminado com a droga, incluindo plásticos e meio de cultura, foi descartado separadamente e destinado ao lixo de quimioterápicos do Hospital do Câncer A.C. Camargo.

### **4.3 ANIMAIS**

Camundongos machos da linhagem C57BL/6 foram criados em gaiolas até atingirem 6 a 8 semanas, em ambiente com temperatura e luminosidade controlada, filtragem de ar e pressão positiva dentro do Biotério do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer. Receberam ração apropriada e água acidificada *ad libitum*. Os animais foram checados periodicamente para parasitas, bactérias e vírus. O projeto foi submetido à apreciação e aprovado pelo CEUA da instituição (aprovado sob o número 016/07).

#### **4.4 INOCULAÇÃO E DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL DE TUMORES**

Foram injetadas  $5,0 \times 10^5$  células de cada linhagem, suspensas em PBS, nos flancos traseiros dos animais previamente depilados com auxílio tesoura cirúrgica ou um “trimmer” manual. Cada dose individual de células era injetada num volume de 100 $\mu$ l, usando-se agulha de 27,5G e seringa descartável de 1,0ml. Esta dose de células foi estabelecida através de um grupo-piloto de animais e foi escolhida por permitir o desenvolvimento de tumores com uma arquitetura tecidual bem preservada, com pouca necrose ou hemorragia (Anexo 1).

O crescimento dos tumores foi avaliado empregando-se paquímetro de precisão (Mitutoyo, Brasil) através do qual eram medidos os maiores diâmetros perpendiculares dos tumores e empregado o destes diâmetros como medida do tumor. As medidas eram realizadas a cada dois dias.

Aguardamos os tumores atingirem  $1,0 \pm 0,3 \text{cm}^2$  para iniciarmos os experimentos com os animais. Só foram empregados animais cujo crescimento do tumor foi relativamente simétrico em ambos os flancos.

#### **4.5 TRATAMENTO *IN VIVO* COM MELFALANO E TNF**

Os animais foram colocados em contentores de acrílico próprios para camundongos, permanecendo apenas com a cauda exposta. As drogas foram administradas através da veia da cauda, após aquecimento da mesma com bolsas térmicas a 40°C por 3 min. para vasodilatação e facilitação do processo de venopunção.



Os animais no grupo do melfalano (MEL) receberam 12mg/Kg de melfalano diluído em salina estéril. Os animais do grupo do TNF (TNF) receberam 0,05mg/Kg de TNF recombinante murino diluído em salina/soro murino estéril 1%. Os animais do grupo da combinação melfalano e TNF (MEL+TNF) receberam primeiro o TNF e em seguida o melfalano nas doses acima. O grupo controle recebeu apenas salina. Todas as drogas foram administradas num volume final de 100µL.

As doses empregadas foram estabelecidas a partir de dados de crescimento tumoral num grupo-piloto (Anexo 2).

#### **4.6 REMOÇÃO CIRÚRGICA DOS TUMORES**

Os animais eram anestesiados por via intraperitoneal com quetamina 60mg/Kg (Vetanarcol<sup>®</sup>, König) e tiazina 15mg/Kg (Rompun<sup>®</sup>, Bayer). A área a ser incisada era lavada previamente com álcool 70% para antissepsia. Os tumores implantados no flanco esquerdo dos animais eram ressecados para as análises e aqueles implantados do lado direito eram mantidos intactos para acompanhamento do crescimento tumoral. A ressecção dos tumores era realizada com auxílio de uma tesoura de dissecação, sendo os camundongos suturados com fio Prolene 6-0 (B-D). Após a cirurgia, 0,5ml de salina estéril era injetado subcutaneamente no dorso com a finalidade promover expansão volêmica. Os animais eram mantidos em gaiolas aquecidas até recuperação da anestesia. Todos os camundongos recuperaram-se bem do procedimento cirúrgico após cerca de 1 hora.

Os tumores do lado esquerdo eram seccionados imediatamente em duas metades com auxílio de uma lâmina de micrótomo, o que minimizava o dano arquitetural às amostras destinadas à análise histológica. A metade destinada à análise

histológica era colocada imediatamente em solução de formol tamponado a 40%, e a outra metade guardada em tubo estéril, mergulhada em nitrogênio líquido, e posteriormente mantida em freezer a -80°C.

#### **4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS TUMORES**

A metade empregada na análise histopatológica foi imediatamente colocada para fixar em formol tamponado. Após processamento, emblocamento em parafina e coloração com hematoxilina-eosina, foram preparados cortes histológicos de 4,0µm para análise. Foram analisados 10 tumores para os grupos controle e tratado com TNF e nove tumores para os grupos tratados com melfalano e TNF+MEL.

Foi preparada uma lâmina para cada tumor. As lâminas foram examinadas empregando-se microscópio (Axioskop 40, Zeiss) com aumento de 400x. Foram fotografados 10 campos aleatórios empregando-se câmara fotográfica digital (MPEG Movie EX, Sony) acoplada ao microscópio. As imagens foram transferidas para um computador (Pentium 4.0, Microsoft) onde foram analisadas com ajuda do software AxioVision versão 3.1 (Zeiss). Foram registrados dados referentes ao número total de células tumorais por campo, número de mitoses, razão entre número de mitoses e número total de células, área total fotografada do tumor, área de necrose, razão entre área de necrose e área total, área de hemorragia e razão entre área de hemorragia e área total.

Foram obtidas então as médias dos valores de 10 campos de grande aumento de cada tumor para cada uma dessas variáveis, com exceção do número de mitoses onde consideramos a soma total do número de mitoses nos 10 campos fotografados.

#### **4.8 AVALIAÇÃO DE DENSIDADE VASCULAR DOS TUMORES**

Para avaliação de densidade vascular, empregamos marcação imunohistoquímica com anticorpo monoclonal murino anti-CD34 (Santa Cruz SC 7045 1:100), capaz de reconhecer células endoteliais maduras. Em seguida utilizamos um anticorpo caprino anti-IgG murino biotinizado 1:300. As lâminas foram então tratadas com estreptavidina complexada à peroxidase (kit StreptABCcomplex/HRP 1:200, Dako K0492), reveladas com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e contracoradas com hematoxilina.

Os vasos foram quantificados com a ajuda de um graticulo de 270 $\mu$ m x 270 $\mu$ m, num aumento de 400x. Foram contadas todas as estruturas vasculares, de qualquer diâmetro, revestidas por células endoteliais que coincidissem com os traçados do graticulo<sup>1</sup>, sendo as mesmas divididas em vasos CD34+ (deposição de precipitado castanho na membrana) ou vasos CD34- (ausência de depósito castanho).

A área do tumor foi calculada multiplicando-se a percentagem da área do graticulo ocupada pelo tumor pela área total do graticulo.

Para cada amostra foram avaliados 20 campos aleatórios e não superpostos.

#### **4.9 EXTRAÇÃO DE RNA DAS CÉLULAS E DOS TUMORES**

Com a finalidade de obter RNA total das linhagens de melanoma para realização dos ensaios de microarray, plaqueamos 2,5 x 10<sup>6</sup> células das linhagens B16F10 e B16F1 em placas de cultura de 60cm<sup>2</sup> (Corning) em meio RPMI+SBF 10% e colocamos para crescer em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C até que as células atingissem 60 a 80% de confluência.

Posteriormente, tratamos as células durante 3 horas com PBS (controle), TNF (10ng/ml), melfalano (36,9 $\mu$ M) ou TNF e melfalano (TNF+MEL). Para cada tratamento utilizamos duas placas e foram feitos dois experimentos independentes realizados em dias diferentes. Após as 3 horas de tratamento, o meio foi aspirado e as células lavadas com PBS a 37°C para remover o remanescente do meio.

Após desprezar o PBS, 3,0 ml de TRIZOL<sup>®</sup> (Sigma) foram adicionados a cada placa e procedeu-se a extração de RNA, seguindo as especificações do fabricante. Entretanto, introduzimos modificações no intuito de reduzir a contaminação das amostras com melanina, proteína produzida em grandes quantidades pelas células do melanoma. A principal modificação consistiu na centrifugação das amostras a 12000g, à 4°C, logo após as células ou os tumores haverem sido homogeneizados com o TRIZOL<sup>®</sup>. Obtinha-se, destarte, um “pellet” enegrecido, que era descartado, e o sobrenadante era, então, utilizado para a extração do RNA. Além disso, todas as amostras eram precipitadas com isopropanol e citrato de sódio (1:1) para diminuir a contaminação com proteoglicanos e polissacarídeos.

No caso dos tumores, a metade destinada à extração de RNA, após remoção cirúrgica, foi rapidamente limpa para remoção do excesso de pele, tecido adiposo e conjuntivo aderido e congelada, imediatamente, em nitrogênio líquido. Durante a extração de RNA as amostras foram trituradas em TRIZOL<sup>®</sup>, no gelo, com a ajuda de um Polytron (Kinematica, Alemanha), e em seguida submetidas ao protocolo pré-estabelecido de extração de RNA.

A quantificação do RNA foi realizada empregando-se espectrofotometria (GeneQuant Pro, Pharmacia Biotech) no comprimento de onda de 260 nm. A estimativa da pureza do RNA obtido foi feita pela determinação da razão entre a absorbância a 260nm e a 280nm (que mede a contaminação da amostra com

proteínas) e da razão 260/230 para estimativa da quantidade de sais nas amostras. Em ambos os casos, os RNA eram considerados de boa qualidade quando a razão era superior a 1,8.

A integridade do RNA obtido foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% em TAE, corado com brometo de etídio. Eram consideradas de boa qualidade as amostras nas quais as bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S eram visualizados, e nas quais a intensidade da banda superior era maior que a inferior.

#### **4.10 AMPLIFICAÇÃO DE RNA**

O RNA total das amostras de células e de tumores foi amplificado seguindo procedimento previamente descrito por GOMES et al. (2003).

O RNA total sofreu transcrição reversa para cDNA usando o “primer” oligo-dT(24)-T7 que contém a seqüência do promotor da RNA-polimerase T7 na extremidade 5'. RNA total (3,0µg) foi misturado com 0,5µg do “primer” oligo-dT(24)-T7 e o volume final foi ajustado para 10,0µl com água deionizada tratada com DEPC (água DEPC). A mistura foi aquecida à 70<sup>0</sup>C por 10 min., para desnaturação do RNA, e rapidamente colocada em gelo. A transcrição reversa foi realizada pela adição de 4,0µl de tampão de primeira fita 5X (Promega), 4,8µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM (Promega), 0,5µl de RNasin (Promega), 2,0µl de dNTP 10mM e 1,0µl de IMPROM II RT (Promega), a reação ocorreu à 42<sup>0</sup>C por 90 min..

A síntese da segunda fita de DNA foi realizada pela adição de 16,9µl de água DEPC, 10,0µl de tampão de segunda fita 5X (100 mM Tris pH=6,9, 23 mM MgCl<sub>2</sub>, 450 mM KCl, 0,75 mM β-NAD, 50 mM (NH<sub>4</sub>) SO<sub>4</sub>), 1,0µl de dNTP 10mM, 0,3µl de RNase H (2U/µl, Gibco), 0,5µl de DNA ligase de *E. coli* (10U/µl, Invitrogen), 1,3µl

DNA-polimerase I de *E. coli* (10 U/ $\mu$ l, Promega). A mistura foi mantida à 16<sup>0</sup>C por 2h. Em seguida foi adicionado 1,0 $\mu$ l de T4 DNA-Polimerase (5U/ $\mu$ l, Invitrogen) e a reação incubada por 10min. à 16<sup>0</sup>C.

Para purificação do cDNA, adicionou-se 102 $\mu$ l de água DEPC e 152 $\mu$ l fenol tamponado:clorofórmio:isopropanol (25:24:1), seguido de agitação e centrifugação à 14.000 rpm por 5min. Transferiu-se a fase aquosa para um tubo limpo e desprezou-se o restante. Para precipitação do cDNA, adicionamos 1,0 $\mu$ l de acrilamida (5 mg/ml, Ambion), 0,5vol. de NH<sub>4</sub>AC 7,5 M e 2,5vol. de etanol 100% à fase aquosa e mantivemos a mistura à -20<sup>0</sup>C por 1 hora. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, à 4<sup>0</sup>C, por 30min.. Após descarte do sobrenadante, foram lavadas três vezes com 1,5ml de etanol 75%, secadas ao ar e ressuspensas em 10,0 $\mu$ l de água DEPC.

Para transcrição *in vitro*, empregou-se reagentes do kit RiboMax (Promega) e para cada 10,0 $\mu$ l de cDNA adicionou-se 7,5 $\mu$ l de rNTP 25mM, 5,0 $\mu$ l de tampão 5X e 5,0 $\mu$ l de Enzyme Mix (inibidor de RNase e polimerase do fago T7). A reação ocorreu à 37<sup>0</sup>C por 6 h e o RNA amplificado (aRNA) foi extraído com Trizol<sup>®</sup>, seguindo especificações do fabricante, e precipitado com 500 $\mu$ l de isopropanol para cada 1,0ml de Trizol<sup>®</sup>; a mistura foi mantida à temperatura ambiente por 10min. e centrifugada à 14.000 rpm por 15min.. O precipitado foi lavado cinco vezes com etanol 70%, secado ao ar e ressuspensado em 11,0 $\mu$ l de água DEPC. A eficiência da amplificação e a qualidade do aRNA foram avaliadas por análise espectrofotométrica (OD<sub>260/280</sub>, OD<sub>260/230</sub>) e eletroforese em gel de agarose respectivamente.

Para o segundo passo de amplificação, 1,0 $\mu$ g de aRNA foi concentrado no Speed-Vac (Labconco) para um volume final de 6,7 $\mu$ l, adicionou-se 1,0 $\mu$ l de hexâmeros randômicos (dN6 2,0 $\mu$ g/ $\mu$ l; ), e a mistura foi desnaturada à 70<sup>0</sup>C por 10min e depois deixada à temperatura ambiente por 2min.. Repetiu-se os mesmos

passos anteriormente descritos para síntese de cDNA no primeiro passo de amplificação. Para transcrição *in vitro*, usaram-se reagentes do kit RiboMax (Promega) e para cada 4,47µl de cDNA adicionou-se 0,95µl de rATP 100mM, 0,95 µl de rCTP 100mM, 0,95µl de rGTP 100mM, 0,48µl de rUTP 100mM, 0,95µl de amino-alil rUTP 50mM, 2,5µl de tampão de reação 5X e 1,25µl de Enzyme Mix (inibidor de RNase e polimerase do fago T7). A reação ocorreu à 37<sup>0</sup>C por 6 h e deste ponto em diante foram repetidos os mesmos passos da primeira fase de amplificação. As amostras foram submetidas à análise espectrofotométrica (OD<sub>260/280</sub>, OD<sub>260/230</sub>, OD<sub>260/289</sub>) e aquelas com razão OD<sub>260/289</sub> variando entre 0,22 – 0,32 foi consideradas com boa incorporação de amino-alil rUTP.

#### **4.11 PREPARAÇÃO DO RNA DE REFERÊNCIA**

Com o objetivo de possibilitar a comparação de todos os dados obtidos das diferentes lâminas e também da abordagem *in vitro* com a *in vivo*, todas as amostras foram hibridizadas contra um RNA de referência comum.

O RNA de referência usado no nosso projeto foi um mistura de RNA extraídos das linhagens de melanoma K1735M2, M2R, B16F10 e B16F1.

As linhagens foram cultivadas em meio RPMI (B16F10 e B16F1) ou DMEM (M2R e K1735) enriquecidos com soro bovino fetal (SBF) a 10% e suplementado com L-glutamina (2,0mM) e garamicina (40µg/ml), até alcançarem 70 a 90% de confluência quando, então, foram lavadas com PBS e o RNA extraído conforme descrito anteriormente.

Os RNA totais destas linhagens foram misturados em quantidades iguais e foram também submetidos a dois ciclos de amplificação, seguindo o mesmo protocolo descrito para o RNA das amostras.

#### 4.12 MARCAÇÃO DE RNA PARA “MICROARRAY”

A marcação dos RNA para hibridização foi realizada através de uma reação de acoplamento químico dos corantes de Alexa555 (RNA da amostra na lâmina “main” e RNA referência na lâmina “swap”) ou Alexa647 (RNA referência na lâmina “main” e RNA da amostra na lâmina “swap”) aos aRNA com aos quais foram incorporados oligonucleotídeos ligados a um radical amino-alil. Misturou-se 4,0µl de aRNA (10µg) a 1,0µl de tampão de acoplamento (0,5M NaHCO<sub>3</sub> pH 9,0) e 5,0µl de corante (Alexa 555 ou Alexa 647) dissolvido em DMSO. Cada frasco de corante (Alexa 555 ou Alexa 647 – Invitrogen) foi dissolvido em 10µl de DMSO (Sigma) e dividido em duas alíquotas de 5µl, imediatamente antes do uso. Desta forma, para cada amostra estudada foram feitas quatro marcações: para realização do “main”, a amostra marcada com o fluoróforo Alexa 555 e a referência marcada com Alexa 647 e, para realização do “swap”, amostra marcada com Alexa 647 e referência como Alexa 555. A mistura foi homogeneizada e centrifugada rapidamente e deixada em temperatura ambiente por 90 min., no escuro. O RNA marcado foi purificado empregando-se o RNeasy Mini Kit (Qiagen) seguindo o protocolo do fabricante para limpeza de RNA, com o acréscimo da repetição de uma lavagem da coluna com ETOH 80%. As amostras foram quantificadas empregando-se 1,0µl da solução através de um espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies), sob os comprimentos de onda específicos para cada fluoróforo (555nm e 647nm).



#### 4.13 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR “MICROARRAY”

Foram utilizadas lâminas provenientes do Fox Chase Cancer Center, 16.128 oligonucleotídeos no sentido “sense”, correspondentes a genes murinos imobilizados. A lista completa dos genes representados nesta lamina se encontra no CD em anexo.

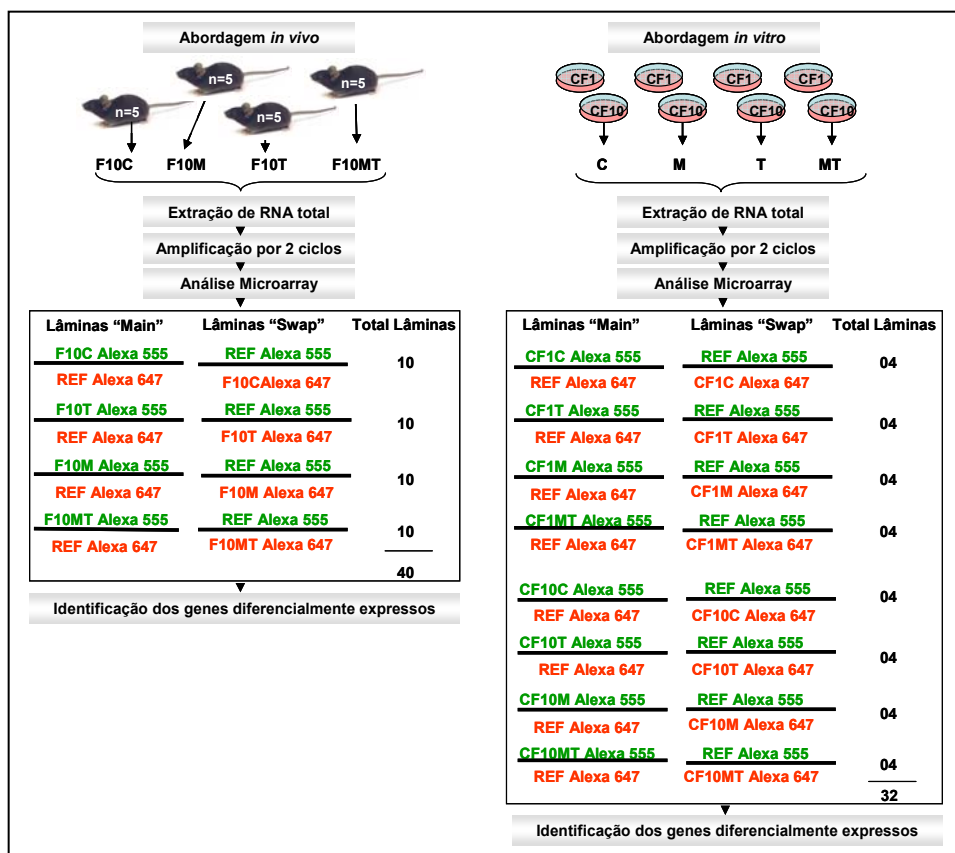
Apresentamos a seguir um resumo da estratégia experimental adotada neste projeto e do número de lâminas que foram hibridizadas, usando o protocolo padronizado.

Para as amostras do experimento *in vitro*, foi adotada a seguinte nomenclatura: CF10 (para a linhagem B16F10) e CF1 (para a linhagem B16F1) seguida das letras T, M, MT ou C quando tratadas com TNF, Mel, Mel+TNF ou salina, respectivamente e o número do experimento de origem: 1 ou 2.

Para as amostras do experimento *in vivo*, foi adotada a seguinte designação: F10 (para a linhagem B16F10) e F1 (para a linhagem B16F1) seguida das letras T, M, MT ou C quando o camundongo foi tratado com TNF, MEL, MEL+TNF ou salina, respectivamente e o número do animal de onde o tumor foi extraído.

Para cada amostra foram preparadas duas lâminas: uma na qual o RNA da amostra foi marcado com o fluoróforo Alexa 555 e o RNA referência com Alexa 647 (chamada de lâmina “main”) e outra lâmina na qual a mesma amostra foi marcada com Alexa 647 e o RNA referência com Alexa 555 (chamada de lâmina “swap”). Esta estratégia foi empregada para normalização do efeito da incorporação diferencial dos dois tipos de fluoróforos.

Na Figura 7 é apresentado um diagrama esquematizando a estratégia experimental empregada neste estudo.



**Legenda:** A estratégia experimental inclui a determinação do perfil de expressão de genes em linhagens de melanoma cultivadas *in vitro* e em tumores gerados em camundongos pela implantação destas mesmas linhagens visando identificar genes modulados tanto no melanoma quanto em outros componentes celulares do tumor em resposta a melfalano e/ou TNF.

**Figura 7** - Diagrama da estratégia experimental adotada no estudo.

#### 4.13.1 Hibridização e leitura das lâminas de "microarray"

As lâminas de "array" foram pré-hibridizadas a 42 °C por aproximadamente 6 horas em uma solução contendo 5X Denhardt's (Ficoll 400 0,05g/mL; polivinilpirrolidona 0,05g/mL; albumina de soro bovino 0,05g/mL), 5X SSC, 0,2% SDS (Sigma) e 1% BSA.

Para a hibridização foram utilizados 7,0µg de aRNA marcado com o fluoróforo dos quais 3,5µg eram da amostra e 3,5µg da referência, enquanto que a solução de hibridização continha 5X Denhardt's, 25% de formamida (Sigma), 5XSSC, 0,1% SDS, 0,1mg/ml de esperma de salmão (GE Healthcare), 0,1mg/ml de

Poly A (GE Healthcare) e 0,1mg/ml de Cot 1 (GE Healthcare) em um volume final de 100µl. A hibridização foi feita na estação de hibridização Gene Tac (Genomic Solutions) à 42 °C por aproximadamente 16h.

As lâminas foram retiradas do cassete de hibridização em um recipiente contendo uma solução 2X SSC / 0,1% SDS à 42°C, e suas etiquetas de identificação foram “esfregadas” manualmente para retirada de possíveis partículas e cola que poderiam grudar nelas. Depois, as lâminas foram acomodadas horizontalmente num suporte dentro de outro recipiente com a mesma solução, porém nova, onde foram lavadas por 5 min. à 42°C. Em seguida foram lavadas por duas vezes de 5 min. cada numa solução contendo 0,1X SSC e 0,1% de SDS à temperatura ambiente. Depois foram submetidas a cinco lavagens de 1 min. cada, à temperatura ambiente, numa solução de 0,1X SSC.

A secagem foi feita na centrífuga (1500 rpm por 5 min.) com a lâmina na posição vertical com a etiqueta de identificação voltada para a base.

A captura da imagem e intensidades dos *spots* foram geradas e processadas em scanner de laser confocal (ScanArray™ Express, PerkinElmer Life Sciences, MD, USA), utilizando-se o programa ScanArray Express (Packard BioScience), usando uma resolução de 10µm e sensibilidade de captação PMT 60% para o canal Alexa 555 e 70% para o Alexa 647. Cada lâmina gerou uma tabela de dados para cada canal correspondente aos corantes Alexa 555 e Alexa 647.

#### **4.13.2 Análise da qualidade das hibridizações**

A análise da qualidade das hibridizações foi realizada pelo Laboratório de Bioinformática do Hospital do AC Camargo. Para normalização dos dados, ajustando variações sistemáticas lineares e não-lineares, ambas do tipo intensidade dependente,

principalmente para “spots” de baixa intensidade, foi empregado o método de regressão linear localmente ponderada LOWESS (Locally Weighted Scatter-plot Smoothing). Primeiramente, representações gráficas tipo *scatter-plot* foram geradas para cada lâmina, individualmente (gráficos *MA-plot*). Nos gráficos do tipo MA-plot, M representa a razão entre a intensidade R e G, em  $\log_2 (M = \log_2 R/G)$  e A representa, a média da soma intensidades R e G, também em  $\log_2 (A = \frac{1}{2} \log_2 RG)$ . Os valores de intensidade R e G referem-se à intensidade do sinal nas amostras coradas com Alexa 647 (RED) e Alexa 555 (GREEN).

Para determinação da reprodutibilidade do nosso experimento em que hibridizações em duplicata (“main” e “swap”) foram realizadas, determinamos o Índice de Correlação de Pearson, que permite verificar se existe correlação linear entre os dados e representamos a distribuição dos pontos em um gráfico de dispersão denominado MM plot.

Para a identificação de genes diferencialmente expressos entre os vários tratamentos, utilizamos Two-way ANOVA e o teste de Dumms para comparações do tipo dois-a-dois. Como ponto de corte, utilizamos um pvalor de 0,05.

#### **4.14 OUTRAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Estimamos inicialmente a partir de dados da literatura, admitindo que o tratamento promoveria uma redução do tamanho do tumor em todos os grupos de tratamento de cerca de 50%,  $\alpha=5\%$ ,  $\beta=20\%$ , a necessidade de pelo menos 10 camundongos em cada braço de tratamento. Posteriormente, empregamos os dados dos ensaios de padronização de doses de cada tratamento para estimar o tamanho da amostra ideal a ser empregada no estudo (estudo piloto), e calculamos a necessidade

de 15 animais por grupo de tratamento, admitindo-se um efeito da ordem de 0,33 na variação do tamanho do tumor quando comparado entre as categorias de tratamento (4 grupos), com  $\alpha=5\%$  e  $\beta=100\%$ ; um efeito da ordem de 0,42 quando comparado o tamanho dos tumores entre os tempos de medida (2 tempos), com  $\alpha=5\%$  e  $\beta=99\%$ ; e um efeito da ordem de 0,32 no tamanho dos tumores quando avaliada a interação entre o tratamento e o tempo,  $\alpha=5\%$  e  $\beta=82\%$ ; empregando um teste F. Devido a restrições quanto ao número de lâminas de “array” disponíveis e a dificuldade de obtenção deste número de animais com tumores bem desenvolvidos (em média havia a necessidade da inoculação do dobro de animais para obtenção do número de animais desejados por grupo de tratamento), optamos por tratar 10 animais por grupo de tratamento, o que resulta num número total de 80 animais (assumindo 4 grupos de tratamento e 2 linhagens celulares).

Nos ensaios de citotoxicidade *in vitro* o teste de Kruskal-Wallis foi usado para comparação entre as médias dos grupos, seguida pelo teste de Dunnett para as comparações múltiplas, par a par.

Para avaliação do crescimento tumoral empregamos a análise de variância de medidas repetidas, para verificar a existência de interação entre os grupos de tratamento, entre os tempos e entre os diferentes grupos e tempos, em relação ao tamanho do tumor. Para as comparações dois a dois entre os grupos e os tempos empregamos o teste de Tukey-HSD (Honest Significant Difference).

Na análise histológica dos tumores, para a comparação das médias das variáveis: total de células por campo, razão entre número de mitoses e número total de células, área total fotografada do tumor, área de necrose, razão área de necrose/área total, empregamos a análise de variância (ANOVA) a um fator, seguida pelas comparações múltiplas através do teste de Tukey. As variáveis número de mitoses,

área de hemorragia e razão entre área de hemorragia e área total não apresentaram distribuição normal. Portanto, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis para avaliar as diferenças entre as médias segundo os grupos de tratamento e o teste de Tukey para as comparações dois a dois entre grupos.

As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e a comparação entre as curvas foi realizada através do teste de log-rank. Definiu-se sobrevida livre de progressão o tempo decorrido entre a administração do tratamento até o tumor direito atingir  $3,0\text{cm}^2$ , e sobrevida livre de eventos o tempo decorrido entre o tratamento até a morte por qualquer causa ou o tumor direito atingir  $3,0\text{cm}^2$ . A avaliação da sobrevida livre de eventos foi introduzida a fim de averiguar se a toxicidade pelo tratamento não estava interferindo nas curvas de sobrevida.

Para todos os testes estatísticos, empregou-se um erro alfa=5%, isto é, os resultados foram considerados significativos quando  $p<0,05$ .

Para as análises foram empregados os pacotes estatísticos Statistica versão 5.0 e SPSS for Windows versão 15.0.

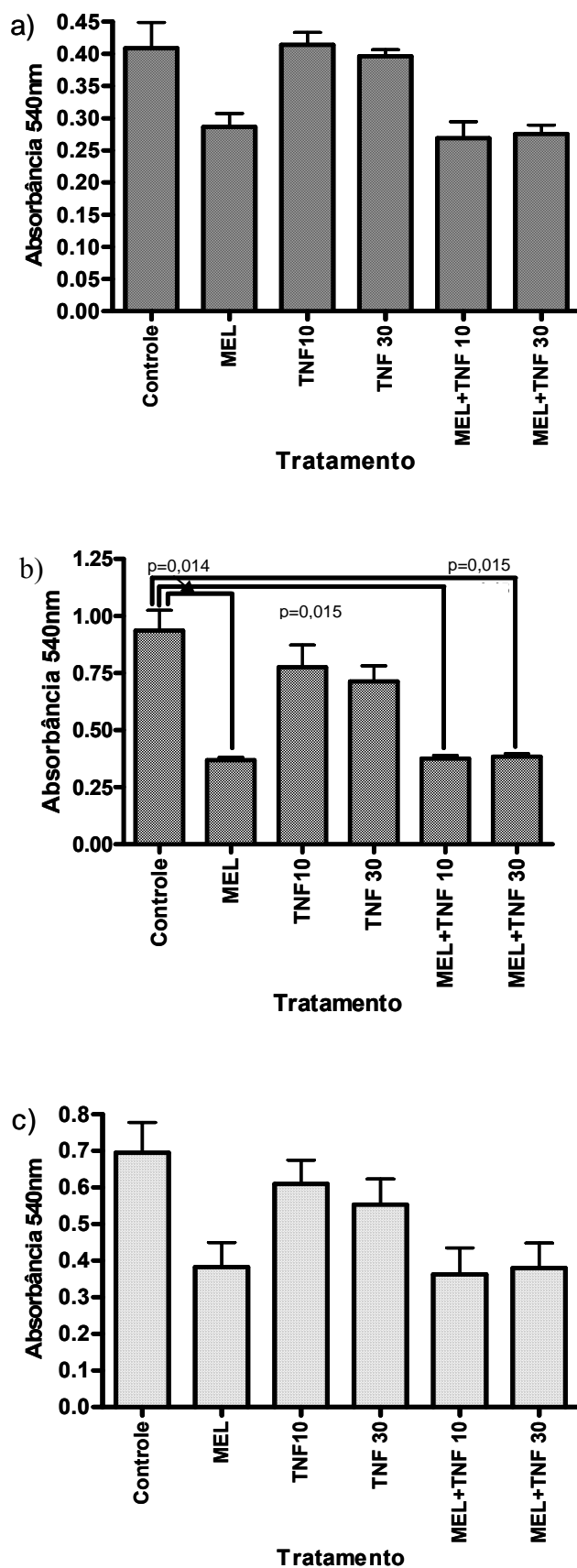
## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO MELFALANO E TNF *IN VITRO* CONTRA CÉLULAS DE MELANOMA CUTÂNEO MURINO

Para linhagem de melanoma B16F10, após 24h de tratamento, melfalano (MEL) mostrou-se mais tóxico em relação ao TNF 10 ( $p=0,015$ , Dunett) e TNF 30 ( $p=0,024$ , Dunett). MEL+TNF 10 também foi mais tóxico do que o tratamento com TNF 10 ( $p=0,017$ , Dunett) e TNF 30 ( $p=0,026$ , Dunett). Entretanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre o grupo controle e os demais grupos de tratamento (Figura 8a). Após 48h, percebe-se toxicidade celular estatisticamente diferente entre todos os grupos tratados com MEL e o grupo controle. O TNF não aumentou a toxicidade *in vitro*, mesmo quando associado ao MEL (Figura 8b). Após 72h, não há diferença estatisticamente significativa de toxicidade entre os grupos (Figura 8c).

Em relação à linhagem B16F1 nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os grupos de tratamento no tempo de 24h (Figura 9a). No entanto, o efeito citotóxico do MEL poder ser observado após 48h e 72 h, quando se verifica maior morte celular em relação ao grupo controle. A citotoxicidade do MEL também é mais pronunciada do que a de TNF nas duas doses testadas (Figura 9b e 9c).

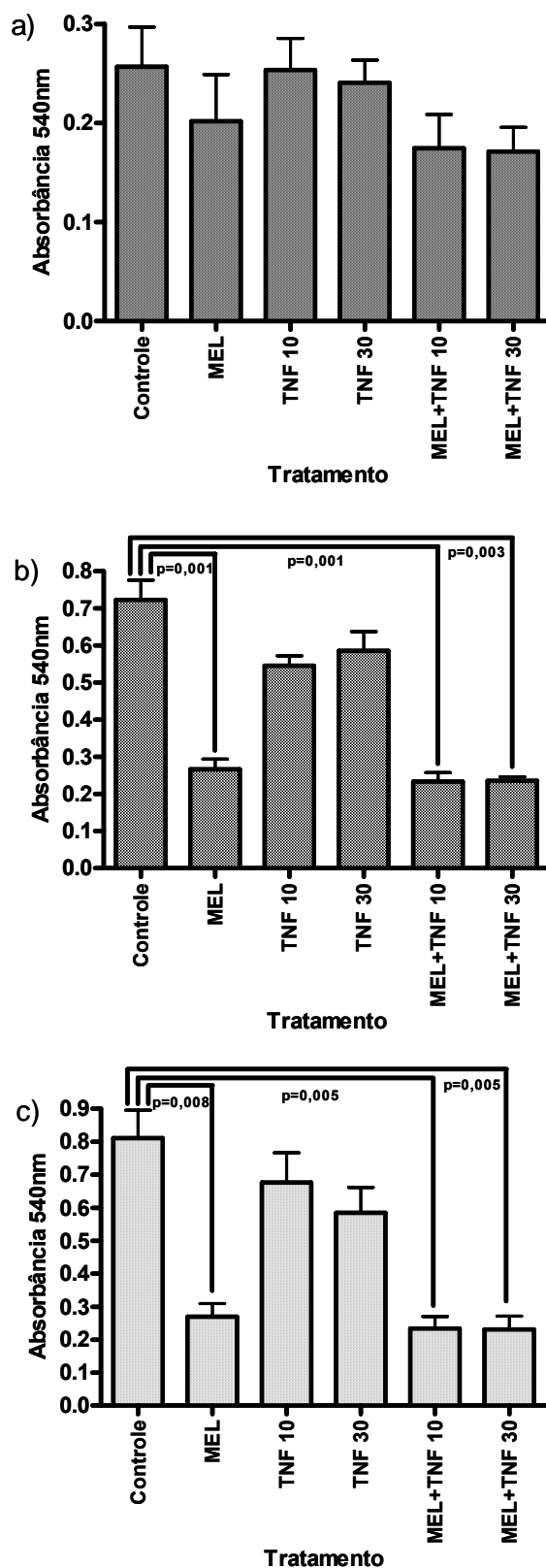
A partir da análise dos gráficos de toxicidade *in vitro* pode-se concluir que as linhagens B16F10 e B16F1 são sensíveis aos efeitos tóxicos do melfalano, que esta toxicidade é máxima em 48h, na dose utilizada, e que a adição de TNF não altera o perfil de toxicidade observada para o MEL (Figuras 8 e 9).



**Legenda:** Células da linhagem B16F10 foram colocadas em placas de 96 “wells” de fundo chato na concentração de  $1 \times 10^4$  células/poço e tratadas com PBS (controle), melfalano (36,9 $\mu$ M), TNF (10ng/mL ou 30ng/mL) ou melfalano e TNF (MEL+TNF), e incubadas por 24h (a), 48h (b) e 72h (c). A citotoxicidade foi avaliada pelo método do MTT. Cada experimento foi realizado em sextuplicata. As barras de erro representam o erro-padrão. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para comparação entre todos os grupos e o teste de Dunnett para análise de variância em amostras não-homogêneas na determinação da diferença entre os grupos, par a par.

**Figura 8** - Avaliação *in vitro* da toxicidade de melfalano e TNF contra células B16F10.





**Legenda:** Células da linhagem B16F1 foram colocadas em placas de 96 “wells” de fundo chato na concentração de  $1 \times 10^4$  células/poço e tratadas com PBS (controle), melfalano ( $36,9 \mu\text{M}$ ), TNF ( $10 \text{ ng/mL}$  ou  $30 \text{ ng/mL}$ ) ou melfalano e TNF (MEL+TNF), e incubadas por 24h, 48h e 72h. A citotoxicidade foi avaliada pelo método do MTT. Cada experimento foi realizado em sextuplicata. a) Citotoxicidade após 24h. b) Citotoxicidade após 48h. c) Citotoxicidade após 72h. As barras de erro representam o erro-padrão. Empregou-se o teste de Kruskal-Wallis para comparação entre todos os grupos e o teste de Dunnett para análise de variância em amostras não-homogêneas na determinação da diferença entre os grupos par a par.

**Figura 9** - Avaliação *in vitro* da toxicidade de melfalano e TNF contra células B16F1.

## 5.2 REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS *IN VIVO* EM CAMUNDONGOS INOCULADOS COM A LINHAGEM DE MELANOMA B16F10

### 5.2.1 Curvas de crescimento tumoral de B16F10 após tratamento *in vivo*

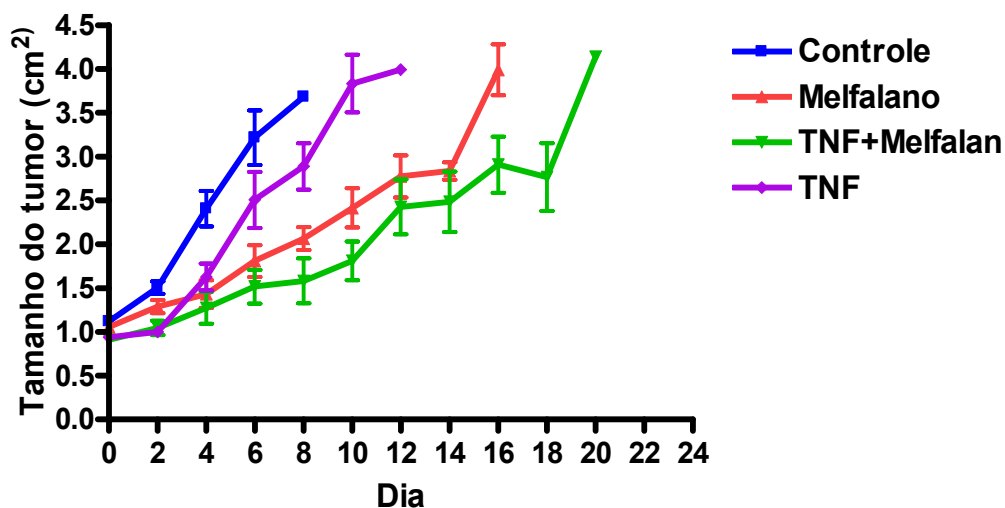
Após padronização das doses de melfalano e TNF a serem empregadas, passamos a repetir os mesmos tratamentos agora com os animais a serem usados no estudo.

Tratamos então 39 camundongos machos C57BL/6 com 6 a 8 semanas de idade e portando tumores de aproximadamente  $1,0 \pm 0,3 \text{cm}^2$  em ambos os flancos traseiros, com salina (10 animais), TNF 0,05mg/Kg (10 animais), melfalano (10 animais) e TNF+MEL (9 animais). Após 3 horas de tratamento, o tumor esquerdo foi removido cirurgicamente e acompanhamos o desenvolvimento do tumor contralateral até que atingisse  $3,0 \text{cm}^2$ .

Nos grupos tratados com MEL foi observado um retardo do crescimento tumoral do tumor remanescente após o tratamento (Figura 10). O tamanho dos tumores dos diferentes grupos era similar no dia 0. Comparando-se o tamanho dos tumores entre o dia 0 e o dia 6, houve estabilização do crescimento tumoral nos animais tratados com MEL ( $p=0,052$ , Tukey) e MEL+TNF ( $p=0,215$ , Tukey). O crescimento dos tumores nos grupos tratados com MEL foi estatisticamente diferente em relação ao grupo controle até o dia 6 (MEL x controle,  $p<0,001$  e MEL+TNF x controle,  $p<0,001$ , Tukey), mas esta diferença não foi observada entre o grupo controle e o tratado com TNF (TNF x controle,  $p=0,296$ , Tukey).

Não houve diferença do crescimento do tumor entre todos os grupos que receberam MEL (MEL x MEL+TNF,  $p=0,296$ , Tukey) até o dia 6. Verificou-se uma

tendência à diferença entre os grupos tratados com MEL e TNF (MEL x TNF,  $p=0,10$ , Tukey). O grupo tratado com com TNF isolado (MEL+TNF x TNF,  $p=0,006$ , Tukey).

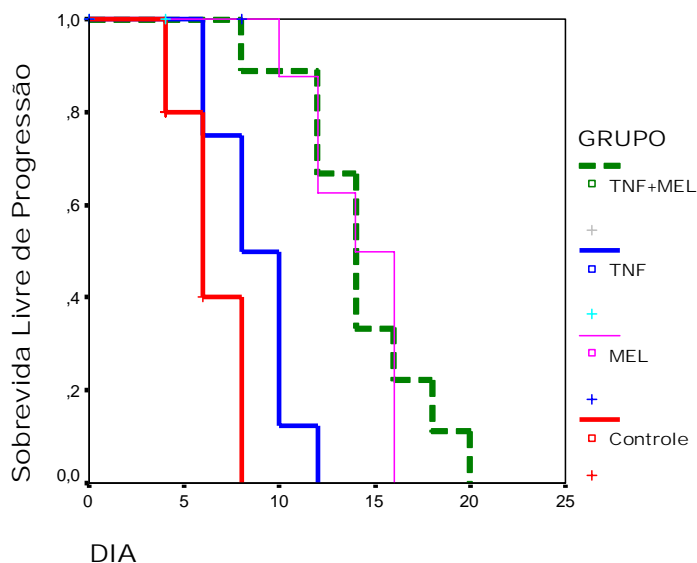


**Legenda:** Injetou-se  $5 \times 10^5$  células de melanoma da linhagem B16F10 em camundongos machos C57BL/6 de 6 a 8 semanas. Quando os tumores atingiram  $1 \pm 0,3 \text{ cm}^2$ , os animais receberam salina (controle), TNF (0,05mg/Kg), melfalano (12mg/Kg) ou a combinação das duas drogas (TNF+MEL) através da veia da cauda. Após 3 horas, removeu-se cirurgicamente o tumor do lado esquerdo e acompanhou-se o crescimento do tumor remanescente. O gráfico mostra a média do tamanho dos tumores e a barra de erro médio.

**Figura 10** – Curva de crescimento tumoral de B16F10 em camundongos C57BL/6 após tratamento com melfalano e/ou TNF.

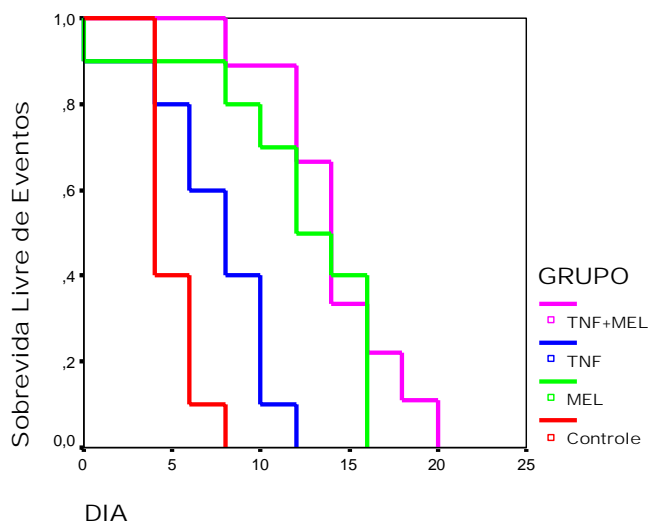
### 5.2.2 Curvas de sobrevida livre de progressão e sobrevida livre de eventos de camundongos inoculados com B16F10 após tratamento *in vivo*

A análise das curvas de sobrevida mostrou que o grupo tratado com TNF+MEL foi significativamente superior ao grupo controle (SLP  $p < 0,001$  e SLE  $p < 0,001$ , regressão de Cox) e ao grupo tratado com TNF ( $p = 0,001$  e  $p = 0,001$ , regressão de Cox) (Figuras 11 e 12). Entretanto, não houve diferença em relação grupo tratado com MEL apenas ( $p = 0,821$  e  $p = 0,637$ , regressão de Cox).



**Legenda:** Camundongos C57BL/6 de 6 a 8 semanas foram inoculados com células de melanoma B16F10 e tratados com salina (controle), TNF (0,05mg/Kg), melfalano (12mg/Kg) ou TNF e melfalano (TNF+MEL) quando os tumores atingiram  $1 \pm 0,3 \text{cm}^2$ . As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e a diferença determinada pelo log-rank.

**Figura 11** – Curvas de sobrevida livre de progressão tumoral de camundongos C57BL/6 inoculados com B16F10 após tratamento com melfalano e/ou TNF.



**Legenda:** Células de melanoma da linhagem B16F10 ( $5 \times 10^5$  cels) foram injetadas subcutaneamente em ambos os flancos traseiros de camundongos machos C57BL/6 de 6 a 8 semanas. Quando os tumores atingiram  $1 \pm 0,3 \text{cm}^2$ , os animais receberam salina (controle – 10 animais), TNF (0,05mg/Kg – 12 animais), melfalano (12mg/Kg – 12 animais) ou a combinação das duas drogas (TNF+MEL – 12 animais) através da veia da cauda. Após 3 horas, removeu-se cirurgicamente o tumor do lado esquerdo e acompanhou-se o crescimento do tumor remanescente. O gráfico mostra a média do tamanho dos tumores e a barra de erro médio para todos os animais submetidos a um determinado tratamento.

**Figura 12** – Curvas de sobrevida livre de eventos de camundongos C57BL/6 inoculados com B16F10 após tratamento com melfalano e/ou TNF.

### **5.3 REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS *IN VIVO* EM CAMUNDONGOS INOCULADOS COM A LINHAGEM DE MELANOMA B16F1**

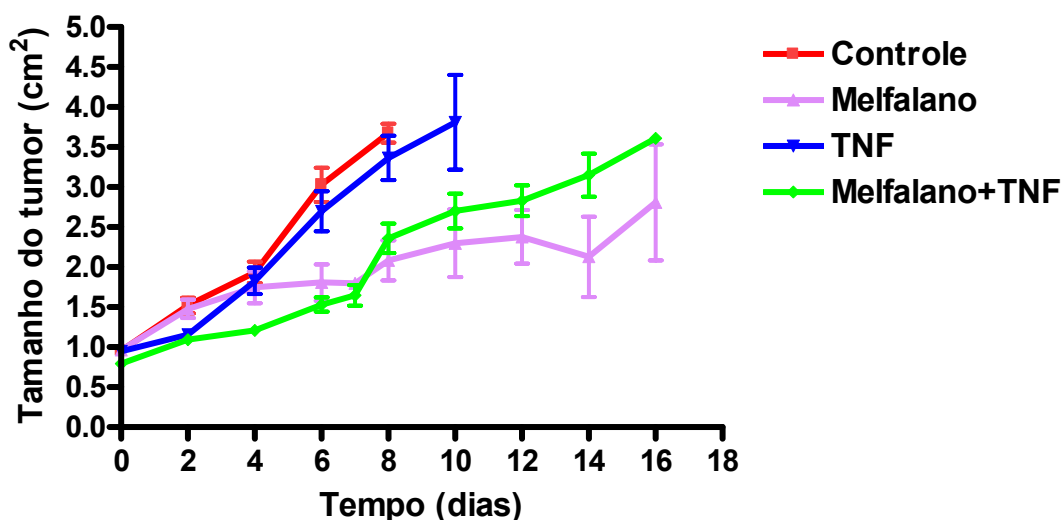
#### **5.3.1 Curvas de crescimento tumoral de B16F1 após tratamento *in vivo***

Não observamos diferença no tamanho dos tumores entre os diversos grupos de tratamento no D0 (Figura 13).

O tratamento com melfalano esteve associado a um retardo do crescimento tumoral nos dias 6 e 8 (D6 x D8,  $p=0,7809$ ). Verificamos que o tamanho dos tumores no grupo que recebeu MEL era estatisticamente menor em relação ao controle (Controle –  $3,69 \pm 0,1711$  x MEL –  $2,07 \pm 0,5833$ ,  $p=0,00119$ ).

O tratamento com TNF isolado também promoveu retardo no crescimento tumoral (D6 x D8,  $p=0,2214$ ), mas de menor magnitude (Controle –  $3,69 \pm 0,1711$  x TNF –  $2,32 \pm 1,1825$ ,  $p=0,000146$ ).

Houve ainda retardo do crescimento tumoral no grupo que recebeu tratamento combinado (D6 x D8,  $p=0,4223$ ). O tamanho dos tumores no D8 foi significativamente menor em relação ao grupo controle (Controle –  $3,69 \pm 0,1711$  x MEL+TNF -  $2,1446 \pm 0,7932$ ,  $p= 0,000354$ ). Quando comparado com o grupo que recebeu melfalano apenas não houve diferença significativa (MEL –  $2,07 \pm 0,5833$  x MEL+TNF -  $2,1446 \pm 0,7932$ ,  $p= 0,9952$ ).



**Legenda:** Injetou-se  $5 \times 10^5$  células de melanoma da linhagem B16F1 ( $5 \times 10^5$  cels) foram injetadas subcutaneamente em ambos os flancos traseiros de camundongos machos C57BL/6 de 6 a 8 semanas. Quando os tumores atingiram  $1 \pm 0,3 \text{ cm}^2$ , os animais receberam salina (controle – 10 animais), TNF (0,05mg/Kg – 12 animais), melfalano (12mg/Kg – 12 animais) ou a combinação das duas drogas (TNF+MEL – 12 animais) através da veia da cauda. Após 3 horas, removeu-se cirurgicamente o tumor do lado esquerdo e acompanhou-se o crescimento do tumor remanescente. O gráfico mostra a média do tamanho dos tumores e a barra de erro médio para todos os animais submetidos a um determinado tratamento.

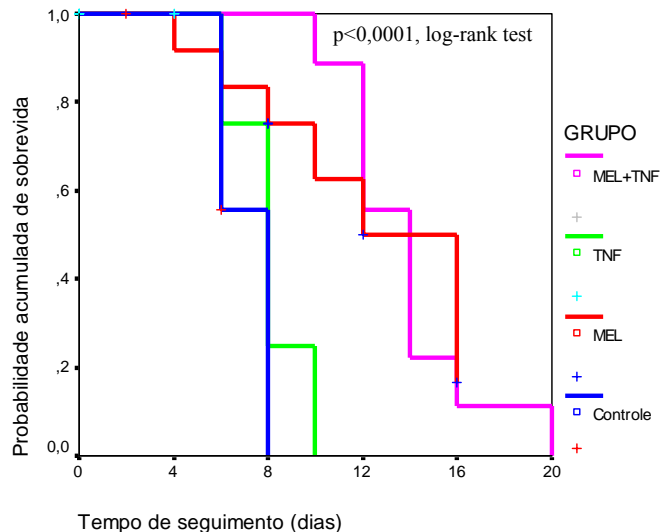
**Figura 13** - Curva de crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 inoculados com B16F1.

### 5.3.2 Curvas de sobrevida livre de progressão e sobrevida livre de eventos de camundongos inoculados com B16F1 após tratamento *in vivo*

A análise de sobrevida livre de progressão (SLP) (Figura 14) e sobrevida livre de eventos (SLE) (Figura 15) dos animais inoculados com B16F1 mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento ( $p < 0,0001$  e  $p = 0,001$ , respectivamente, log-rank test).

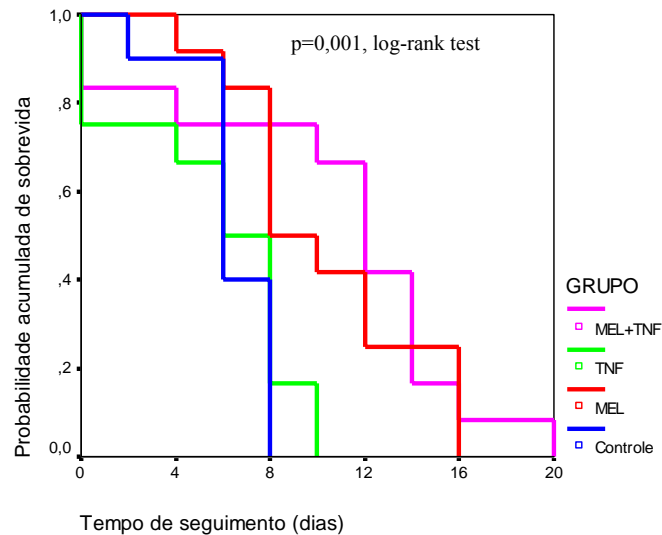
O tratamento com melfalano esteve associado com aumento da SLP em relação ao grupo controle (Controle x MEL, HR=0,107 95%IC:0,028-0,408,  $p = 0,001$ , Cox-regression). A adição de TNF não modificou esta resposta (Controle x MEL+TNF, HR=0,102 95%IC:0,026-0,395,  $p = 0,001$ , Cox-Regression).

A SLE também foi maior para os animais que receberam melfalano (Controle x MEL, HR=0,227 95%IC:0,081-0,635,  $p = 0,005$ , Cox-regression).



**Legenda:** Camundongos C57BL/6 de 6 a 8 semanas foram inoculados com células de melanoma B16F1 (40 animais) e tratados com melfalano (12mg/Kg), TNF (0,05mg/Kg), melfalano + TNF (MEL+TNF) ou salina (controle) após os tumores terem atingido  $1 \pm 0,3 \text{cm}^2$ . As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e a diferença determinada pelo teste de log-rank.

**Figura 14** - Curvas de sobrevida livre de progressão de animais inoculados com B16F1.



**Legenda:** Camundongos C57BL/6 de 6 a 8 semanas foram inoculados com células de melanoma B16F1 (40 animais) e tratados com melfalano (12mg/Kg), TNF (0,05mg/Kg), melfalano + TNF (MEL+TNF) ou salina (controle) após os tumores terem atingido  $1 \pm 0,3 \text{cm}^2$ . As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e a diferença determinada pelo teste de log-rank.

**Figura 15** - Curvas de sobrevida livre de eventos de animais inoculados com B16F1.

## **5.4 ANÁLISE DAS CURVAS DE CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA AGRUPANDO OS DADOS DE B16F10 E B16F1**

### **5.4.1 Curvas de crescimento tumoral de B16F10+B16F1 após tratamento *in vivo***

Como os resultados obtidos para os tumores derivados da inoculação com as linhagens B16F10 e B16F1 foram muito semelhantes e com o intuito de aumentarmos o poder da análise estatística dos dados, procedemos a análise das curvas de crescimento tumoral após agruparmos os animais que receberam o mesmo tratamento, independentemente da linhagem de melanoma com a qual foram inoculados.

Procedemos a análise das curvas de crescimento tumoral após agruparmos os animais que receberam o mesmo tratamento, independentemente da linhagem de melanoma com a qual foram inoculados (Figura 16).

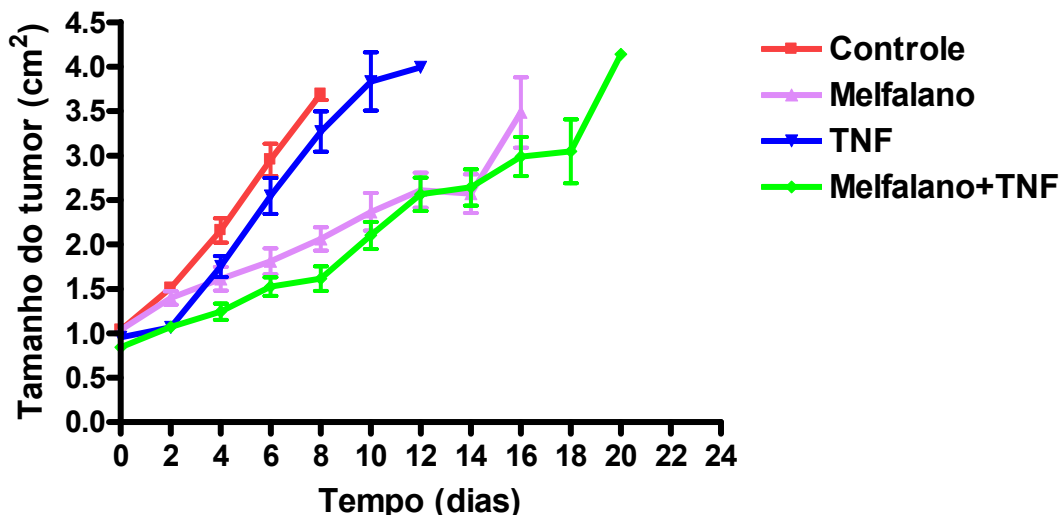
Verificamos que o tamanho dos tumores era estatisticamente diferente em relação ao grupo controle no D8 para todos os grupos de tratamento (controle x MEL,  $p=0,000119$ ; controle x TNF,  $p=0,000146$ ; controle x MEL+TNF,  $p=0,000120$ ).

Não houve alteração estatisticamente significativa do tamanho do tumor entre o D6 e D8 nos grupos que receberam melfalano (D6 x D8,  $p=0,7809$ ), TNF (D6 x D8,  $p=0,2214$ ) ou a combinação das duas drogas (D6 x D8,  $p=0,4223$ ), entretanto, no grupo controle foi observado um aumento significativo do tamanho tumoral (D6 x D8,  $p=0,002410$ ).

A adição de TNF não alterou a resposta ao melfalano no D6 (MEL x MEL+TNF,  $p=1,00$ ) ou D8 (MEL x MEL+TNF,  $p=0,9999$ ).

O tamanho dos tumores era homogêneo em todos os grupos de tratamento no D0.





**Legenda:** Injetou-se  $5 \times 10^5$  células de melanoma da linhagem B16F1 ou B16 F10 em camundongos machos C57BL/6 de 6 a 8 semanas. Quando os tumores atingiram  $1 \pm 0,3 \text{ cm}^2$ , os animais receberam salina (controle – 20 animais), TNF (0,05mg/Kg – 18 animais), melfalano (12mg/Kg – 22 animais) ou a combinação das duas drogas (TNF+MEL – 21 animais) através da veia da cauda. Após 3 horas, removeu-se cirurgicamente o tumor do lado esquerdo e acompanhou-se o crescimento do tumor remanescente. O gráfico mostra a média do tamanho dos tumores e a barra de erro médio para todos os animais submetidos a um determinado tratamento, independente da linhagem tumoral com a qual foi inoculado.

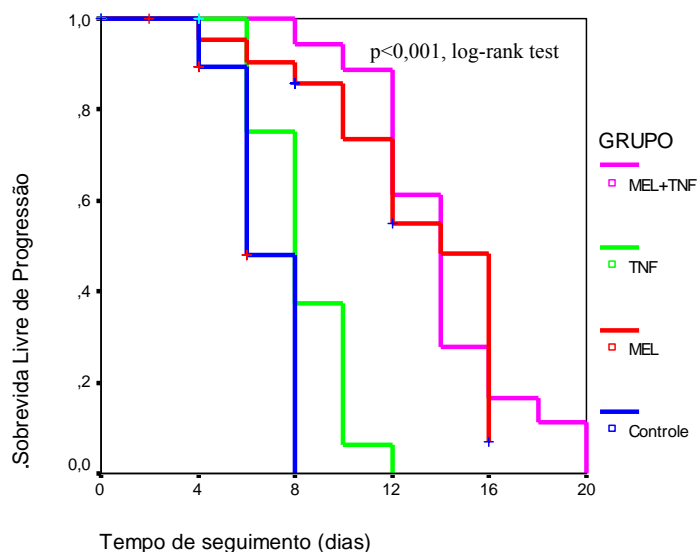
**Figura 16** - Curva de crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 inoculados com B16F1 e B16F10 agrupados após tratamento com melfalano e/ou TNF.

#### 5.4.2 Curvas de sobrevida livre de progressão e sobrevida livre de eventos de camundongos inoculados com B16F1+B16F10 após tratamento *in vivo*

A sobrevida livre de progressão (SLP) ( $p < 0,001$ , log-rank) (Figura 17) e a sobrevida livre de eventos (SLE) ( $p < 0,001$ , log-rank) (Figura 18) mostraram-se estatisticamente diferente entre os grupos de tratamento.

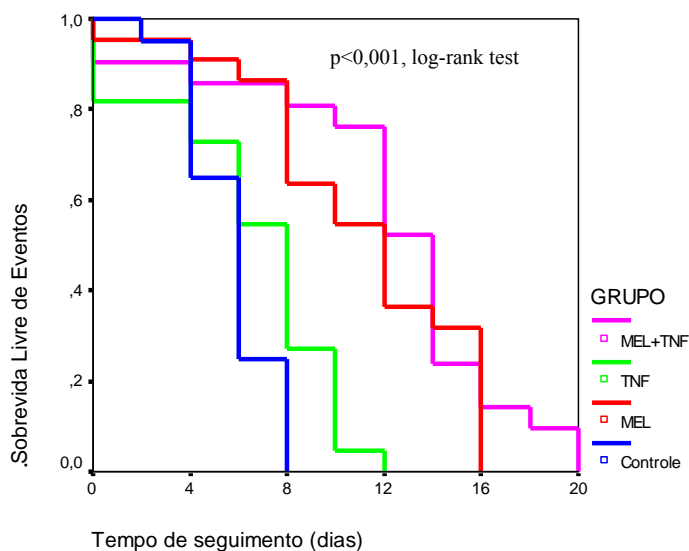
O grupo tratado com melfalano (MEL) apresentou SLP estatisticamente diferente do grupo controle (Controle x MEL, HR=0,074 95%IC:0,027-0,203,  $p < 0,001$ , Cox-regression) e a adição do TNF não modificou tal resposta (Controle x MEL+TNF, HR=0,069 95%IC:0,025-0,190,  $p < 0,001$ , Cox-regression) (MEL x MEL+TNF, HR=0,934 95%IC:0,454-1,923,  $p = 0,853$ , Cox-regression).

O TNF isoladamente não alterou a SLP (Controle x TNF, HR=0,463 95%IC:0,207-1,035,  $p = 0,061$ , Cox-regression).



**Legenda:** Camundongos C57BL/6 de 6 a 8 semanas foram inoculados com células de melanoma B16F1 (40 animais) e B16F10 (39 animais) e tratados com melfalano (12mg/Kg), TNF (0,05mg/Kg), melfalano + TNF (MEL+TNF) ou salina (controle) após os tumores terem atingido  $1 \pm 0,3 \text{cm}^2$ . As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e a diferença determinada pelo teste de log-rank.

**Figura 17** - Curvas de sobrevida livre de progressão agrupada de animais inoculados com B16F1 e B16F10.



**Legenda:** Camundongos C57BL/6 de 6 a 8 semanas foram inoculados com células de melanoma B16F1 (40 animais) e B16F10 (39 animais) e tratados com melfalano (12mg/Kg), TNF (0,05mg/Kg), melfalano + TNF (MEL+TNF) ou salina (controle) após os tumores terem atingido  $1 \pm 0,3 \text{cm}^2$ . As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e a diferença determinada pelo teste de log-rank.

**Figura 18** - Curvas de sobrevida livre de eventos agrupada de animais inoculados com B16F1 e B16F10.

## **5.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS TUMORES DE DESENVOLVIDOS A PARTIR DA INOCULAÇÃO DE B16F10 E B16F1 APÓS TRATAMENTO *IN VIVO***

Os tumores de  $1,0 \pm 0,3 \text{cm}^2$  extraídos dos camundongos após 3h do tratamento sistêmico com Salina (controles), MEL (12mg/Kg), TNF (0,05mg/Kg) ou a combinação TNF+MEL foram imediatamente fixados em formalina. Após o processamento, cortes de  $4,0 \mu\text{m}$  de espessura foram corados com hematoxilina-eosina e submetidos à análise.

Foram registrados dados referentes ao número total de células de melanoma por campo, número de mitoses, razão entre número de mitoses e número total de células, área total fotografada do tumor, área de necrose, razão entre área de necrose e área total, área de hemorragia e razão entre área de hemorragia e área total.

A única diferença estatisticamente significativa encontrada foi a de que o tratamento com TNF esteve associado ao aumento da área de necrose e da razão área de necrose/área tumoral total, quando avaliados os animais inoculados com B16F10 e B16F1 conjuntamente, tanto em relação ao grupo controle, quanto em relação ao grupo tratado com MEL (MEL x TNF,  $p=0,001$  e MEL x MEL+TNF,  $p=0,001$ , para necrose; e MEL x TNF,  $p=0,001$  e MEL x MEL+TNF,  $p=0,001$ ; para razão área de necrose/área tumoral total) (Tabela 1).

**Tabela 1** – Comparação dos parâmetros histopatológicos dos tumores de camundongos submetidos a tratamento sistêmico com salina (controle), melfalano (MEL), TNF (TNF) ou melfalano + TNF (MEL+TNF).

Parâmetro	Tratamento	B16F1		B16F10		B16F1+B16F10	
		Média	p	Média	p	Média	p
Área tumoral total ( $\mu\text{m}^2$ )	Controle	33025,7572		338867406		33810,5732	
	MEL	32566,2148	NS	33109,3848	NS	33045,4824	NS
	TNF	32265,3903	NS	33502,3518	NS	33407,0970	NS
	MEL+TNF	32902,5819	NS	32890,8389	NS	32892,0132	NS
Número total de células (média de 10 campos de 400x)	Controle	110,7811		78,42		81,18	
	MEL	138,3546	NS	70,96	NS	78,88	NS
	TNF	89,2375	NS	57,39	NS	<b>59,88</b>	<0,001
	MEL+TNF	112,7580	NS	52,67	NS	<b>58,68</b>	<0,001
Mitoses (média de 10 campos de 400x)	Controle	0,8489		7,20		0,75	
	MEL	<b>0,3083</b>	0,010	<b>2,67</b>	0,008	<b>0,27</b>	<0,001
	TNF	<b>0,2000</b>	0,004	<b>1,50</b>	0,000	<b>0,16</b>	<0,001
	MEL+TNF	<b>0,2120</b>	0,003	<b>1,67</b>	0,001	<b>0,17</b>	<0,001
Mitoses / Número total de células	Controle	0,0067		0,008596		0,0085	
	MEL	<b>0,0022</b>	0,004	<b>0,004196</b>	0,049	<b>0,0040</b>	0,002
	TNF	<b>0,0016</b>	0,003	<b>0,001686</b>	0,001	<b>0,0017</b>	0,000
	MEL+TNF	<b>0,0020</b>	0,004	<b>0,002138</b>	0,002	<b>0,0021</b>	0,000
Necrose ( $\mu\text{m}^2$ )	Controle	7067,9971		2725,7623		3164,3807	
	MEL	3943,8254	NS	5819,2738	0,672	5598,6328	NS
	TNF	11712,7986	NS	<b>11107,9577</b>	0,017	<b>11216,6378</b>	<0,001
	MEL+TNF	10258,2255	NS	<b>10964,7363</b>	0,024	<b>10894,0852</b>	<0,001
Necrose / Área tumoral total	Controle	0,2115		0,08133		0,0945	
	MEL	0,1088	NS	0,1828	0,608	0,1741	NS
	TNF	0,3545	NS	<b>0,3324</b>	0,017	<b>0,3359</b>	<0,001
	MEL+TNF	0,3180	NS	<b>0,3465</b>	0,014	<b>0,3437</b>	<0,001
Hemorragia ( $\mu\text{m}^2$ )	Controle	322,7013		255,59		266,5347	
	MEL	748,6559	NS	283,13	NS	337,8936	NS
	TNF	2422,1888	NS	1622,31	NS	1662,0250	NS
	MEL+TNF	661,9134	NS	833,37	NS	824,4652	NS
Hemorragia / Área tumoral total	Controle	0,0094		0,00736		0,0077	
	MEL	0,0247	NS	0,00857	NS	0,0105	NS
	TNF	0,0713	NS	0,04734	NS	0,0486	NS
	MEL+TNF	0,0200	NS	0,02443	NS	0,0240	NS

**Legenda:** Todas as comparações são em relação ao grupo controle. Empregamos o teste de Tukey para múltiplas comparações entre os grupos. Foram considerados estatisticamente significativos valores de  $p < 0,05$ . Os números destacados em vermelho representam os valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle. NS – não significativo

## **5.6 ANÁLISE DE DENSIDADE VASCULAR DOS TUMORES DESENVOLVIDOS A PARTIR DA INOCULAÇÃO DE B16F1 E B16F10 APÓS TRATAMENTO *IN VIVO***

Observamos uma área tumoral discretamente reduzida para os animais inoculados com B16F10 que receberam TNF em relação ao controle (Tabela 1) e aos animais tratados com melfalano (MEL x TNF,  $p=0,011$  e MEL x MEL+TNF,  $p=0,016$ ). Tal diferença em relação aos animais tratados com melfalano também foi verificada quando avaliamos os dados agrupados dos animais inoculados com B16F10 e B16F1 (MEL x MEL+TNF,  $p=0,049$ ).

O tratamento com melfalano esteve associado com redução do número absoluto de vasos CD34+ e da densidade de vasos CD34+ (número de vasos/área do tumor) em relação ao grupo controle (Tabela 2) e ao grupo que recebeu melfalano + TNF (MEL x MEL+TNF,  $p=0,002$ ). Na análise combinada dos tumores de animais inoculados com B16F10 e B16F1, o tratamento com melfalano esteve associado com uma redução da densidade de vasos CD34+ em relação a todos os outros grupos de tratamento, mas tal diferença só se mostrou estatisticamente significativa em relação ao grupo que recebeu TNF (MEL x TNF,  $p=0,019$ ).

**Tabela 2** – Comparação dos parâmetros histopatológicos relacionados à densidade vascular dos tumores de camundongos submetidos a tratamento sistêmico com salina controle), melfalano (MEL), TNF (TNF) ou melfalano + TNF (MEL+TNF).

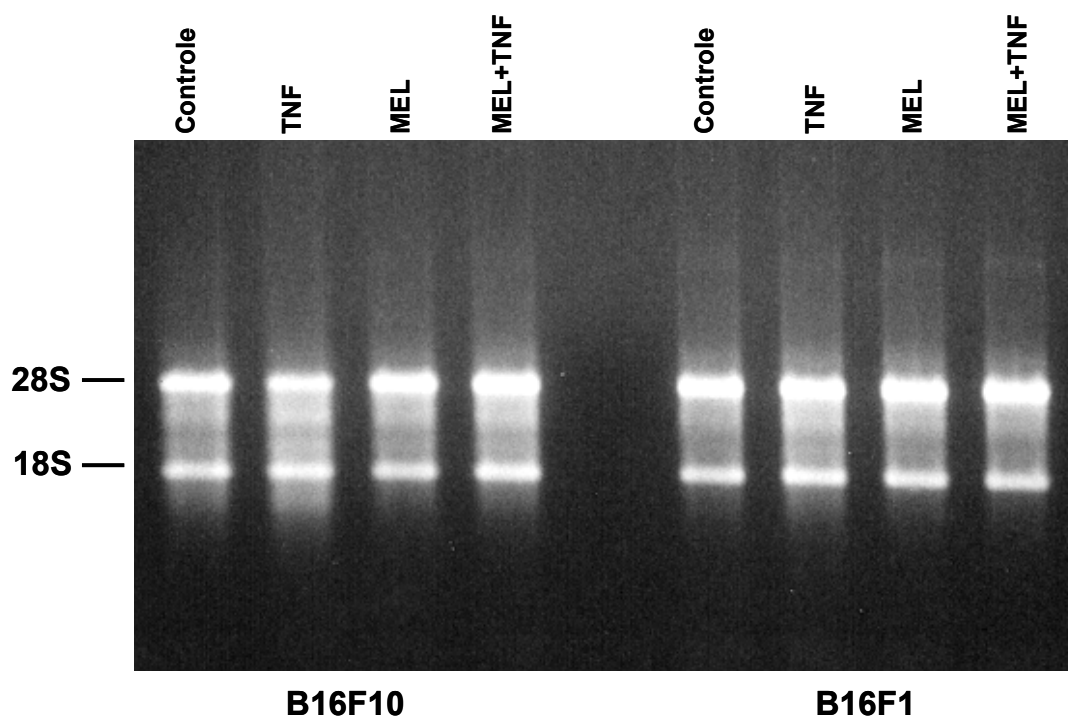
Parâmetro	Tratamento	B16F1		B16F10		B16F1+B16F10	
		Média	p	Média		Média	p
Área tumoral total (mm <sup>2</sup> ) (ATT)	Controle	0,07210		0,07264		0,0724	
	MEL	0,07233	NS	0,07278		0,0725	NS
	TNF	0,07196	NS	<b>0,07172</b>	,027	0,0718	NS
	MEL+TNF	0,07179	NS	<b>0,07171</b>	,038	0,0718	NS
Número de vasos CD34+ (NVCD34+)(média de 20 campos de 400x)	Controle	0,785		0,620		0,7025	
	MEL	<b>0,445</b>	0,002	0,622	NS	0,5417	NS
	TNF	0,650	NS	0,863	NS	0,7755	NS
	MEL+TNF	0,800	NS	0,619	NS	0,7094	NS
NVCD34+ / ATT(mm <sup>2</sup> )	Controle	10,95062		8,55117		9,7509	
	MEL	<b>6,16645</b>	0,002	8,56315	NS	7,4788	NS
	TNF	9,04290	NS	12,10172	NS	10,8422	NS
	MEL+TNF	10,94510	NS	8,72675	NS	9,8359	NS
Número de vasos CD34- (NVCD34-)(média de 20 campos de 400x)	Controle	0,020		0,050		0,0350	
	MEL	0,045	NS	0,033	NS	0,0417	NS
	TNF	0,007	NS	0,067	NS	0,0422	NS
	MEL+TNF	0,006	NS	0,063	NS	0,0344	NS
NVCD34- /ATT (mm <sup>2</sup> )	Controle	0,27435		0,68587		0,4801	
	MEL	0,61728	NS	0,45725	NS	0,5716	NS
	TNF	0,09798	NS	0,92592	NS	0,5850	NS
	MEL+TNF	0,08573	NS	0,85734	NS	0,4715	NS

**Legenda:** Todas as comparações são em relação ao grupo controle. Empregamos o teste de Tukey para múltiplas comparações entre os grupos. Foram considerados estatisticamente significativos valores de  $p < 0,05$ . Os números destacados em vermelho representam os valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle. NS – não significativo.

## 5.7 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E INTEGRIDADE DOS RNA EXTRAÍDOS E AMPLIFICADOS

O rendimento da extração de RNA das células variou de 78 a 170µg para a linhagem B16F10 e de 160 a 285µg para linhagem B16F1 e o RNA obtido foi de boa qualidade como podemos verificar pela intensidade e definição das bandas de 28S e 18S no gel de agarose (Figuras 19 e 20).

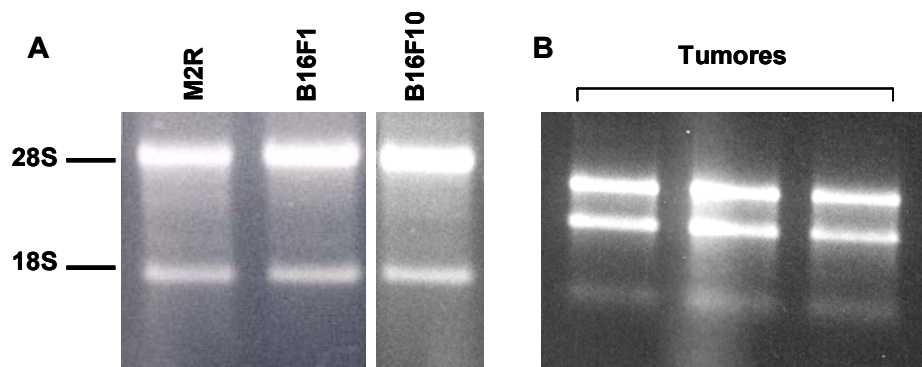
O rendimento da extração de RNA em média de 1000µg para cada metade de tumor empregada (Figuras 20 e 21).



**Legenda:** Submeteu-se 1,0 $\mu$ g de RNA total extraído pelo método do TRIZOL de células de melanoma das linhagens B16F10 e B16F1 tratadas *in vitro* com PBS (controle), TNF (10ng/mL), melfalano (36,9 $\mu$ M) ou melfalano+TNF (MEL+TNF), a eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio.

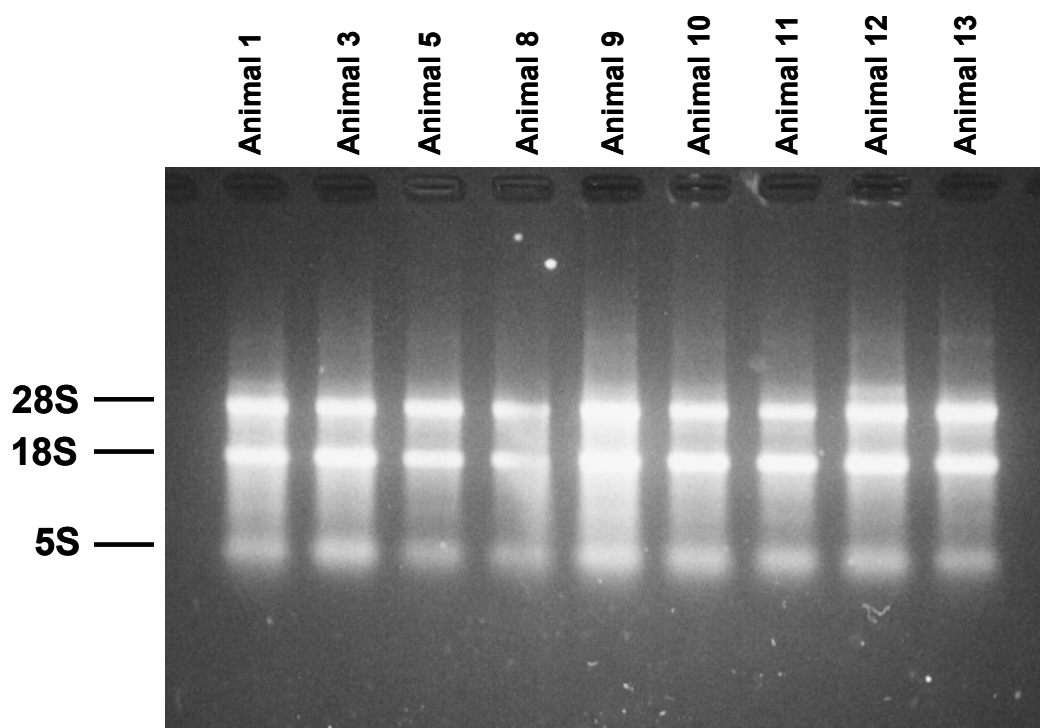
**Figura 19** – Eletroforese das amostras de RNA extraídas de linhagens de melanoma após tratamento com melfalano e/ou TNF.

Como podemos verificar na Figura 20, o protocolo que temos utilizado tem nos permitido obter RNAs de boa qualidade e integridade tanto a partir das culturas de células das linhagens tumorais (Figura 20A), quanto dos tumores gerados nos animais (Figura 20B), mesmo após tratamento (Figura 21).



**Legenda:** 1,0 $\mu$ g de RNA total extraído de cultura de células de melanoma pelo método do TRIZOL (Painel A) ou de tumores, obtidos pela inoculação subcutânea de células de melanoma da linhagem B16F10 em camundongos C57BL/6 (Painel B), foram fracionados eletroforéticamente em gel de agarose a 1% em TAE e corado com brometo de etídio. As bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S são indicadas e servem para avaliação da integridade das amostras de RNA. Nas amostras extraídas dos tumores, a terceira banda mais inferior corresponde ao RNA ribossomal 5S.

**Figura 20** – Eletroforese em gel de agarose 1% das amostras de RNA extraídas de células de melanoma e tumores.



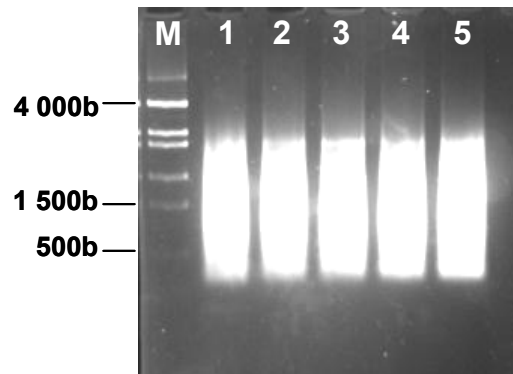
**Legenda:** Submeteu-se 1,0 $\mu$ g de RNA total extraído pelo método do TRIZOL de tumores obtidos a partir da inoculação de  $5 \times 10^6$  células de melanoma da linhagem B16F10 tratadas *in vivo* com melfalano (12mg/Kg), a eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio

**Figura 21** – Eletroforese das amostras de RNA extraídas de tumores após tratamento *in vivo* com melfalano.



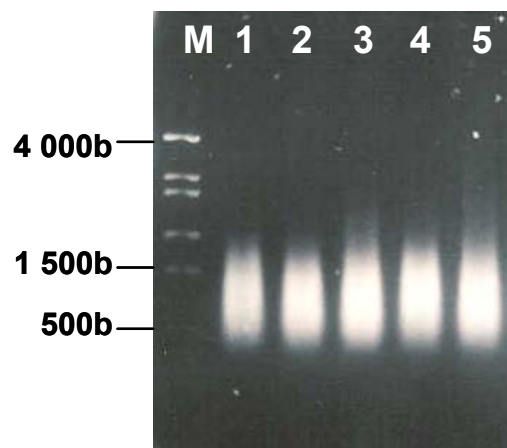
Na plataforma que utilizamos proveniente do Fox Chase Cancer Center, os oligonucleotídeos imobilizados encontram-se no sentido “sense”. Portanto precisávamos gerar sondas no sentido “antisense” para hibridização destes arrays. Por isso, optamos por usar sondas de RNA e não cDNA, uma vez que no processo de amplificação os RNA gerados são “antisense”. As amostras de aRNA foram geradas utilizando dois ciclos de amplificação. Como no primeiro ciclo de amplificação o tamanho dos aRNA é maior, seria necessária, para melhor obtenção do sinal na hibridização contra os oligonucleotídeos, uma fragmentação destes RNA, o que poderia levar a uma perda de qualidade da sonda.

O rendimento médio do primeiro ciclo de amplificação do RNA foi de 7,5 vezes. O rendimento médio do segundo ciclo foi de 36 vezes. Como pode ser observado na Figura 22, o perfil dos aRNA obtidos no primeiro ciclo de amplificação indicou a obtenção de transcritos cujos tamanhos variaram na faixa de, aproximadamente, 3400 a 500 bases com um pico de predominância no tamanho de 1500 bases. Este perfil indica uma boa eficiência do processo de amplificação, uma vez que a maioria dos mRNA encontrados nas células tem o tamanho em torno de 1500 bases. Quando foi feito o segundo ciclo de amplificação foram obtidos RNA de tamanhos menores, mas, ainda assim, como pode ser verificado na Figura 23, os aRNA obtidos após a amplificação do segundo ciclo ainda apresentavam uma boa qualidade para utilização nos arrays, com tamanhos que variaram de aproximadamente 400 a 1000 bases.



**Legenda:** Eletroforese, em gel de agarose 1% em TAE e corado com brometo de etídeo, de 1,0 $\mu$ g de RNA submetido a um ciclo de amplificação seguindo protocolo descrito no item 4.12.. Na canaleta M foi fracionado um marcador cujo tamanho das bandas está indicado na figura. Canaleta 1: aRNA proveniente da cultura de B16F10 após 3h de tratamento com Melfalano (MEL) e TNF. Canaletas 2, 3, 4 e 5: aRNAs obtidos de culturas de B16F1 após 3h de tratamento com salina, MEL, TNF e MEL+TNF.

**Figura 22** – Fracionamento eletroforético do RNA extraído das culturas de melanoma após o primeiro ciclo de amplificação.



**Legenda:** Eletroforese, em gel de agarose 1% em TAE e corado com brometo de etídeo, de 1,0 $\mu$ g de RNA após o segundo ciclo de amplificação e incorporação do aminoallyl rUTP de acordo com o protocolo descrito no item 4.12. Na canaleta M foi fracionado um marcador cujo tamanho das bandas está indicado na figura. Canaleta 1: aRNA proveniente da cultura de B16F10 após 3h de tratamento com melfalano (MEL) e TNF. Canaletas 2, 3, 4 e 5: aRNAs obtidos de culturas de B16F1 após 3h de tratamento com salina, MEL, TNF e MEL+TNF.

**Figura 23** – Fracionamento eletroforético do RNA extraído das culturas de melanoma após o segundo ciclo de amplificação.

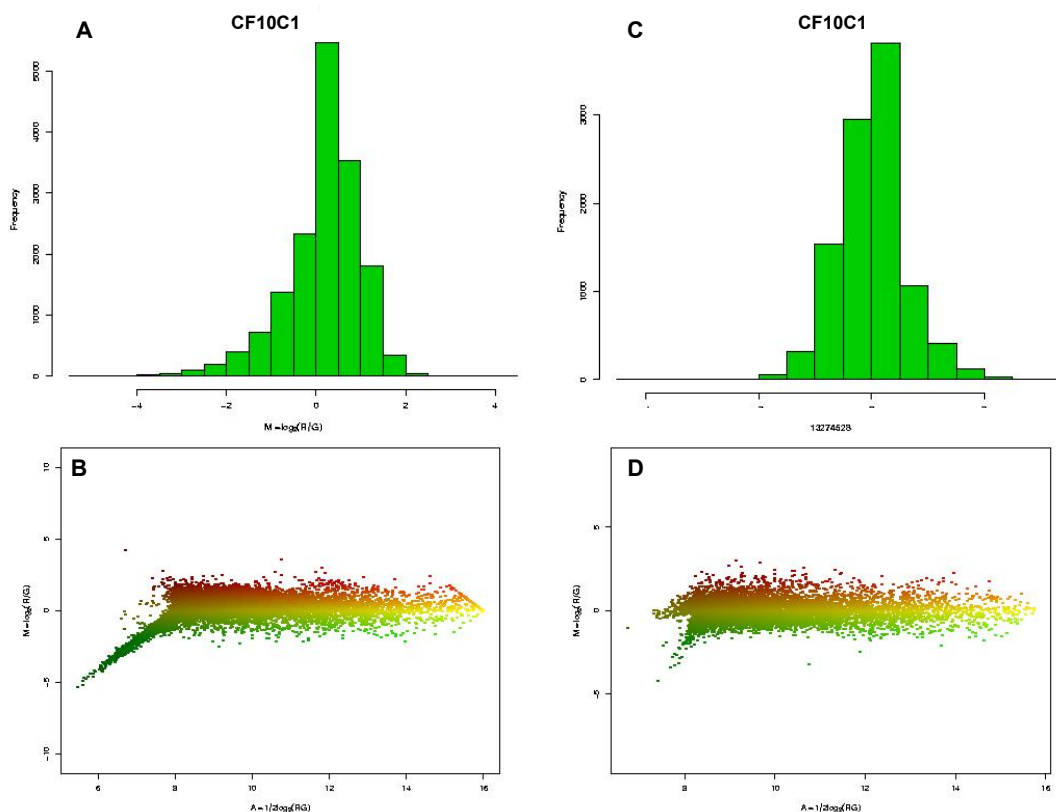
## 5.8 ANÁLISE DA QUALIDADE DAS LÂMINAS DE OLIGUNUCLEOTÍDEOS

Após a hibridização das plataformas seguindo os protocolos descritos no tópico materiais e métodos, foi feita uma etapa de captação das imagens. Os sinais de intensidade de fluorescência de cada “spot”, foram captados através de um “scanner” confocal a laser (ScanArray™ Express, PerkinElmer Life Sciences, MD, USA), usando uma resolução de 10 microns e sensibilidade de captação PMT 60% para o canal Alexa 555 e 70% para o Alexa 647. Cada lâmina gerou uma tabela de dados para cada canal correspondente aos corantes Alexa 555 e Alexa 647.

Inicialmente, foi feita uma pré-análise das lâminas pelo Laboratório de Bioinformática do Hospital do AC Camargo. Para normalização dos dados, ajustando variações sistemáticas lineares e não lineares, ambas do tipo intensidade dependentes, principalmente para spots de baixa intensidade, foi empregado o método de regressão linear localmente ponderada LOWESS (Locally Weighted Scatter-plot Smoothing). Primeiramente, representações gráficas tipo *scatter-plot* foram geradas para cada lâmina, individualmente (Figuras 24 e 25). Nos gráficos tipo MA-plot, 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  $\log_2$  ( $A = \frac{1}{2} \log_2 RG$ ). Os valores de intensidade R e G referem-se à incorporação dos corantes Alexa 647 (RED) e Alexa 555 (GREEN).

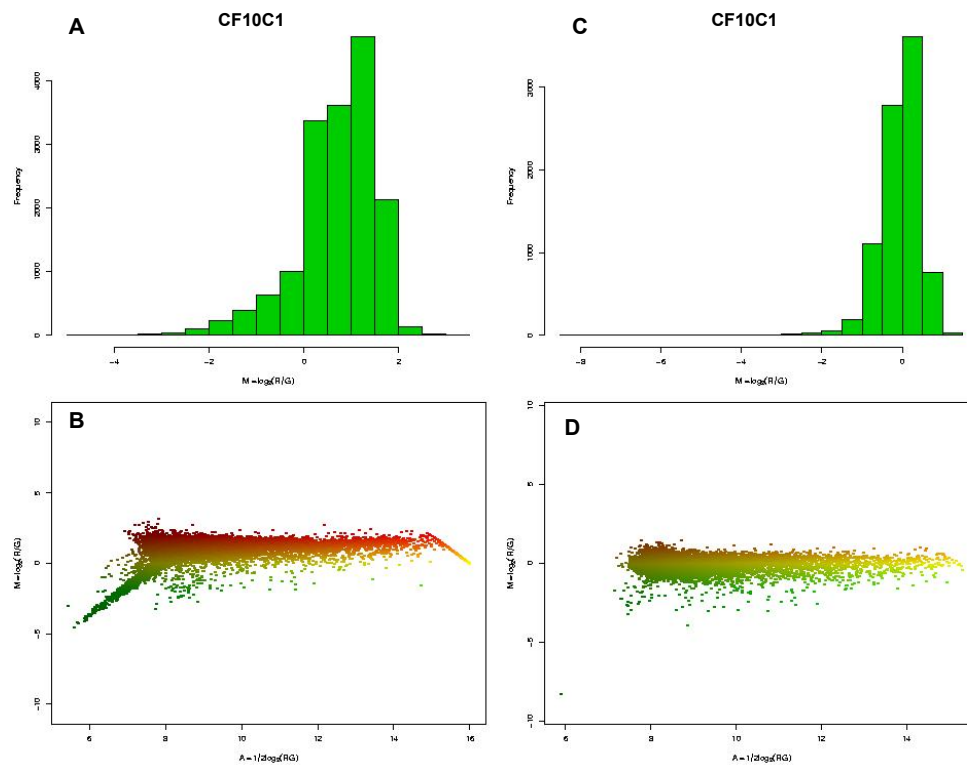
Na Figura 24 são mostrados os dados obtidos à partir da hibridização dos “arrays” com a amostra CF10C1 (cultura de B16F10 controle, tratada com PBS) marcada com Alexa 555 contra o aRNA de referência marcado com Alexa 647, ou seja, a lâmina que chamamos de “main”. Já na Figura 25 são mostrados os dados

obtidos da lâmina “swap” para a mesma amostra, ou seja, agora a amostra foi marcada com Alexa 647 e a referência com o fluoróforo Alexa 555. A Figura 25 mostra gráficos semelhantes para uma lâmina “main” de uma amostra de tumor tratada *in vivo* com melfalano e TNF. A figura 26 mostra o mesmo tipo de análise para uma amostra de RNA extraída de tumor (F10MT11).



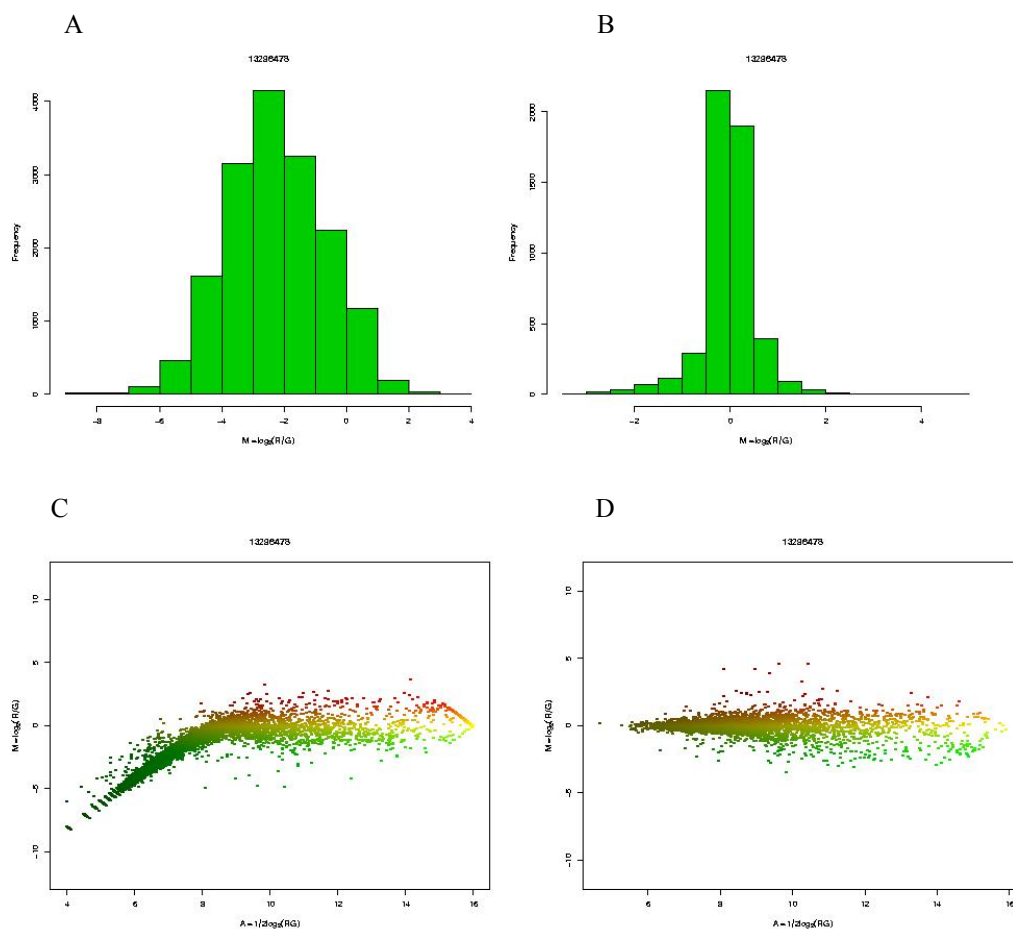
**Legenda:** Utilizou-se para normalização o método de LOWESS. A) Freqüência da razão dos dados não normalizados; B) Gráfico tipo MA-plot que representa as razões e as médias das intensidades de sinal dos dados não normalizados; C) Freqüência da razão dos dados após sua normalização; D) Gráfico do tipo MA-plot que representa as razões e as médias das intensidades de sinal dos dados normalizados.

**Figura 24** - Exemplo da normalização dos dados obtidos para uma das lâminas do experimento onde a amostra (cultura da linhagem B16F10 tratada com PBS) foi marcada com Alexa 555 e a referência com Alexa 647 (Lâmina “main”).



**Legenda:** Utilizou-se para normalização o método de regressão não linear de LOWESS. A) Freqüência da razão dos dados não normalizados; B) Gráfico tipo MA-plot que representa as razões e as médias das intensidades de sinal dos dados não normalizados; C) Freqüência da razão dos dados após sua normalização; D) Gráfico do tipo MA-plot que representa as razões e as médias das intensidades de sinal dos dados normalizados. Nesta figura são apresentados os dados obtidos para a mesma amostra apresentada na figura 23 (CF10C1) só que desta vez, correspondentes à lâmina “swap”.

**Figura 25** - Exemplo da normalização dos dados obtidos para uma das lâminas do experimento onde a amostra (cultura da linhagem B16F10 tratada com PBS) foi marcada com Alexa 647 e a referência com Alexa 555 (lâmina “swap”).



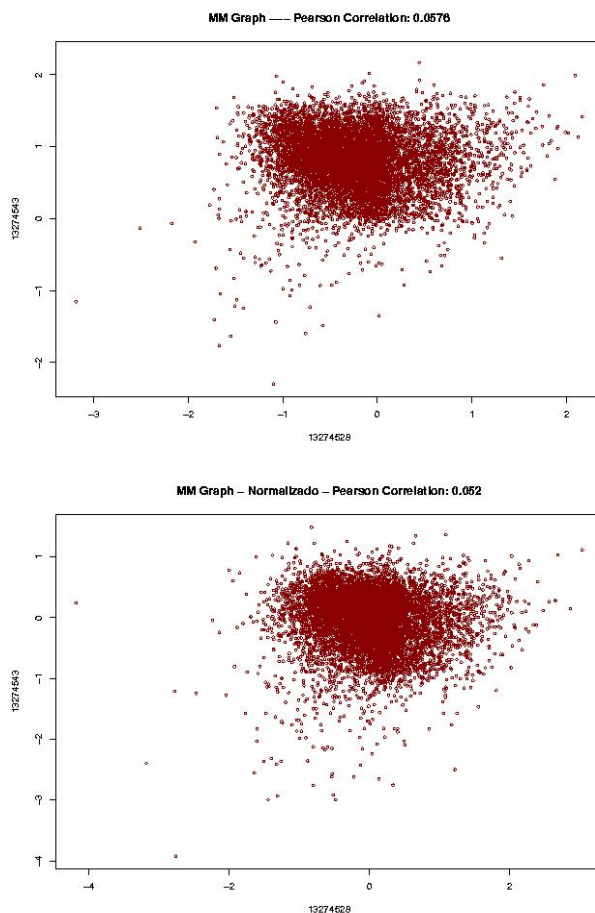
**Legenda:** Utilizou-se para normalização o método de regressão não linear de LOWESS. A) Frequência da razão dos dados não normalizados; B) Gráfico tipo MA-plot que representa as razões e as médias das intensidades de sinal dos dados não normalizados; C) Frequência da razão dos dados após sua normalização; D) Gráfico do tipo MA-plot que representa as razões e as médias das intensidades de sinal dos dados normalizados. Nesta figura são apresentados os dados obtidos para a amostra F10MT11.

**Figura 26** - Exemplo da normalização dos dados obtidos para uma das lâminas do experimento onde a amostra (tumor desenvolvido a partir da inoculação de células da linhagem B16F10 e tratada com melfalano e TNF) foi marcada com Alexa 555 e a referência com Alexa 647 (Lâmina “main”).

Para determinação da reprodutibilidade do nosso experimento em que hibridizações em duplicata (“main” e “swap”) foram feitas, foi calculado o Índice de Correlação de Pearson, que permite verificar se existe correlação linear entre os dados.

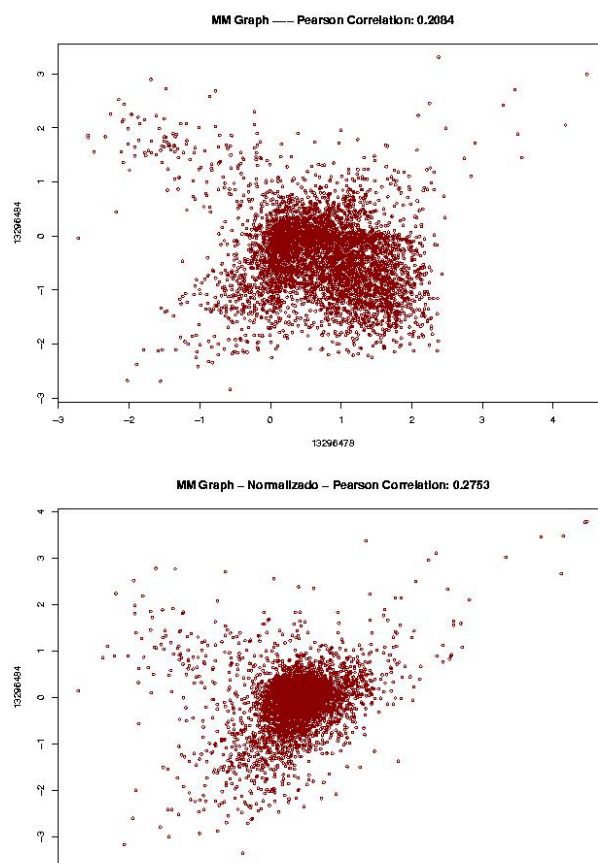
Neste estudo, todas as amostras foram hibridizadas contra um RNA de referência composto de um “pool” de linhagens de melanoma do qual as próprias

linhagens B16F10 e B16F1 fizeram parte. Desta forma, a maioria dos genes da amostra e da referência apresenta padrão de expressão semelhante e, por isso, o Índice de Correlação de Pearson tende a ficar próximo de zero. Nas Figuras 27 e 28, são apresentadas as representações gráficas tipo *MM-plot* geradas para as amostras CF10C1 e F10MT11.



**Legenda:** Na análise da qualidade dos dados obtidos foi calculado o Índice de Correlação de Pearson entre a lâmina “main” e a “swap” de cada uma das amostras do experimento. Como o RNA de referência usado neste estudo apresenta perfil de expressão da maioria dos genes muito semelhante ao encontrado para as amostras, o índice de correlação tende a ser próximo de zero. Neste gráfico é mostrada a representação gráfica, por *MM-plot*, referente à amostra 1 da linhagem B16F10 tratada com PBS (CF10C1) onde M representa a diferença entre a intensidade R e G, em  $\log_2$  ( $M = \log_2 R/G$ ).

**Figura 27** - Representação gráfica tipo *MM-plot* (razão lâmina “main” X razão lâmina “swap”) para a amostra CF10C1.



**Legenda:** Na análise da qualidade dos dados obtidos foi calculado o Índice de Correlação de Pearson entre a lâmina “main” e a “swap” de cada uma das amostras do experimento. Neste gráfico é mostrada a representação gráfica, por *MM-plot*, referente à amostra 11 da do tumor desenvolvido a partir de células da linhagem B16F10 tratada com melfalano e TNF (F10MT11), onde M representa a diferença entre a intensidade R e G, em  $\log_2$  ( $M = \log_2 R/G$ ).

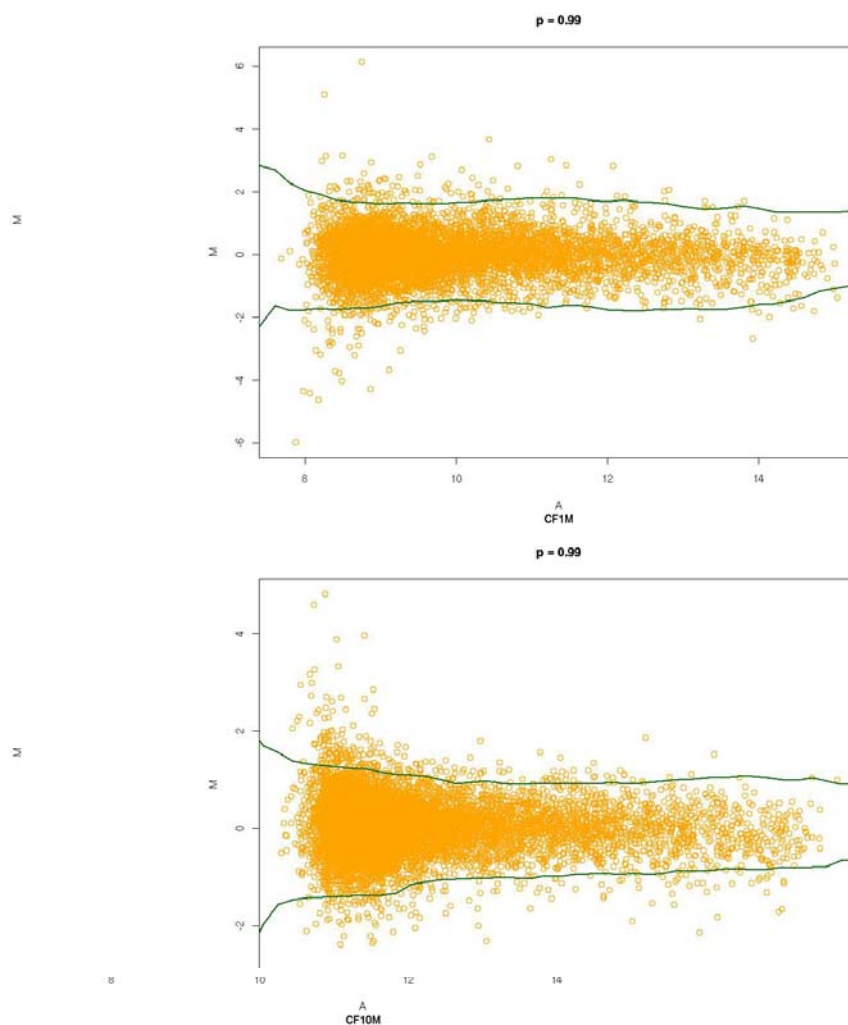
**Figura 28** - Representação gráfica tipo MM-plot (razão lâmina “main” X razão lâmina “swap”) para a amostra F10MT11.

## 5.9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA APÓS TRATAMENTO *IN VITRO* DE LINHAGENS CELULARES DE MELANOMA

Devido ao pequeno número de amostras e à impossibilidade de agrupá-las, em decorrência da variância alta dentro de cada grupo de tratamento, usamos a estratégia de construir um gráfico do tipo MA-plot com a média dos dados das amostras-controle para as linhagens B16F1 e B16F10, separadamente, e gerar, a partir deste, uma curva que delimitasse 99% dos pontos. Em seguida, foram gerados gráficos



semelhantes para cada grupo de tratamento, que foram superpostos à curva do grupo controle de cada linhagem. Os genes correspondentes aos pontos localizados fora da curva de 99% foram considerados diferencialmente modulados em relação ao grupo controle. Foram excluídos os genes com elevada razão entre o sinal da amostra e da referência, mas com baixo sinal de intensidade. A Figura 29 mostra os gráficos gerados para as comparações dos grupos tratados com melfalano da linhagem B16F10 (CF10M) e B16F1 (CF1M).



**Legenda:** Gráficos do tipo MA-plot para as amostras de células das linhagens B16F1 e B16F10 tratadas *in vitro* com melfalano. As linhas contínuas delimitam a área onde se encontram 99% dos pontos obtidos nos gráficos do tipo MA-plot para as respectivas amostras controle. Os pontos que estão fora da área delimitada correspondem a genes modulados significativamente em relação as amostras-controle. São descartados os genes com alta razão de intensidade e baixa intensidade média.

**Figura 29** – Gráficos do tipo MA-plot gerados a partir dos dados das amostras de células da linhagem B16F1 e B16F10 tratadas com melfalano e comparados com a curva correspondente a 99% dos pontos das respectivas amostras-controle.

As Tabelas de 3 a 5 mostram os genes negativamente modulados por melfalano, TNF e melfalano+TNF respectivamente. As Tabelas de 6 a 8 contêm as listas dos genes positivamente regulados pelos mesmos tratamentos acima descritos.

As Tabelas 9 e 11 contêm as listas dos genes regulados negativamente nas linhagens B16F10 e B16F1 respectivamente; e as Tabelas 10 e 12 os genes modulados positivamente.

**Tabela 3** – Lista dos genes modulados negativamente por melfalano após tratamento *in vitro* das linhagens de melanoma B16F1 e B16F10.

<b>Genes modulados negativamente por melfalano</b>			
<b>B16F10</b>		<b>B16F1</b>	
<b>Gene symbol</b>	<b>fold</b>	<b>Gene symbol</b>	<b>fold</b>
Parp1	-3,44771	Parp1	-3,42734
Gsto2	-4,4374	Gsto2	-4,26766
Klh18	-3,50095	Klh18	-3,80785
AY026253	-3,54542	AY026253	-3,38405
Axin2	-2,7712	Axin2	-3,88835
Arfgef2	-6,17432	Arfgef2	-5,84678
BC021795	-4,10769	BC021795	-4,40227
2610036D13Rik	-4,74811	2610036D13Rik	-3,88485
Slc1a2	-2,01524	Slc22a21	-3,8215
AK009514	-2,71816	Wdr35	-3,7532
AJ400878	-2,46722	Tmem1	-3,44245
Twist2	-2,49061	Kifc3	-3,17881
AJ223794	-3,56455	NM_178781	-3,88001
4930534B04Rik	-3,1454	Rcor2	-4,04512
Gdf9	-3,36984	M23375	-2,66158
1810009A15Rik	-2,29362	Col7a1	-3,52346
Eno3	-2,37808	C79127	-3,72368
Krit1	-2,47083	Mki67	-3,58554
Foxn1	-2,72033	Pde6b	-3,61773
Rars	-2,64039	DXImx50e	-2,82953
Psmc3ip	-2,20369		
AC002397	-2,083		
AC123743	-1,94777		
Tor2a	-2,19783		
CT009509	-2,92543		
C630035N08Rik	-1,83377		
Ncapg	-2,87525		
Cnksr2	-2,67879		
Fabp5	-2,61707		
Abca3	-2,03015		
Ppp2r5e	-2,03419		
2210009G21Rik	-3,23572		
2610510H03Rik	-2,29334		

Apod	-2,88897		
M31702	-2,11851		
Hars2	-3,7278		
Psd3	-2,74835		
Ly75	-2,1234		
AJ245739	-2,48889		
Col5a1	-2,23451		
Fyb	-3,24069		
Gpt1	-2,20528		
Nup155	-2,85031		
Zfp206	-3,15482		
Slc12a2	-2,22262		
Gsta3	-2,23581		
Foxh1	-2,73309		
Rbm26	-2,06602		
Rhpn2	-4,05863		
Rrm1	-2,05723		
Zrsr2	-2,69979		
AF012710	-2,16422		
Treh	-2,16364		
Myo6	-3,57682		
Dusp11	-2,06208		
Nrf1	-2,45909		
Tuba3a	-3,89034		
Cox7b	-2,69353		
2810405K02Rik	-3,26689		
Cxcl2	-2,74996		
Sez6l	-2,92675		
Trim34	-3,06496		
Nedd4	-2,10638		
Cdca8	-3,21983		
Stt3b	-1,96796		
Pdgfra	-3,05026		

**Legenda:** Lista dos genes negativamente modulados pelo tratamento com melfalano *in vitro*, e seus respectivos “folds”, nas linhagens de melanoma B16F1 e B16F10. Os genes foram identificados pela superposição dos MA-plots gerados para a média dos valores de intensidade dos sinais para as amostras tratadas com melfalano sobre uma curva englobando 99% dos pontos gerados para os valores dos grupos-controle. Em vermelho estão destacados os genes encontrados em comum nas duas linhagens.

**Tabela 4** – Lista dos genes modulados negativamente por TNF após tratamento *in vitro* das linhagens de melanoma B16F1 e B16F10.

<b>Genes modulados negativamente por TNF</b>			
<b>B16F10</b>		<b>B16F1</b>	
<b>Gene symbol</b>	<b>fold</b>	<b>Gene symbol</b>	<b>fold</b>
Slc1a2	-1,90358	Tom112	-6,67042
Kif5a	-2,67766	Zfp287	-3,64696
Ap2b1	-3,85512	Atp5f1	-2,21662
AJ400878	-2,25991	XM_354869	-4,53482
Twist2	-2,18304	Akt1s1	-6,85622
U00938	-2,67207	L12588	-5,05775
Tisp78	-1,98502	Cbfa2t3h	-4,11497
AJ223794	-2,7516	Gt4-1	-3,68351
Tor2a	-1,85615	Hif3a	-5,27767
Mboat2	-3,25037	Zfp120	-4,63095
Atp5s	-3,05393	Ccne1	-3,71891
Tspan32	-4,07824	Krt23	-10,1682
Q8BVW7	-3,30637	Hps5	-3,4399
6430517E21Rik	-1,92579	Myo1g	-5,35397
Krit1	-1,96516	Rab8a	-6,93697
Cabin1	-3,72565	Sphk1	-9,01958
Drp2	-3,72757	Ikzf3	-3,64048
U04838	-1,94162	Tnfaip3	-4,85466
Ggt1	-4,3923	Axin2	-6,90816
Trpm2	-5,28097	Itgb2	-3,56325
Tnpo1	-5,09591	Gdap111	-5,0678
Tslp	-3,68767	X99598	-4,05762
4921504E06Rik	-5,01496	Mrps14	-3,65791
Smchd1	-5,35262	Strbp	-6,5487
Abca3	-1,87019	19-F23-M300003993	-3,96799
F3	-2,66308	Srp9	-3,39125
25-B03-M300005268	-3,39341	Ttll1	-4,02741
X52634	-3,40989	Ubt1	-4,98384
Atg3	-3,3189	Stom	-17,0063
Wdr451	-4,51642	Pus1	-4,32765
D730039F16Rik	-7,91205	Ociad2	-3,02575
Acsm2	-2,84058	Pde6b	-4,18198
Narg2	-2,77574	Trim11	-5,9554
Zdhhc5	-2,41294	Usp1	-3,48633
Nrf1	-2,89418	AF071176	-3,41018
Ces2	-2,23322	37-I18-M300007757	-5,49496
Mast4	-2,70063	Htra3	-4,26722
Cyp4a10	-2,74803	Anxa3	-2,88016
Mttp	-3,39519	4921507P07Rik	-2,02877
Plxnd1	-3,34435	Noc4l	-3,89906
Lrrc28	-6,97201	Ift74	-4,24067
4933427G17Rik	-2,34093	Ryr1	-4,31374
Zfp810	-3,91846	Tex9	-6,76069
Slc7a6os	-2,9648	Nt5m	-3,55637
Tmprss7	-3,02382	Sfxn5	-6,79134
40-O17-M300008354	-3,11145	Cib1	-3,68879

**Legenda:** Lista dos genes negativamente modulados pelo tratamento com TNF *in vitro*, e seus respectivos “folds”, nas linhagens de melanoma B16F1 e B16F10. Os genes foram identificados pela superposição dos MA-plots gerados para a média dos valores de intensidade dos sinais para as amostras tratadas com TNF sobre uma curva englobando 99% dos pontos gerados para os valores dos grupos-controle.

**Tabela 5** – Lista dos genes modulados negativamente por melfalano+TNF após tratamento *in vitro* das linhagens de melanoma B16F1 e B16F10.

<b>Genes modulados negativamente por melfalano e TNF</b>			
<b>B16F10</b>		<b>B16F1</b>	
<b>Gene symbol</b>	<b>fold</b>	<b>Gene symbol</b>	<b>fold</b>
Mcts2	-2,04879	2310003L06Rik	-5,16665
Ovgp1	-2,69835	Hps5	-4,36522
B930008K04Rik	-2,03198	NM_178781	-5,55597
Dnajc5	-5,19183	Mrm1	-5,65233
Dalrd3	-1,94476	Ddef1	-34,771
Btn1a1	-2,31647	Abca2	-4,99835
Esam1	-2,17864	Stat4	-4,09618
Rab34	-2,58962	Lancel2	-2,66097
Gabpa	-2,80088	NM_172279	-3,86187
Mboat2	-2,76322	Asb11	-7,23299
Oas1g	-2,55604	37-I18-M300007757	-4,55849
X78141	-2,75289	Ank2	-4,54238
Cpa3	-1,92892		
Rai12	-2,94606		
Zfp306	-2,69429		
Zfp184	-2,81516		
Rnase4	-2,94437		
Msln	-2,65403		
Atp10b	-3,41648		
Ifi27	-3,31974		
BC021795	-10,4286		
Wdr82	-2,70331		
Wrnip1	-2,72535		
Epdr2	-2,7144		
Cnksr2	-2,00024		
B4galt3	-4,43889		
Centg3	-1,96827		
Ect2	-2,54483		
Arfgap1	-3,14104		
Dcamk1l	-2,45746		
Nek4	-2,82873		
XM_147957	-3,25277		
Rcl1	-3,55249		
C1qtnf3	-4,29286		
Tbx20	-4,1929		
Zrsr2	-2,85683		
Treh	-2,29056		
Rpl22	-2,67742		
Nsun4	-3,32044		
Snpc5	-5,1564		
2310007H09Rik	-2,41158		
38-A01	-3,1782		
AU040320	-2,7321		
Prss29	-2,83023		

**Legenda:** Lista dos genes negativamente modulados pelo tratamento com melfalano+TNF *in vitro*, e seus respectivos “folds”, nas linhagens de melanoma B16F1 e B16F10. Os genes foram identificados pela superposição dos MA-plots gerados para a média dos valores de intensidade dos sinais para as amostras tratadas com melfalano+TNF sobre uma curva englobando 99% dos pontos gerados para os valores dos grupos-controle.

**Tabela 6** – Lista dos genes modulados positivamente por melfalano após tratamento *in vitro* das linhagens de melanoma B16F1 e B16F10.

<b>Genes modulados positivamente por melfalano</b>			
<b>B16F10</b>		<b>B16F1</b>	
<b>Gene symbol</b>	<b>fold</b>	<b>Gene symbol</b>	<b>fold</b>
Mc5r	3,053755	Mc5r	3,583065
Dnajb9	3,155115	Dnajb9	3,275348
7-E14-M300001291	4,240395	7-E14-M300001291	3,600374
NM_177617	12,33619	NM_177617	10,95623
Pes1	3,24651	Pes1	3,837938
Tslp	3,323841	Tslp	6,290263
Prdx3	3,159394	Prdx3	4,185751
Bsnd	6,487304	Bsnd	6,363621
Pttg1	2,673464	Ccdc91	4,917384
L29346	3,296313	Zfp306	3,127915
AF324883	3,396054	Cdgap	3,724824
M61094	2,864551		
Impdh2	2,449346		
Ccl9	3,236733		
6-M24-M300001096	7,230853		
Cad	2,407775		
Prlpa	3,089185		
1110014J01Rik	6,937581		
Grb10	2,553908		
Allc	2,427637		
Nln	2,551077		
Cbx1	2,528321		
12-A18-M300002330	2,498072		
Il7r	2,6472		
10-J22-M300001981	3,3042		
Homer1	3,175279		
5-A01	2,897653		
Ndrp1	2,943956		
Cacna1d	2,521349		
4933437F05Rik	2,271187		
Gpx5	2,557623		
Dpys	3,910291		
Tuba4	2,476317		
Pa2g4	1,957963		
Fabp9	2,091104		
17-B03-M200012180	3,102376		
Pam	2,741361		
Ankrd22	2,913057		
1190003J15Rik	3,311091		
Pias3	2,577566		
Fzd6	2,621278		
Man2a1	1,875166		
U41741	3,03151		
Tcerg1	2,077268		
Asb1	2,694227		
Elp4	2,596127		
Gart	3,043215		
1700042B14Rik	2,480719		
23-L17-M300004885	1,935716		
Herc5	2,654244		
Tead4	2,738913		

32-C16-M300006650	2,893651		
1700012A03Rik	2,574075		
X79283	3,157787		
Rspo4	4,258709		
S71213	3,030267		
30-J06-M300006285	3,383596		
MusV3con_1-C22-M2NC000010	2,568449		
29-P22-M300006083	1,938671		
Prb1	5,961868		
Nktr	1,952486		
Aff1	2,690939		
MusV3con_1-D21-M2NC000010	2,533805		

**Legenda:** Lista dos genes positivamente modulados pelo tratamento com melfalano *in vitro*, e seus respectivos “folds”, nas linhagens de melanoma B16F1 e B16F10. Os genes foram identificados pela superposição dos MA-plots gerados para a média dos valores de intensidade dos sinais para as amostras tratadas com melfalano sobre uma curva englobando 99% dos pontos gerados para os valores dos grupos-controle. Em vermelho, estão destacados os genes comuns às duas linhagens.

**Tabela 7** – Lista dos genes modulados positivamente por TNF após tratamento *in vitro* das linhagens de melanoma B16F1 e B16F10.

<b>Genes modulados positivamente por TNF</b>			
<b>B16F10</b>		<b>B16F1</b>	
<b>Gene symbol</b>	<b>fold</b>	<b>Gene symbol</b>	<b>fold</b>
Igh-VJ558	3,027515	AF333027	3,749281
Ocln	2,663828	Zbtb43	3,50624
Ict1	4,53796	Prkrir	3,613045
AF380187	3,099721	p	5,606656
Lect2	2,972752	Ccdc91	4,581093
Prlpa	2,839631	Tas1r2	3,569927
1110014J01Rik	6,36895	Ap4b1	3,696439
11-G07-M300002077	3,090158		
12-A18-M300002330	2,659755		
Pard6a	2,629662		
6-B01	2,535019		
2410075D05Rik	2,782452		
Dpys	3,393276		
Phex	2,628793		
Slc7a4	2,489662		
Padi4	3,53885		
Sec22b	2,469782		
Camk2a	2,972643		
Lrba	3,065248		
BC003940	2,397292		
Polr3h	2,45706		
X75895	1,948637		
1190003J15Rik	3,122319		
Fcamr	2,251296		
Spata3	2,127065		
27-G14-M300005626	2,984802		
Tcerg1	2,312321		
Scyl1	2,697511		
Tb11xr1	2,551373		



Gatm	3,317302		
Gfpt1	2,559068		
2310046A06Rik	2,465674		
Pwp2h	5,333531		
Bst1	2,636321		
X79283	3,120558		
40-L24-M200011264	2,854878		
Zfp105	3,188785		
1700001C02Rik	3,60817		
Bud13	3,611907		
41-J19-M300008833	2,427404		
Figf	2,783883		
BC021891	2,394538		
30-J06-M300006285	3,54363		
MusV3con_1-C22- M2NC000010	4,55222		
Sytl4	2,001545		
AF146793	2,729682		
Ptpn5	5,139682		
41-F21-M300008815	4,626338		
42-N21-M300009156	3,402351		
MusV3con_1-D21- M2NC000010	2,491191		

**Legenda:** Lista dos genes positivamente modulados pelo tratamento com TNF *in vitro*, e seus respectivos “folds”, nas linhagens de melanoma B16F1 e B16F10. Os genes foram identificados pela superposição dos MA-plots gerados para a média dos valores de intensidade dos sinais para as amostras tratadas com TNF sobre uma curva englobando 99% dos pontos gerados para os valores dos grupos-controle.

**Tabela 8** – Lista dos genes modulados positivamente por melfalano+TNF após tratamento *in vitro* das linhagens de melanoma B16F1 e B16F10.

<b>Genes modulados positivamente por melfalano e TNF</b>			
<b>B16F10</b>		<b>B16F1</b>	
<b>Gene symbol</b>	<b>fold</b>	<b>Gene symbol</b>	<b>fold</b>
AF093624	2,715561	Gabrg2	5,794155
Bbc3	2,140309	AF020710	2,667266
S100a5	2,722738	Cox5a	3,573402
Prtpa	3,406863	Ptpn6	3,528609
1110014J01Rik	5,106032	2310021H06Rik	2,724762
Gpx5	2,496331	Rpl35	3,110217
Trdn	2,181292	Srgap2	6,212175
Ptpn20	2,53313	Wnt1	4,704124
Rcor2	2,177702	Fth1	2,781662
Ssb	2,544263	Eif3s8	4,851623
Tollip	2,768076	Fip111	3,142968
Mtfr1	2,591313	Ccdc91	4,283863
Slc35f4	2,512914	Fbxo22	7,919013
Ankrd22	2,538633	Car12	4,387403
Coq10b	4,456449		
Abcc5	2,874453		
Gatm	3,701982		
X79283	2,903933		
Figf	3,578262		
Lypd5	2,827775		
Bai3	5,225359		
MusV3con_1-C22-M2NC000010	2,700547		
Prb1	9,288241		
Nktr	2,140179		
Lmod2	2,525035		

**Legenda:** Lista dos genes positivamente modulados pelo tratamento com melfalano+TNF *in vitro*, e seus respectivos “folds”, nas linhagens de melanoma B16F1 e B16F10. Os genes foram identificados pela superposição dos MA-plots gerados para a média dos valores de intensidade dos sinais para as amostras tratadas com melfalano+TNF sobre uma curva englobando 99% dos pontos gerados para os valores dos grupos-controle.

**Tabela 9** – Lista dos genes modulados negativamente na linhagem B16F10 após tratamento *in vitro*.

<b>Genes modulados negativamente na linhagem B16F10</b>					
<b>Melfalano</b>		<b>TNF</b>		<b>Melfalano + TNF</b>	
<b>Gene symbol</b>	<b>fold</b>	<b>Gene symbol</b>	<b>fold</b>	<b>Gene symbol</b>	<b>fold</b>
Slc1a2	-2,01524	Slc1a2	-1,90358	Mcts2	-2,04879
Twist2	-2,49061	Twist2	-2,18304	Dnajc5	-5,19183
Tor2a	-2,19783	Tor2a	-1,85615	Btn1a1	-2,31647
Gdf9	-3,36984	Mboat2	-3,25037	Mboat2	-2,76322
Krit1	-2,47083	Krit1	-1,96516	Cpa3	-1,92892
Cnksr2	-2,67879	4921504E06Rik	-5,01496	Cnksr2	-2,00024
Abca3	-2,03015	Abca3	-1,87019	Wrnip1	-2,72535
Nrf1	-2,45909	Nrf1	-2,89418	Tbx20	-4,1929
Treh	-2,16364	Mast4	-2,70063	Treh	-2,29056
Foxn1	-2,72033	6430517E21Rik	-1,92579	Rai12	-2,94606
AK009514	-2,71816	Kif5a	-2,67766	Ovgp1	-2,69835
AJ223794	-3,56455	AJ400878	-2,25991	Dalrd3	-1,94476
AJ400878	-2,46722	Ap2b1	-3,85512	B930008K04Rik	-2,03198
4930534B04Rik	-3,1454	Tisp78	-1,98502	Esam1	-2,17864
AC002397	-2,083	U00938	-2,67207	Gabpa	-2,80088
Ppp2r5e	-2,03419	AJ223794	-2,7516	Rab34	-2,58962
1810009A15Rik	-2,29362	Atp5s	-3,05393	Oas1g	-2,55604
Eno3	-2,37808	Tspan32	-4,07824	X78141	-2,75289
Rars	-2,64039	Q8BVW7	-3,30637	Zfp306	-2,69429
Psmc3ip	-2,20369	Cabin1	-3,72565	Zfp184	-2,81516
BC021795	-4,10769	Drp2	-3,72757	Rnase4	-2,94437
14-J09- M300002910	-2,92543	U04838	-1,94162	Msln	-2,65403
Axin2	-2,7712	Ggt1	-4,3923	11-D22- M300002179	-3,41648
4-G21- M300000608	-1,94777	Trpm2	-5,28097	Ifi27	-3,31974
C630035N08Rik	-1,83377	Tnpol	-5,09591	BC021795	-10,4286
Ncapg	-2,87525	Tslp	-3,68767	Wdr82	-2,70331
27-N08- M300005690	-2,61707	Smchd1	-5,35262	Epdr2	-2,7144
Parp1	-3,44771	F3	-2,66308	B4galt3	-4,43889
2210009G21Rik	-3,23572	25-B03- M300005268	-3,39341	Centg3	-1,96827
2610510H03Rik	-2,29334	X52634	-3,40989	Ect2	-2,54483
Apod	-2,88897	Atg3	-3,3189	Arfgap1	-3,14104
M31702	-2,11851	Wdr45l	-4,51642	Dcamk1l	-2,45746
Hars2	-3,7278	D730039F16Rik	-7,91205	Nek4	-2,82873
Psd3	-2,74835	Acsm2	-2,84058	16-F14- M300003260	-3,25277
Ly75	-2,1234	Narg2	-2,77574	Rcl1	-3,55249
AJ245739	-2,48889	Zdhhc5	-2,41294	C1qtnf3	-4,29286
Col5a1	-2,23451	Ces2	-2,23322	Zrsr2	-2,85683
Gpt1	-2,20528	Cyp4a10	-2,74803	Rpl22	-2,67742
28-C05- M300005755	-6,17432	Mtp	-3,39519	Nsun4	-3,32044
Nup155	-2,85031	Plxnd1	-3,34435	Snape5	-5,1564
18-P21- M300003804	-3,15482	Lrrc28	-6,97201	2310007H09Rik	-2,41158
Slc12a2	-2,22262	4933427G17Rik	-2,34093	38-A01	-3,1782

Gsta3	-2,23581	Zfp810	-3,91846	AU040320	-2,7321
2610036D13Rik	-4,74811	Slc7a6os	-2,9648	Prss29	-2,83023
Foxh1	-2,73309	Tmprss7	-3,02382		
Rbm26	-2,06602	40-O17- M300008354	-3,11145		
Rhpn2	-4,05863				
Rrm1	-2,05723				
Zrsr2	-2,69979				
Fyb	-3,24069				
Gsto2	-4,4374				
AF012710	-2,16422				
Klhl8	-3,50095				
AY026253	-3,54542				
Myo6	-3,57682				
Dusp11	-2,06208				
34-F18- M300007151	-3,89034				
Cox7b	-2,69353				
2810405K02Rik	-3,26689				
Cxcl2	-2,74996				
Sez6l	-2,92675				
Trim34	-3,06496				
Nedd4	-2,10638				
Cdca8	-3,21983				
Stt3b	-1,96796				
Pdgfra	-3,05026				

**Legenda:** Lista dos genes negativamente modulados na linhagem B16F10 após tratamento *in vitro*, e seus respectivos “folds”. Os genes foram identificados pela superposição dos MA-plots gerados para a média dos valores de intensidade dos sinais para as amostras tratadas sobre uma curva englobando 99% dos pontos gerados para os valores dos grupos-controle. Em laranja estão destacados os genes em comum nos grupos tratados com TNF e melfalano. Em vermelho, estão os genes comuns aos grupos tratados com melfalano (melfalano e melfalano+TNF), e em verde, os genes comuns aos grupos que receberam TNF (TNF e melfalano+TNF).

**Tabela 10** – Lista dos genes modulados positivamente na linhagem B16F10 após tratamento *in vitro*.

<b>Genes modulados positivamente na linhagem B16F10</b>					
<b>Melfalano</b>		<b>TNF</b>		<b>Melfalano + TNF</b>	
<b>Gene symbol</b>	<b>fold</b>	<b>Gene symbol</b>	<b>fold</b>	<b>Gene symbol</b>	<b>fold</b>
Prlpa	3,089185	Prlpa	2,839631	Prlpa	3,406863
Gpx5	2,557623	AF380187	3,099721	Gpx5	2,496331
Ankrd22	2,913057	Phex	2,628793	Ankrd22	2,538633
Prb1	5,961868	1190003J15Rik	3,122319	Prb1	9,288241
Nktr	1,952486	Fcamr	2,251296	Nktr	2,140179
Cbx1	2,528321	Figf	2,783883	Figf	3,578262
MusV3con_1-C22-M2NC000010	2,568449	MusV3con_1-C22-M2NC000010	4,55222	MusV3con_1-C22-M2NC000010	2,700547
MusV3con_1-D21-M2NC000010	2,533805	MusV3con_1-D21-M2NC000010	2,491191		
Impdh2	2,449346	Igh-VJ558	3,027515	AF093624	2,715561
AC124532	7,230853	Ocln	2,663828	Bbc3	2,140309
M61094	2,864551	Ict1	4,53796	S100a5	2,722738
Ndrgr1	2,943956	Lect2	2,972752	1110014J01Rik	5,106032
Homer1	3,175279	1110014J01Rik	6,36895	Trdn	2,181292
AF324883	3,396054	11-G07-M300002077	3,090158	Ptpn20	2,53313
Dnajb9	3,155115	12-A18-M300002330	2,659755	Rcor2	2,177702
Ccl9	3,236733	Pard6a	2,629662	Ssb	2,544263
Pttg1	2,673464	6-B01	2,535019	Tollip	2,768076
Cad	2,407775	2410075D05Rik	2,782452	Mtfr1	2,591313
1110014J01Rik	6,937581	Dpys	3,393276	Slc35f4	2,512914
Grb10	2,553908	Slc7a4	2,489662	Coq10b	4,456449
Allc	2,427637	Padi4	3,53885	Abcc5	2,874453
Nln	2,551077	Sec22b	2,469782	Gatm	3,701982
7-E14-M300001291	4,240395	Camk2a	2,972643	X79283	2,903933
12-A18-M300002330	2,498072	BC003940	2,397292	Lypd5	2,827775
Il7r	2,6472	Polr3h	2,45706	Bai3	5,225359
10-J22-M300001981	3,3042	X75895	1,948637		
5-A01	2,897653	Spata3	2,127065	Lmod2	2,525035
Cacna1d	2,521349	27-G14-M300005626	2,984802		
4933437F05Rik	2,271187	Tcerg1	2,312321		
Mc5r	3,053755	Scyl1	2,697511		
Dpys	3,910291	Tbl1xr1	2,551373		
Tslp	3,323841	Gatm	3,317302		
Tuba4	2,476317	Gfpt1	2,559068		
Pa2g4	1,957963	2310046A06Rik	2,465674		
Fabp9	2,091104	Pwp2h	5,333531		
17-B03-M200012180	3,102376	Bst1	2,636321		
Prdx3	3,159394	X79283	3,120558		
Pam	2,741361	40-L24-M200011264	2,854878		
1190003J15Rik	3,311091	1700001C02Rik	3,60817		

Pias3	2,577566	Bud13	3,611907		
		41-J19-			
Fzd6	2,621278	M300008833	2,427404		
Man2a1	1,875166	Lrba	3,065248		
U41741	3,03151	BC021891	2,394538		
		30-J06-			
Tcerg1	2,077268	M300006285	3,54363		
Elp4	2,596127	Sytl4	2,001545		
Gart	3,043215	AF146793	2,729682		
1700042B14Rik	2,480719	Ptpn5	5,139682		
		41-F21-			
Bsnd	6,487304	M300008815	4,626338		
23-L17-		42-N21-			
M300004885	1,935716	M300009156	3,402351		
Asb1	2,694227	Zfp105	3,188785		
Tead4	2,738913				
Herc5	2,654244				
L29346	3,296313				
32-C16-					
M300006650	2,893651				
1700012*03Rik	2,574075				
X79283	3,157787				
Rspo4	4,258709				
S71213	3,030267				
30-J06-					
M300006285	3,383596				
29-P22-					
M300006083	1,938671				
NM_177617	12,33619				
Pes1	3,24651				
Affl	2,690939				

**Legenda:** Lista dos genes positivamente modulados na linhagem B16F10 após tratamento *in vitro*, e seus respectivos “folds”. Os genes foram identificados pela superposição dos MA-plots gerados para a média dos valores de intensidade dos sinais para as amostras tratadas sobre uma curva englobando 99% dos pontos gerados para os valores dos grupos-controle. Em laranja estão destacados os genes em comum nos grupos tratados com TNF e melfalano. Em vermelho, estão os genes comuns aos grupos tratados com melfalano (melfalano e melfalano+TNF), e em verde, os genes comuns aos grupos que receberam TNF (TNF e melfalano+TNF).

**Tabela 11** – Lista dos genes modulados negativamente na linhagem B16F1 após tratamento *in vitro*.

Genes modulados negativamente na linhagem B16F1					
Melfalano		TNF		Melfalano + TNF	
Gene symbol	fold	Gene symbol	fold	Gene symbol	fold
Wdr35	-3,7532	Hps5	-3,4399	Hps5	-4,36522
Axin2	-3,88835	Axin2	-6,90816	Abca2	-4,99835
Pde6b	-3,61773	Pde6b	-4,18198		
Slc22a21	-3,8215	Tom1l2	-6,67042	2310003L06Rik	-5,16665
NM_178781	-3,88001	Akt1s1	-6,85622	Ddef1	-34,771
Rcor2	-4,04512	Cbfa2t3h	-4,11497	Stat4	-4,09618
Tmem1	-3,44245	Atp5f1	-2,21662	NM_178781	-5,55597
BC021795	-4,40227	4-D04-M300000684	-4,53482	Mrm1	-5,65233
Parp1	-3,42734	Gt4-1	-3,68351	Lanc12	-2,66097
Col7a1	-3,52346	Hif3a	-5,27767	NM_172279	-3,86187
Gsto2	-4,26766	Zfp120	-4,63095	Asb11	-7,23299
28-C05-M300005755	-5,84678	Ccne1	-3,71891	37-I18-M300007757	-4,55849
2610036D13Rik	-3,88485	Krt23	-10,1682	Ank2	-4,54238
Mki67	-3,58554	Zfp287	-3,64696		
Klhl8	-3,80785	Rab8a	-6,93697		
AY026253	-3,38405	Sphk1	-9,01958		
Kifc3	-3,17881	Ikzf3	-3,64048		
DXImx50e	-2,82953	Tnfaip3	-4,85466		
C79127	-3,72368	L12588	-5,05775		
M23375	-2,66158	Itgb2	-3,56325		
		Gdap111	-5,0678		
		X99598	-4,05762		
		Mrps14	-3,65791		
		Strbp	-6,5487		
		19-F23-M300003993	-3,96799		
		Srp9	-3,39125		
		Till1	-4,02741		
		Ubt1	-4,98384		
		Stom	-17,0063		
		Pus1	-4,32765		
		Myo1g	-5,35397		
		Ociad2	-3,02575		
		Trim11	-5,9554		
		Usp1	-3,48633		
		AF071176	-3,41018		
		37-I18-M300007757	-5,49496		
		Htra3	-4,26722		
		Anxa3	-2,88016		
		4921507P07Rik	-2,02877		
		Noc4l	-3,89906		
		Ift74	-4,24067		
		Ryr1	-4,31374		
		Tex9	-6,76069		
		Nt5m	-3,55637		
		Sfxn5	-6,79134		
		Cib1	-3,68879		

**Legenda:** Lista dos genes negativamente modulados na linhagem B16F1 após tratamento *in vitro*, e seus respectivos “folds”. Os genes foram identificados pela superposição dos MA-plots gerados para a média dos valores de intensidade dos sinais para as amostras tratadas sobre uma curva englobando 99% dos pontos gerados para os valores dos grupos-controle. Em laranja estão destacados os genes em comum nos grupos tratados com TNF e melfalano. Em vermelho, estão os genes comuns aos grupos tratados com melfalano (melfalano e melfalano+TNF), e em verde, os genes comuns aos grupos que receberam TNF (TNF e melfalano+TNF).

**Tabela 12** – Lista dos genes modulados positivamente na linhagem B16F1 após tratamento *in vitro*.

<b>Genes modulados positivamente na linhagem B16F1</b>					
<b>Melfalano</b>		<b>TNF</b>		<b>Melfalano + TNF</b>	
<b>Gene symbol</b>	<b>fold</b>	<b>Gene symbol</b>	<b>fold</b>	<b>Gene symbol</b>	<b>fold</b>
Ccdc91	4,917384	Ccdc91	4,581093	Ccdc91	4,283863
Mc5r	3,583065	AF333027	3,749281	Gabrg2	5,794155
Dnajb9	3,275348	Zbtb43	3,50624	AF020710	2,667266
7-E14-M300001291	3,600374	Prkrir	3,613045	Cox5a	3,573402
Dnahc2	10,95623	p	5,606656	Ptpn6	3,528609
Zfp306	3,127915	Tas1r2	3,569927	Rpl35	3,110217
Tslp	6,290263	Ap4b1	3,696439	Srgap2	6,212175
Cdgap	3,724824			Wnt1	4,704124
Prdx3	4,185751			Fth1	2,781662
Bsnd	6,363621			Eif3s8	4,851623
Pes1	3,837938			Fip111	3,142968
				2310021H06Rik	2,724762
				Fbxo22	7,919013
				Car12	4,387403

**Legenda:** Lista dos genes positivamente modulados na linhagem B16F1 após tratamento *in vitro*, e seus respectivos “folds”. Os genes foram identificados pela superposição dos MA-plots gerados para a média dos valores de intensidade dos sinais para as amostras tratadas sobre uma curva englobando 99% dos pontos gerados para os valores dos grupos-controle. Em laranja estão destacados os genes em comum nos grupos tratados com TNF e melfalano. Em vermelho, estão os genes comuns aos grupos tratados com melfalano (melfalano e melfalano+TNF), e em verde, os genes comuns aos grupos que receberam TNF (TNF e melfalano+TNF).



## 5.10 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS TUMORES APÓS TRATAMENTO *IN VIVO*

Durante as análises das lâminas foram desconsiderados os valores dos sinais referentes aos “spots” das três primeiras fileiras da primeira coluna de “subarrays” de cada lâmina (684 “spots”), uma vez que, em cerca de metade das lâminas, existia um artefato de hibridização gerado pela borracha de vedação da câmara de hibridização que comprometia a qualidade das hibridizações nestes “spots”.

Foram identificados, por ANOVA, 596 elementos cujas diferenças entre a razão de expressão entre os tratamentos eram estatisticamente significativas. Devido à redundância dos oligonucleotídeos imobilizados na plataforma utilizada, os 596 identificados correspondiam, na verdade a 118 genes (Tabela 13). Após a eliminação da redundância, foi feita uma comparação par a par entre os grupos de tratamento empregando o teste de Tukey. Na tabela 14 é mostrada a lista dos 118 genes com os respectivos p valores encontrados para cada comparação (M = melfalano, C= controle, T=TNF e MT= melfalano + TNF).

**Tabela 13** – Lista dos “Gene symbol” e descrição dos 118 genes diferencialmente expressos.

<b>Gene Symbol</b>	<b>Descrição do gene</b>
<b>Rnf130</b>	ring finger protein 130
<b>Pecam1</b>	platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
<b>Bax</b>	Bcl2-associated X protein
<b>Mrpl49</b>	mitochondrial ribosomal protein L49
<b>Mrpl38</b>	mitochondrial ribosomal protein L38
<b>Col20a1</b>	collagen, type XX, alpha 1
<b>Hbs1l</b>	Hbs1-like (S. cerevisiae)
<b>Nle1</b>	notchless homolog 1 (Drosophila)
<b>Rnf135</b>	ring finger protein 135
<b>Mettl6</b>	methyltransferase like 6
<b>Serpinf1</b>	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade F, member 1
<b>Oprm1</b>	opioid receptor, mu 1
<b>Btf3</b>	basic transcription factor 3
<b>Tcfe3</b>	transcription factor E3
<b>Hyi</b>	hydroxypyruvate isomerase homolog (E. coli)
<b>ORF61</b>	open reading frame 61
<b>Grb10</b>	growth factor receptor bound protein 10
<b>Col4a3bp</b>	procollagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen) binding protein
<b>Pdia6</b>	protein disulfide isomerase associated 6
<b>Zfp622</b>	zinc finger protein 622
<b>Cdc37l1</b>	cell division cycle 37 homolog (S. cerevisiae)-like 1
<b>Hgs</b>	HGF-regulated tyrosine kinase substrate
<b>4930544G21Rik</b>	RIKEN cDNA 4930544G21 gene
<b>Kifap3</b>	kinesin-associated protein 3
<b>Angel2</b>	angel homolog 2 (Drosophila)
<b>Neb</b>	nebulin
<b>Rrbp1</b>	ribosome binding protein 1
<b>Napb</b>	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein beta
<b>Ppil2</b>	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 2
<b>Ltbp3</b>	latent transforming growth factor beta binding protein 3
<b>Pard3</b>	par-3 (partitioning defective 3) homolog (C. elegans)
<b>1110007L15Rik</b>	RIKEN cDNA 1110007L15 gene
<b>E2f1</b>	E2F transcription factor 1
<b>Ddx20</b>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 20
<b>Extl2</b>	exotoses (multiple)-like 2
<b>Polr1e</b>	polymerase (RNA) I polypeptide E
<b>Kpna3</b>	karyopherin (importin) alpha 3
<b>Atp6v1c1</b>	\ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit C1
<b>Pou2f1</b>	POU domain, class 2, transcription factor 1
<b>Bcl2l11</b>	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
<b>Ptprj</b>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, J
<b>Fabp4</b>	fatty acid binding protein 4, adipocyte
<b>Camk2d</b>	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta
<b>Dlg5</b>	discs, large homolog 5 (Drosophila)
<b>Glul</b>	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase)
<b>Btbd3</b>	BTB (POZ) domain containing 3
<b>Masp1</b>	mannan-binding lectin serine peptidase 1
<b>Sigirr</b>	single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain
<b>2310038H17Rik</b>	RIKEN cDNA 2310038H17 gene
<b>Dgat1</b>	diacylglycerol O-acyltransferase 1
<b>Cyb5r1</b>	cytochrome b5 reductase 1
<b>Srp9</b>	signal recognition particle 9
<b>Ifi202b</b>	interferon activated gene 202B

<b>Crls1</b>	cardiolipin synthase 1
<b>Txndc11</b>	thioredoxin domain containing 11
<b>Myef2</b>	myelin basic protein expression factor 2, repressor
<b>Atpbd4</b>	ATP binding domain 4
<b>Efna3</b>	ephrin A3
<b>Ubap1</b>	ubiquitin-associated protein 1
<b>Akr1b7</b>	aldo-keto reductase family 1, member B7
<b>Zc3hav1</b>	zinc finger CCCH type, antiviral 1
<b>Usp9x</b>	ubiquitin specific peptidase 9, X chromosome
<b>Cklf</b>	chemokine-like factor
<b>Loxl1</b>	lysyl oxidase-like 1
<b>Tia1</b>	cytotoxic granule-associated RNA binding protein 1
<b>Rbpms</b>	RNA binding protein gene with multiple splicing
<b>Palld</b>	palladin, cytoskeletal associated protein
<b>Cyb5r4</b>	cytochrome b5 reductase 4
<b>Mphosph10</b>	M-phase phosphoprotein 10 (U3 small nucleolar ribonucleoprotein)
<b>1810030N24Rik</b>	RIKEN cDNA 1810030N24 gene
<b>Lepre1</b>	leprecan 1
<b>Trp73</b>	transformation related protein 73
<b>Mib2</b>	mindbomb homolog 2 (Drosophila)
<b>Tmem176b</b>	transmembrane protein 176B
<b>Igf2bp3</b>	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3
<b>Trim24</b>	tripartite motif protein 24
<b>Arhgef6</b>	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6
<b>Mad11l</b>	mitotic arrest deficient 1-like 1
<b>Ift122</b>	intraflagellar transport 122 homolog (Chlamydomonas)
<b>Egln1</b>	EGL nine homolog 1 (C. elegans)
<b>Abhd12</b>	abhydrolase domain containing 12
<b>Aph1c</b>	anterior pharynx defective 1c homolog (C. elegans)
<b>Kif1b</b>	kinesin family member 1B
<b>Slc25a33</b>	solute carrier family 25, member 33
<b>Flt1</b>	FMS-like tyrosine kinase 1
<b>Pcolce</b>	procollagen C-endopeptidase enhancer protein
<b>Trpm1</b>	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1
<b>Ankrd25</b>	ankyrin repeat domain 25
<b>Mgll</b>	monoglyceride lipase
<b>Itpr1</b>	inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1
<b>BC017158</b>	cDNA sequence BC017158
<b>Tacc2</b>	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2
<b>Rps6ka3</b>	ribosomal protein S6 kinase polypeptide 3
<b>Mtm1</b>	X-linked myotubular myopathy gene 1
<b>Rdx</b>	radixin
<b>Igsf4a</b>	immunoglobulin superfamily, member 4A
<b>BC033915</b>	cDNA sequence BC033915
<b>Pccb</b>	propionyl Coenzyme A carboxylase, beta polypeptide
<b>Cpsf1</b>	cleavage and polyadenylation specific factor 1
<b>Orc1l</b>	origin recognition complex, subunit 1-like (S.cereviaiae)
<b>Ube4b</b>	ubiquitination factor E4B, UFD2 homolog (S. cerevisiae)
<b>Cdc7</b>	cell division cycle 7 (S. cerevisiae)
<b>Aff1</b>	AF4/FMR2 family, member 1
<b>1500003O22Rik</b>	RIKEN cDNA 1500003O22 gene
<b>Ilk</b>	integrin linked kinase
<b>Trim30</b>	tripartite motif protein 30
<b>Art5</b>	ADP-ribosyltransferase 5
<b>Trpc2</b>	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 2
<b>Irak1bp1</b>	interleukin-1 receptor-associated kinase 1 binding protein 1
<b>Acbd6</b>	acyl-Coenzyme A binding domain containing 6
<b>Sdsl</b>	serine dehydratase-like

<b>Pms2</b>	postmeiotic segregation increased 2 ( <i>S. cerevisiae</i> )
<b>Wbp1</b>	WW domain binding protein 1
<b>Slc41a3</b>	solute carrier family 41, member 3
<b>Col4a6</b>	procollagen, type IV, alpha 6
<b>Cck</b>	cholecystokinin
<b>Fbxw8</b>	F-box and WD-40 domain protein 8
<b>Rpl37a</b>	ribosomal protein L37a

**Legenda:** Relação dos 118 genes diferencialmente expressos na análise das amostras tratadas *in vivo* com seus respectivos “Gene symbol” e descrição.

Na Tabela 15 é mostrada a lista dos 118 genes com as respectivas razões de intensidade encontradas para cada comparação (M = melfalano, C = controle, T = TNF e MT = melfalano + TNF).

**Tabela 14** - Lista dos 118 genes com os respectivos p valores encontrados para cada comparação (M = melfalano, C= controle, T=TNF e MT= melfalano + TNF) após a realização do teste de Tukey.

GeneSymbol	M x C	T x C	MT x C	T x M	MT x M	MT x T
Rnf130	0,927	0,314	0,019	0,679	0,084	0,501
Pecam1	0,972	0,070	0,037	0,061	0,036	0,998
Bax	0,403	0,368	0,080	0,033	0,005	0,849
Mrpl49	0,010	0,027	0,193	0,959	0,331	0,612
Mrpl38	0,319	0,884	0,483	0,125	0,031	0,913
Col20a1	0,577	1,000	0,101	0,647	0,018	0,114
Hbs11	0,158	0,144	0,349	0,003	0,008	0,903
Nle1	0,098	0,960	0,379	0,054	0,005	0,710
Rnf135	0,584	0,169	0,027	0,820	0,334	0,835
Mettl6	0,930	0,135	0,058	0,382	0,212	0,988
Serpinf1	1,000	0,306	0,050	0,345	0,067	0,794
Oprm1	0,043	0,995	0,770	0,078	0,178	0,907
Btf3	0,994	1,000	0,066	0,997	0,055	0,081
Tcfe3	0,935	0,508	0,035	0,271	0,016	0,459
Hyi	0,168	0,704	0,834	0,713	0,042	0,281
ORF61	0,003	0,847	0,926	0,022	0,010	0,995
Grb10	0,892	0,169	0,153	0,066	0,060	1,000
Col4a3bp	1,000	0,089	0,002	0,101	0,003	0,357
Pdia6	0,045	0,917	1,000	0,170	0,048	0,930
Zfp622	1,000	0,193	0,006	0,247	0,010	0,365
Cdc3711	0,023	0,008	0,006	0,953	0,968	1,000
Hgs	0,051	0,099	0,742	0,985	0,008	0,017
4930544G21Rik	0,711	0,790	0,025	0,999	0,229	0,183
Kifap3	0,460	0,535	0,030	0,999	0,469	0,398
Angel2	0,271	0,317	0,015	1,000	0,503	0,443
Neb	0,760	0,100	0,003	0,487	0,031	0,394
Rrbp1	0,518	0,962	0,061	0,319	0,614	0,033
Napb	0,828	0,105	0,018	0,433	0,124	0,873
Ppil2	0,121	1,000	0,906	0,138	0,039	0,935
Ltbp3	0,007	0,984	0,996	0,005	0,010	0,940
Pard3	0,009	0,923	0,939	0,039	0,024	1,000
1110007L15Rik	0,167	0,919	0,234	0,072	0,005	0,607
E2f1	0,389	0,078	0,026	0,768	0,503	0,977
Ddx20	0,377	0,021	0,840	0,406	0,814	0,090
Extl2	0,036	0,102	0,997	0,001	0,051	0,073
Polr1e	0,985	0,025	0,006	0,019	0,005	0,944
Atp6v1c1	0,586	0,372	0,016	0,982	0,220	0,383
Pou2f1	0,997	0,112	0,036	0,188	0,071	0,967
Bcl2l11	0,544	0,691	0,064	0,136	0,007	0,462
Ptprj	0,090	0,019	0,205	0,000	0,002	0,487
Fabp4	0,330	0,700	0,277	0,093	0,020	0,922
Camk2d	0,968	0,163	0,003	0,095	0,002	0,256
Dlg5	0,000	0,170	0,958	0,027	0,000	0,076
Glul	0,164	0,011	0,001	0,517	0,080	0,654
Btbd3	0,693	0,477	0,030	0,113	0,005	0,447
Masp1	0,417	0,801	0,434	0,130	0,038	0,943

Sigirr	0,803	0,330	0,060	0,122	0,023	0,803
2310038H17Rik	0,477	0,140	0,017	0,851	0,307	0,769
Dgat1	0,998	0,928	0,050	0,976	0,093	0,192
Cyb5r1	0,635	0,658	0,277	0,159	0,043	0,925
Srp9	0,908	0,840	0,072	0,509	0,028	0,351
Ifi202b	0,919	0,359	0,024	0,745	0,107	0,511
Crls1	0,000	0,913	0,983	0,002	0,000	0,757
Txndc11	0,971	0,914	0,108	0,735	0,272	0,043
Myef2	0,823	0,400	0,157	0,133	0,043	0,957
Atpbd4	0,753	0,080	0,004	0,430	0,045	0,567
Efna3	0,046	0,493	0,036	0,504	1,000	0,483
Ubap1	0,929	0,183	0,001	0,477	0,004	0,068
Akr1b7	0,087	0,637	0,123	0,014	0,001	0,717
Zc3hav1	0,275	0,561	0,036	0,038	0,001	0,423
Usp9x	0,116	0,707	0,827	0,023	0,027	0,993
Cklf	0,866	0,467	0,032	0,186	0,010	0,478
Loxl1	0,826	0,450	0,129	0,155	0,035	0,891
Tia1	1,000	0,709	0,049	0,757	0,071	0,373
Rbpms	0,800	0,186	0,032	0,653	0,212	0,840
Pald	0,226	0,639	0,305	0,038	0,010	0,953
Cyb5r4	0,990	0,484	0,050	0,372	0,039	0,592
Mphosph10	0,956	0,854	0,048	0,614	0,025	0,246
1810030N24Rik	0,652	0,949	0,140	0,399	0,021	0,383
Lepre1	1,000	0,754	0,025	0,764	0,033	0,203
Trp73	1,000	0,425	0,020	0,442	0,027	0,398
Mib2	0,013	0,997	0,990	0,028	0,023	1,000
Tmem176b	0,981	0,466	0,020	0,326	0,014	0,359
Igf2bp3	0,631	0,096	0,003	0,015	0,000	0,389
Trim24	0,794	0,078	0,002	0,020	0,001	0,373
Arhgef6	0,062	0,005	0,003	0,570	0,576	1,000
Mad11l	0,041	0,993	0,996	0,034	0,028	1,000
Ift122	0,250	0,032	0,006	0,678	0,311	0,925
Egn1	0,469	0,970	0,298	0,755	0,028	0,179
Abhd12	0,997	0,305	0,042	0,267	0,040	0,745
Aph1c	0,998	0,401	0,004	0,360	0,005	0,127
Kif1b	0,000	0,908	0,603	0,000	0,4320	0,953
Slc25a33	0,707	0,058	0,026	0,380	0,234	0,994
Flt1	0,429	0,226	0,018	0,020	0,001	0,621
Pcolce	0,100	0,129	0,010	0,999	0,726	0,639
Trpm1	0,999	0,610	0,032	0,716	0,056	0,348
Ankrd25	0,809	0,432	0,099	0,115	0,019	0,807
Mgll	0,229	0,079	0,004	0,929	0,217	0,512
Itpr1	0,175	0,773	0,330	0,043	0,008	0,894
BC017158	0,001	0,322	0,379	0,039	0,019	0,996
Tacc2	0,273	0,409	0,021	0,023	0,001	0,419
Rps6ka3	0,115	0,217	0,017	0,004	0,000	0,620
Mtm1	0,076	0,266	0,885	0,887	0,021	0,087
Rdx	0,128	1,000	0,627	0,159	0,016	0,664
Igsf4a	0,340	1,000	0,042	0,368	0,002	0,061
BC033915	0,811	1,000	0,029	0,850	0,190	0,043
Pccb	0,968	0,107	0,029	0,062	0,017	0,950
Cpsfl	1,000	0,730	0,045	0,730	0,055	0,334

<b>Orc1l</b>	0,001	0,46047	0,11297	0,467	0,218	0,964
<b>Ube4b</b>	0,379	0,788	0,004	0,110	0,000	0,041
<b>Cdc7</b>	0,197	0,014	0,004	0,527	0,264	0,967
<b>Aff1</b>	0,026	0,500	0,199	0,344	0,592	0,945
<b>1500003O22Rik</b>	0,165	0,988	0,663	0,120	0,024	0,869
<b>Ilk</b>	0,604	0,892	0,100	0,286	0,013	0,377
<b>Trim30</b>	0,362	0,538	0,276	0,050	0,017	0,975
<b>Art5</b>	0,999	0,524	0,009	0,636	0,018	0,172
<b>Trpc2</b>	0,526	0,323	0,005	0,982	0,096	0,186
<b>Irak1bp1</b>	0,438	0,462	0,042	0,051	0,003	0,561
<b>Acbd6</b>	0,010	0,999	0,061	0,019	0,684	0,104
<b>Sdsl</b>	0,523	0,009	0,001	0,149	0,016	0,694
<b>Pms2</b>	0,006	0,039	0,396	0,5046	0,000	0,458
<b>Wbp1</b>	0,387	0,133	0,005	0,957	0,253	0,433
<b>Slc41a3</b>	0,689	0,230	0,206	0,045	0,037	1,000
<b>Col4a6</b>	0,017	0,643	0,413	0,174	0,237	0,989
<b>Cck</b>	0,997	0,039	0,010	0,036	0,010	0,955
<b>Fbxw8</b>	0,647	0,550	0,030	0,999	0,262	0,328
<b>Rpl37a</b>	0,422	0,195	0,520	0,016	0,051	0,854

**Legenda:** Para determinação da significância da diferença de expressão dos genes entre as amostras de tumores extraídos dos animais submetidos aos diferentes tratamentos, foi usado o teste de análise de variância (ANOVA). Foram considerados na análise os valores das médias de intensidade de cada “spot” na sua lâmina “main” e “swap”. Desta forma, 118 genes com p valor menor que 0,05 foram encontrados. A tabela mostra os resultados da comparação par a par entre os grupos de tratamento empregando o teste de Tukey, com os respectivos p valores encontrados para cada comparação (onde M= melfalano, C= controle, T=TNF e MT= melfalano + TNF). Em cores são mostrados os valores de  $p < 0,05$  encontrados em cada comparação.

**Tabela 15** - Lista dos 118 genes com os respectivos valores de “fold” encontrados para cada comparação (M = melfalano, C= controle, T=TNF e MT= melfalano + TNF) após a realização do teste de Tukey.

GeneSymbol	MxC	TxC	MTxC	TxM	MTxM	MTxT
Rnf130	-1,06717	-1,21109	-1,41049	-1,13486	-1,32171	-1,16465
Pecam1	1,099345	-1,73492	-1,79782	-1,90727	-1,97643	-1,03626
Bax	-1,16927	1,177401	1,273667	1,376705	1,489266	1,081762
Mrpl49	-1,37678	-1,31717	-1,18538	1,04526	1,161466	1,111174
Mrpl38	1,191414	-1,074	-1,1447	-1,27958	-1,36381	-1,06582
Col20a1	-1,16624	-1,00766	1,295578	1,157371	1,510956	1,305507
Hbs1l	1,09968	-1,10225	-1,07104	-1,21213	-1,17781	1,02914
Nle1	-1,40877	1,068759	1,235967	1,505633	1,741189	1,15645
Rnf135	-1,20084	-1,36768	-1,54054	-1,13894	-1,28289	-1,12639
Mettl6	1,053675	1,226338	1,261038	1,163868	1,1968	1,028296
Serpinf1	1,001116	-1,27764	-1,44661	-1,27906	-1,44823	-1,13225
Oprm1	1,232557	1,0155	1,059541	-1,21374	-1,16329	1,043368
Btf3	1,035605	1,005816	-1,43175	-1,02962	-1,48272	-1,44007
Tefe3	-1,08003	1,205268	1,469596	1,301724	1,587206	1,21931
Hyi	-1,33998	-1,15436	1,110649	1,160801	1,488248	1,282088
ORF61	-1,4557	-1,07274	-1,05123	1,356991	1,384755	1,02046
Grb10	1,118577	-1,42101	-1,43557	-1,58951	-1,6058	-1,01025
Col4a3bp	-1,00502	1,23473	1,418783	1,240922	1,425898	1,149063
Pdia6	1,500574	1,091846	1,005384	-1,37435	-1,49254	-1,086
Zfp622	1,004373	1,183716	1,35346	1,178562	1,347567	1,143399
Cdc371l	-1,25727	-1,30567	-1,29702	-1,0385	-1,03162	1,00667
Hgs	-1,09946	-1,08623	1,031942	1,012185	1,134581	1,120922
4930544G21Rik	1,111774	1,096007	1,356375	-1,01439	1,22001	1,237561
Kifap3	-1,33745	-1,3035	-1,78301	1,026042	-1,33315	-1,36786
Angel2	-1,17639	-1,16552	-1,32906	1,009322	-1,12978	-1,14031
Neb	1,150754	1,432787	1,807937	1,245085	1,571089	1,261832
Rrbp1	-1,12268	1,040675	-1,24346	1,168342	-1,10758	-1,29404
Napb	-1,17218	-1,59005	-1,8297	-1,3565	-1,56094	-1,15072
Ppil2	-1,375	1,006427	1,087297	1,38384	1,495036	1,080353
Ltbp3	-1,43814	1,032921	-1,01975	1,485489	1,410297	-1,05332
Pard3	-2,15518	-1,13283	-1,11406	1,902465	1,934526	1,016853
1110007L15Rik	1,256385	-1,06757	-1,21445	-1,34128	-1,52581	-1,13758
E2f1	-1,18988	-1,32607	-1,38436	-1,11446	-1,16345	-1,04395
Ddx20	1,171483	1,376176	1,077174	1,174729	-1,08755	-1,27758
Extl2	1,211683	-1,16866	1,012115	-1,41604	-1,19718	1,182814
Polr1e	-1,02029	1,210414	1,25024	1,234976	1,27561	1,032903
Kpna3	1,051798	1,613441	1,534282	1,533984	1,458723	-1,05159
Atp6v1c1	-1,13084	-1,17354	-1,37448	-1,03777	-1,21545	-1,17122
Pou2f1	1,013272	1,180872	1,218069	1,165405	1,202115	1,0315
Bcl2l11	-1,35735	1,282935	1,798511	1,741388	2,441204	1,401873
Ptprj	1,408377	-1,57661	-1,29895	-2,22046	-1,82942	1,21375
Fabp4	4,466057	-2,7237	-4,96787	-12,1642	-22,1868	-1,82394
Camk2d	-1,04171	1,221618	1,454421	1,272571	1,515085	1,19057
Dlg5	-1,72454	-1,23779	1,046799	1,393237	1,805248	1,295722
Glul	-1,41505	-1,78232	-2,139	-1,25954	-1,5116	-1,20012
Bthd3	-1,11268	1,15333	1,337121	1,283292	1,487793	1,159356



Masp1	-1,27126	1,147132	1,248128	1,458308	1,586701	1,088042
Sigirr	1,181038	-1,34935	-1,57219	-1,59363	-1,85681	-1,16515
2310038H17Rik	-1,17419	-1,28761	-1,4306	-1,09659	-1,21837	-1,11105
Dgat1	-1,0216	-1,07738	-1,39822	-1,0546	-1,36866	-1,2978
Cyb5r1	-1,16417	1,158276	1,252033	1,348434	1,457583	1,080945
Srp9	1,053848	-1,06746	-1,22213	-1,12494	-1,28794	-1,14489
Ifi202b	1,557137	3,274607	8,781576	2,102966	5,639564	2,681719
Crls1	-2,49932	-1,11664	1,059222	2,238248	2,647335	1,182771
Txndc11	-1,05521	1,083324	-1,33357	1,143132	-1,2638	-1,44469
Myef2	1,127938	-1,25313	-1,34428	-1,41346	-1,51627	-1,07274
Atpbd4	1,174394	1,5313	1,893626	1,303907	1,612428	1,236613
Efna3	1,284431	1,130545	1,280219	-1,13612	-1,00329	1,132391
Ubap1	1,030352	1,112919	1,274873	1,080135	1,237318	1,145522
Akr1b7	-2,18452	1,434928	1,975151	3,134627	4,314755	1,376481
Zc3hav1	-1,69675	1,449517	2,251848	2,459469	3,820826	1,553516
Usp9x	-1,25728	1,106973	1,078859	1,391777	1,35643	-1,02606
Cklf	1,061395	-1,12238	-1,25786	-1,19129	-1,33508	-1,12071
Loxl1	1,239518	-1,46461	-1,75042	-1,81541	-2,16967	-1,19514
Tia1	-1,00607	-1,22323	-1,67337	-1,21585	-1,66327	-1,36799
Rbpms	-1,06242	-1,15345	-1,21875	-1,08568	-1,14715	-1,05662
Palld	-1,48659	1,264315	1,399849	1,879519	2,081002	1,107199
Cyb5r4	1,05962	-1,32277	-1,68848	-1,40164	-1,78915	-1,27647
Mphosph10	-1,0572	1,091613	1,354644	1,154051	1,432127	1,240956
1810030N24Rik	1,150774	-1,06596	-1,29913	-1,22668	-1,495	-1,21874
Lepre1	-1,00487	1,148107	1,53454	1,153702	1,542018	1,336583
Trp73	-1,00746	1,254043	1,58461	1,263401	1,596435	1,263601
Mib2	-1,69934	-1,0314	-1,04221	1,647606	1,63052	-1,01048
Tmem176b	1,0588	-1,25664	-1,62984	-1,33053	-1,72568	-1,29698
Igf2bp3	-1,33396	1,832724	2,709271	2,444775	3,61405	1,478275
Trim24	-1,14732	1,486832	1,908043	1,705867	2,189129	1,283294
Arhgef6	-1,7114	-2,23479	-2,19998	-1,30583	-1,28548	1,015824
Mad1l1	-1,4142	1,031442	1,023861	1,45866	1,44794	-1,0074
Ift122	-1,17012	-1,28754	-1,35287	-1,10035	-1,15618	-1,05074
Egln1	1,252113	1,068862	-1,29868	-1,17145	-1,6261	-1,38811
Abhd12	1,022913	-1,23644	-1,39115	-1,26477	-1,42303	-1,12513
Aph1c	1,03741	-1,40577	-2,32203	-1,45836	-2,4089	-1,65178
Kif1b	-1,85	1,075193	1,137937	1,989112	2,105189	1,058356
Slc25a33	1,092238	1,259974	1,286293	1,153571	1,177668	1,020889
Flt1	1,582182	-1,81144	-2,59708	-2,86603	-4,10905	-1,43371
Pcolce	-1,21227	-1,19851	-1,31321	1,011477	-1,08326	-1,0957
Trpm1	-1,02818	-1,32273	-1,94829	-1,28648	-1,89489	-1,47293
Ankrd25	-1,15855	1,294014	1,488755	1,499175	1,724792	1,150494
Mgll	-1,16065	-1,21651	-1,35048	-1,04813	-1,16355	-1,11012
Itpr1	-1,27337	1,11201	1,201823	1,416005	1,53037	1,080766
BC017158	-1,39739	-1,127	-1,11078	1,239916	1,258021	1,014602
Tacc2	-1,20599	1,171383	1,369426	1,412678	1,651517	1,169068
Rps6ka3	-1,25358	1,209569	1,355526	1,516294	1,699264	1,120669
Mtm1	-1,20279	-1,14129	1,048422	1,053885	1,261034	1,196558
Rdx	1,245761	1,00057	-1,11198	-1,24505	-1,38526	-1,11261
Igsf4a	-1,11853	1,002086	1,199715	1,120859	1,341913	1,197218
BC033915	-1,06691	-1,00274	-1,24665	1,063993	-1,16847	-1,24324

<b>Pccb</b>	1,048694	-1,29692	-1,37132	-1,36007	-1,43809	-1,05737
<b>Cpsf1</b>	1,00447	-1,08658	-1,24995	-1,09143	-1,25554	-1,15036
<b>Orc11</b>	1,481931	1,66863	1,729144	1,125984	1,166818	1,036266
<b>Ube4b</b>	-1,09227	1,050825	1,233458	1,147789	1,347274	1,1738
<b>Cdc7</b>	1,268136	1,495073	1,57417	1,178952	1,241325	1,052905
<b>Aff1</b>	1,509162	1,198516	1,284602	-1,25919	-1,17481	1,071827
<b>1500003O22Rik</b>	-1,11155	1,015571	1,053187	1,12886	1,170672	1,037039
<b>Ilk</b>	-1,12363	1,068005	1,246498	1,200043	1,400603	1,167127
<b>Trim30</b>	-1,38317	1,298835	1,40588	1,796508	1,94457	1,082416
<b>Art5</b>	-1,04151	-1,56311	-3,16018	-1,5008	-3,03422	-2,02173
<b>Trpc2</b>	1,105285	1,136915	1,327376	1,028617	1,200935	1,167524
<b>Irak1bp1</b>	-1,30518	1,295649	1,629005	1,691052	2,126141	1,257289
<b>Acbd6</b>	-1,2225	-1,00773	-1,15152	1,213123	1,061643	-1,14268
<b>Sdsl</b>	-1,10997	-1,32894	-1,44311	-1,19728	-1,30013	-1,08591
<b>Pms2</b>	-1,26018	1,189363	1,091339	1,498812	1,375284	-1,08982
<b>Wbp1</b>	-1,19923	-1,27062	-1,48781	-1,05953	-1,24064	-1,17093
<b>Slc41a3</b>	1,073999	-1,13806	-1,13473	-1,22227	-1,2187	1,002928
<b>Col4a6</b>	-1,37462	-1,1144	-1,14657	1,233506	1,198901	-1,02886
<b>Cck</b>	1,044224	-1,89111	-2,10525	-1,97474	-2,19835	-1,11323
<b>Fbxw8</b>	-1,23213	-1,26875	-1,76473	-1,02972	-1,43226	-1,39092
<b>Rpl37a</b>	-1,16356	1,225705	1,13513	1,42618	1,32079	-1,07979

**Legenda:** A tabela mostra os resultados da comparação par a par entre os grupos de tratamento com os respectivos valores de “fold” encontrados para cada comparação (M= melfalano, C= controle, T=TNF e MT= Melfalano + TNF). Em amarelo são mostrados os valores maiores de 1,5 (“fold” > 1,5) e em verde os maiores que 2,0 (“fold” > 2,0). Os genes listados foram selecionados por apresentarem da diferença de expressão com significância estatística pelo teste de análise de variância (ANOVA).

Realizamos dois agrupamentos dos genes diferencialmente expressos em cada grupo de tratamento em relação ao grupo controle, com  $p < 0,05$  e “fold”  $\geq 1,5$  (Tabela 16) ou “fold”  $\geq 2,0$  (Tabela 17).

**Tabela 16** – Relação dos genes diferencialmente expressos entre os grupos de tratamento *in vivo* e o grupo controle que apresentaram  $p < 0,05$  ou “fold”  $\geq 1,5$ .

Comparação	M x C		T x C		MT x C	
	p<0,05	fold $\geq$ 1,5	p<0,05	fold $\geq$ 1,5	p>0,05	fold $\geq$ 1,5
Gene symbol	Pdia6	Pdia6	Ptprj	Ptprj	Pecam1	Pecam1
	Dlg5	Dlg5	Arhgef6	Arhgef6	Rnf135	Rnf135
	Crls1	Crls1	Cck	Cck	Kifap3	Kifap3
	Mib2	Mib2	Mrpl49	Pecam1	Neb	Neb
	Kif1b	Kif1b	Cdc3711	Napb	Napb	Napb
	Aff1	Aff1	Ddx20	Kpna3	Glul	Glul
	Pard3	Pard3	Polr1e	Fabp4	Ifi202b	Ifi202b
	Oprm1	Ifi202b	Ift122	Glul	Atpbd4	Atpbd4
	ORF61	Zc3hav1	Cdc7	Crls1	Lepre1	Lepre1
	Cdc3711	Flt1	Sdsl	Atpbd4	Trp73	Trp73
	Ltpb3	Arhgef6	Pms2	Igf2bp3	Tmem176b	Tmem176b
	Mrp149	Fabp4		Flt1	Igf2bp3	Igf2bp3
	Efna3	Akr1b7		Orc11	Trim24	Trim24
	Mad111			Art5	Arhgef6	Arhgef6
	BC017158				Aph1c	Aph1c
	Orc11				Flt1	Flt1
	Acbd6				Trpm1	Trpm1
	Pms2				Cdc7	Cdc7
	Col4a6				Art5	Art5
	Extl2				Cck	Cck
					Fbxw8	Fbxw8
					Irak1bp1	Irak1bp1
					Tia1	Tia1
					Zc3hav1	Zc3hav1
					Col4a3bp	Kpna3
					Zfp622	Bcl2l11
					Cdc3711	Sigirr
					4930544G21Rik	Akr1b7
					Angel2	Fabp4
					E2f1	Loxl1
					Polr1e	Cyb5r4
					Atp6v1c1	Orc11
					Pou2f1	
					Camk2d	
					Btbd3	
					2310038H17Rik	
					Efna3	
					Ubap1	
					Rnf130	
					Cklf	
				Rbpms		
				Tmem176b		
				Ift122		
				Abhd12		
				Slc25a33		
				Pcolce		
				Mgl1		
				Tacc2		
				Rps6ka3		
				BC033915		

					Pccb	
					Ube4b	
					Trpc2	
					Sdsl	
					Wbp1	
					Cpsfl	
					Igsf4a	
					Mphosph10	
					Tefe3	

**Legenda:** Lista dos genes que apresentaram  $p < 0,05$  ou “fold”  $\geq 1,5$  para as comparações entre os grupos de tratamento *in vivo* e o grupo controle. Os genes que apresentaram  $p < 0,05$  e “fold”  $\geq 1,5$  estão pareados. Os genes que tiveram sua expressão aumentada em relação ao grupo controle estão destacados em vermelho e os que tiveram sua expressão diminuída em relação grupo controle estão destacados em verde. Os genes não assinalados ou tiveram  $p > 0,05$  ou “fold”  $< 1,5$ .

**Tabela 17** – Relação dos genes diferencialmente expressos entre os grupos de tratamento *in vivo* e o grupo controle que apresentaram  $p < 0,05$  ou “fold”  $\geq 2,0$ .

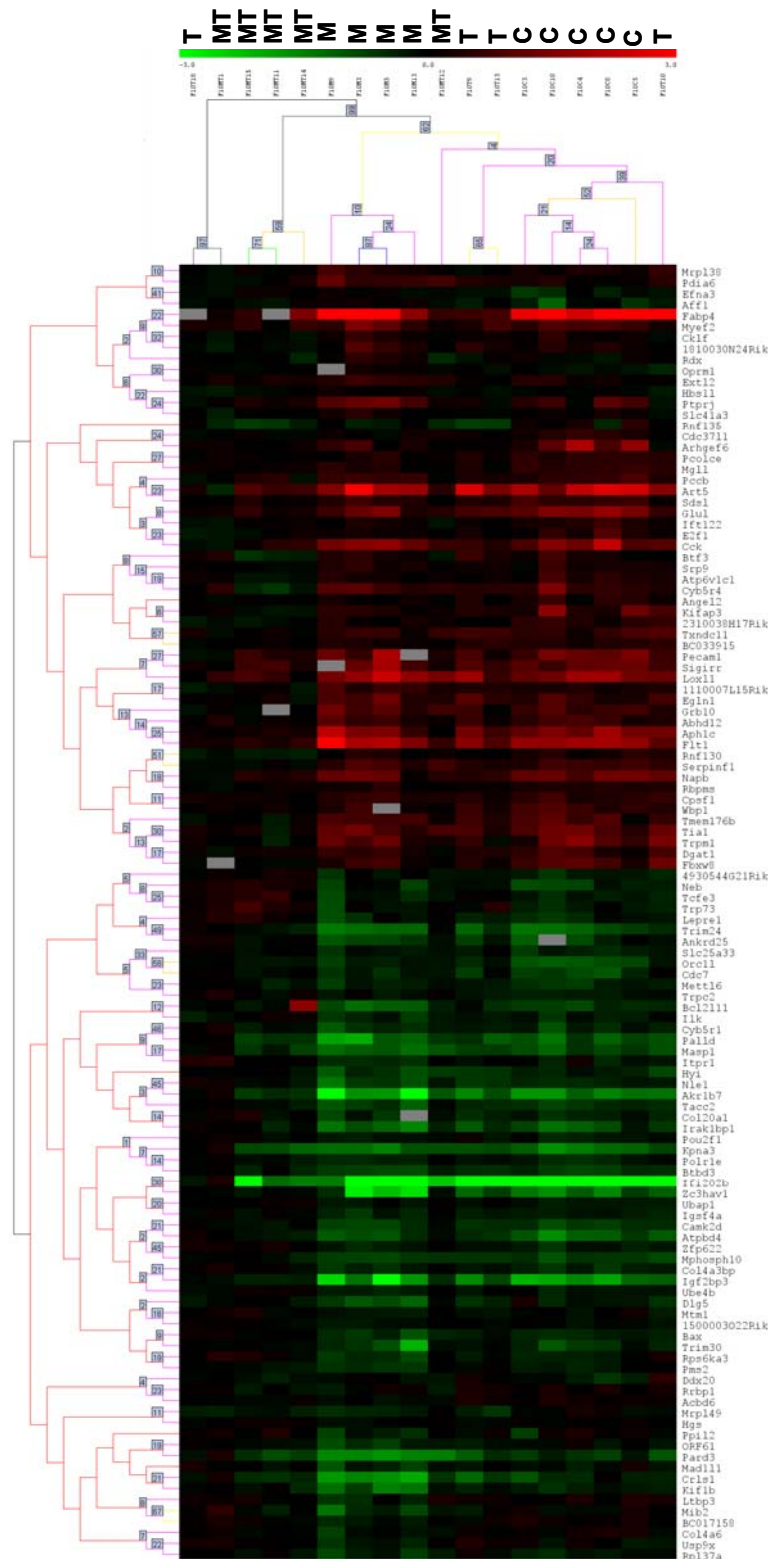
Comparaçã	M x C		T x C		MT x C	
	fold>2,0	p<0,05	fold>2,0	p<0,05	fold>2,0	p<0,05
Gene Symbol	Cr1s1	Cr1s1	Arhgef6	Arhgef6	Glul	Glul
	Pard3	Pard3	Fabp4		Ifi202b	Ifi202b
	Fabp4		Ifi202b		Zc3hav1	Zc3hav1
	AKr1b7				Igf2bp3	Igf2bp3
					Arhgef6	Arhgef6
					Aph1c	Aph1c
					Flt1	Flt1
					Art5	Art5
					Cck	Cck
					Fabp4	

**Legenda:** Lista dos genes que apresentaram  $p < 0,05$  ou “fold”  $\geq 2,0$  para as comparações entre os grupos de tratamento *in vivo* e o grupo controle. Os genes que apresentaram  $p < 0,05$  e “fold”  $\geq 2,0$  estão pareados. Os genes que tiveram sua expressão aumentada em relação ao grupo controle estão destacados em vermelho e os que tiveram sua expressão diminuída em relação grupo controle estão destacados em verde.

Estes 118 genes foram usados na construção de um cluster hierárquico não supervisionado mostrado na Figura 30. Nesta representação gráfica, a escala de cores é representativa da razão da intensidade das amostras sobre a referência em  $\log_2$ , variando de -3 a +3. Este conjunto de genes possibilitou uma boa separação das amostras em relação ao tipo de tratamento a que foram submetidas. Pelo perfil do “cluster” também foi possível identificar grupos de genes cujo comportamento em

resposta ao tratamento é parecido, ou seja, genes cuja modulação por TNF e MEL segue um padrão semelhante.

Com base nesta característica do padrão de modulação sofrido pelos genes, os 118 genes foram agrupados em clusters menores pela abordagem do “Self Organizing Map” (SOM). O SOM é um algoritmo de “clusterização” no qual os nós bidimensionais de uma grade são interativamente ajustados para refletir a estrutura global dos dados de expressão (TAMAYO et al. 1999). Foram, desta forma, obtidos 9 “clusters” diferentes, cuja composição de genes é mostrada na Tabela 18. Em cada um destes “clusters”, portanto, é possível se encontrar genes cujos padrões de expressão variam de forma semelhante nas amostras. Por exemplo, no “cluster” 8, mostrado na Figura 31, encontramos 31 genes cujo padrão de expressão mostra que os mesmos são menos expressos nas amostras dos grupos controle e tratadas com melfalano, apresentando um aumento de expressão em resposta ao tratamento combinado de TNF e MEL.



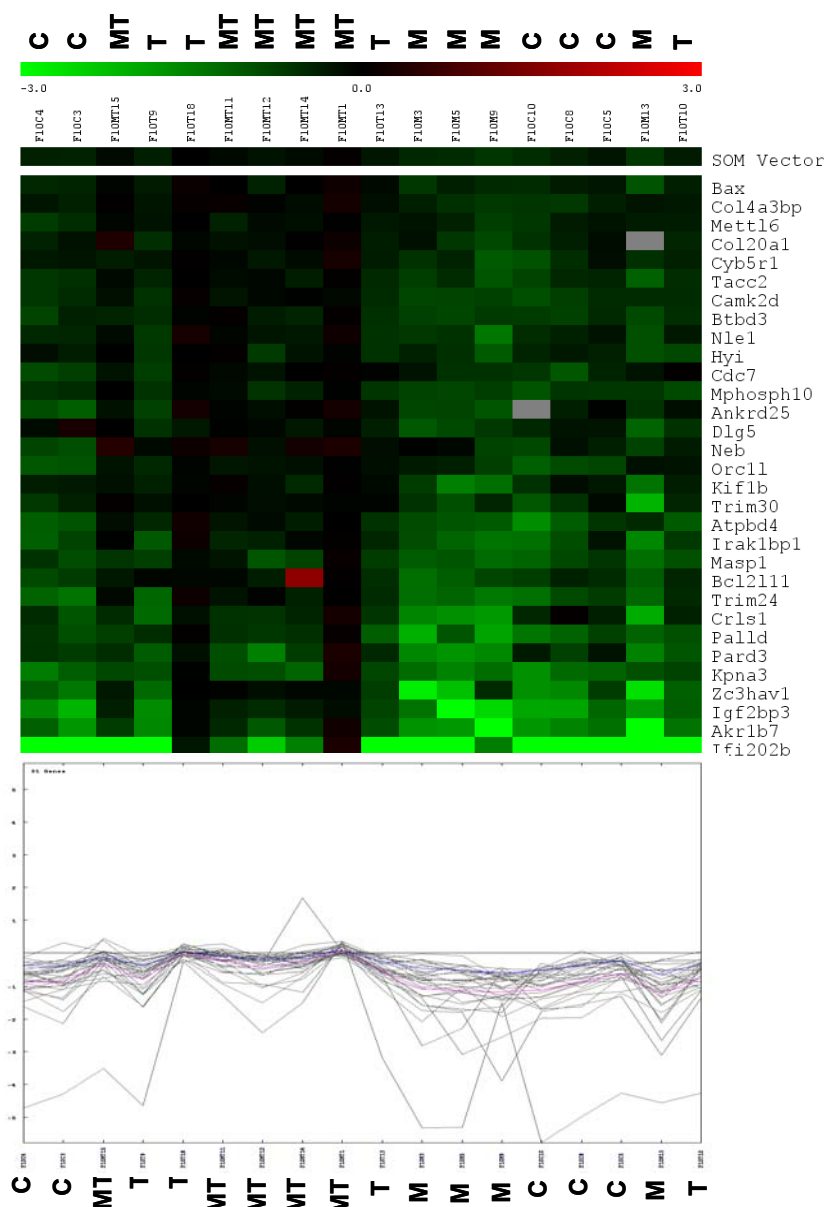
**Legenda:** As amostras foram agrupadas segundo a distância de correlação entre os 118 genes identificados por ANOVA e os genes segundo a Correlação Linear de Pearson.

**Figura 30** - Agrupamento hierárquico das amostras e dos genes diferencialmente expressos em tumores removidos de camundongos tratados com Salina (C), TNF (T), melfalano (M) ou TNF+melfalano (MT).

**Tabela 18** - Clusters obtidos a partir da lista dos 118 genes que apresentaram significância estatística pelo ANOVA, agrupados de acordo com a técnica de SOM (“self organizing map”) onde as amostras se segregaram de acordo com o perfil de expressão imposto por cada um dos tratamentos (MEL, TNF, TNF+MEL ou salina).

Cluster	Nº Genes	Identidade dos Genes que compõem o Cluster
01	1	Ift122
02	12	Rbpms, Acbd6, Srp9, Cdc3711, Cklf, Angel2, Rnf130, Atp6v1c1, E2f1, 2310038Rik, Btf3, Fabp4
03	36	Cpsf1, Mgl1, Pcolce, BC033915, Sdsl, Wbp1, Pccb, Extl2, 111007L15Rik, 1810030N24Rik, Serpinf1, Dgat1, Mrpl38, Abhd12, Txndc11, Fbxw8, Pdia6, Egl1, Grb10, Tmem176b, Kifap3, Myef2, Cyb5r4, Ptpnj, Tial, Trpm1, Arhgef6, Napb, Sigirr, Pecam1, Glul, Cck, Aph1c, Loxl1, Flt1, Art5
04	10	Hgs, Col4 a6, BC017158, hbs11, Oprm1, Usp9x, Ltbp3, Ppil2, Mib2, Trp73
05	05	1500003o22Rik, Mtm1, Efna3, Ddx20, Rnf135
06	03	Slc41a3, Rrbp1, Rdx
07	13	Polr1e, Igsf4a, Pms2, Slc25a33, Rpl37a, Zfp622, Ilk, ORF61, Rps6ka3, Itpr1, Mad111, Tcfe3, Leprel
08	31	Bax, Col4a3bp, Mettl6, Col20a1, Cyb5r1, Tacc2, Camk2d, Btbd3, Nle1, Hyi, Cdc7, Mphosph10, Ankrd25, Dlg5, Neb, Orc11, Kif1b, Trim30, Atpbd4, Irak1bp1, Masp1, Bcl2l11, Trim24, Cris1, Palld, Pard3, Zc3hav1, Igf2bp3, Akr1b7, Lfi202b
09	07	Ubap1, Ube4b, pou2f1, Trpc2, 4930544G21Rik, Mrpl49, Affl

Na Tabela 19 (cujos dados foram extraídos da Tabela 15) estão listados os valores de razão de intensidade encontrados para cada uma das comparações referentes aos genes Irak1bp1, Igf2bp3 e Iff202b, que são alguns dos componentes do cluster 8. Nestes exemplos, podemos comprovar o perfil de variação característico deste “cluster”.



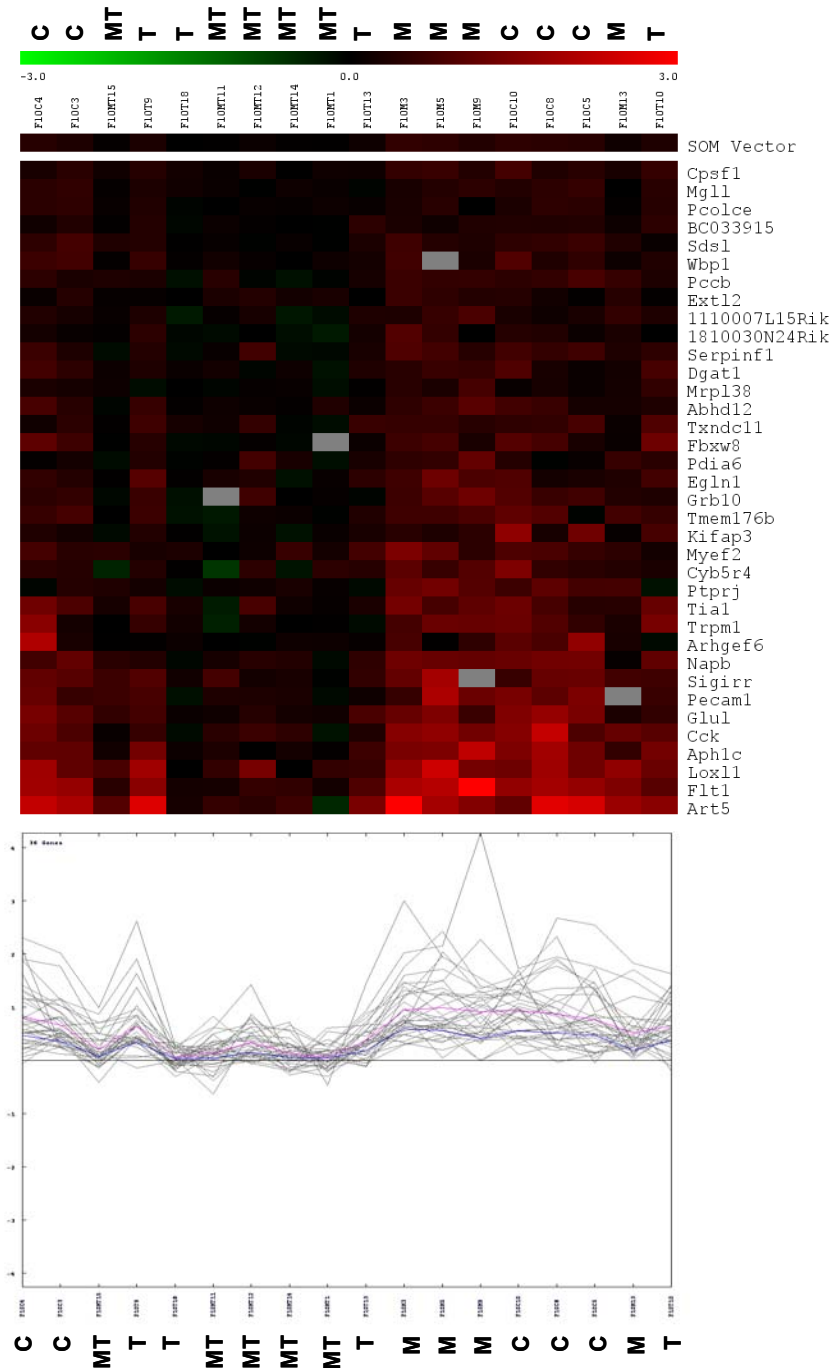
**Legenda:** A figura mostra os 31 genes agrupados pelo SOM em um nó onde o padrão de expressão é comum para genes menos expressos nas amostras dos grupos controle e tratadas com melfalano e que sofrem um aumento de expressão em resposta a ao tratamento combinado de TNF e Mel. No painel inferior, as linhas cinzas representam a variação de expressão de cada um dos genes deste cluster, a linha rosa, a média de expressão dos componentes do “cluster” em cada amostra, e a azul, o SOM vector. O SOM vector representa a localização espacial deste nó.

**Figura 31** - Representação gráfica do Cluster 8 gerado pelo “Self Organizing Map” (SOM).

Já no cluster 3, mostrado na Figura 32, os genes agrupados apresentam um perfil característico de uma expressão regulada negativamente pelo tratamento combinado de TNF e melfalano. Dentre os genes que fazem parte deste cluster e que, claramente, exemplificam o padrão de expressão deste grupo estão *Pecam1*, *Flt1*,



Sigirr, Glul, cujos valores de “fold” para cada comparação entre os diferentes tratamentos podem ser consultados na Tabela 19 (dados extraídos da Tabela 15).



**Tabela 19** - Lista de alguns dos genes componentes do SOM 8 (em amarelo) e 3 (verde) e seus respectivos valores de razão encontrados para cada comparação (M = melfalano, C= controle, T=TNF e MT= melfalano + TNF) após a realização do teste de Tukey.

GeneSymbol	MxC	TxC	MTxC	TxM	MTxM	MTxT
Pecam1	1,099	-1,735	-1,798	-1,907	-1,976	-1,036
Flt1	1,582	-1,811	-2,597	-2,866	-4,109	-1,434
Glul	-1,415	-1,782	-2,139	-1,260	-1,512	-1,200
Sigirr	1,181	-1,349	-1,572	-1,594	-1,857	-1,165
Ifi202b	1,557	3,275	8,782	2,103	5,640	2,682
Igf2bp3	-1,334	1,833	2,709	2,445	3,614	1,478
Irak1bp1	-1,305	1,296	1,629	1,691	2,126	1,257

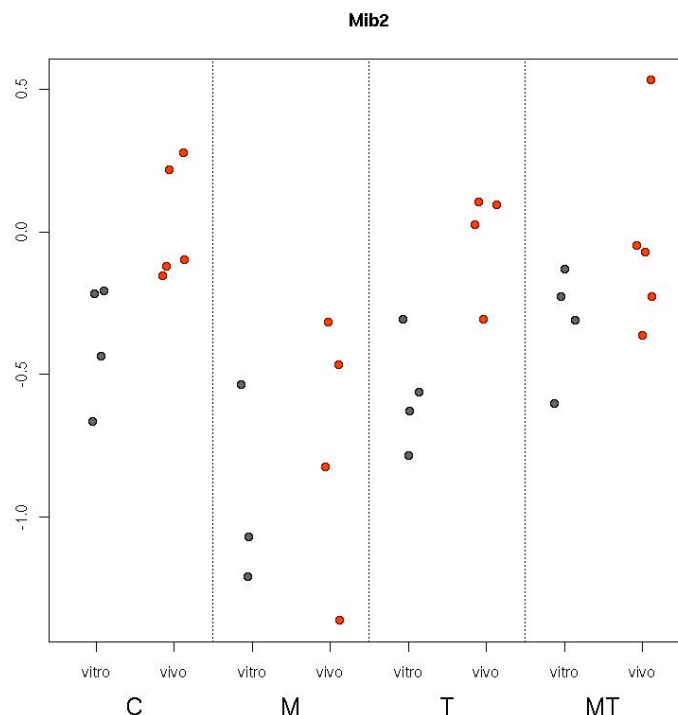
## 5.11 COMPARAÇÃO ENTRE OS DADOS OBTIDOS PELA ABORDAGEM *IN VITRO* COM A *IN VIVO*

Um dos objetivos do emprego da estratégia experimental adotada neste trabalho era, através da comparação entre os perfis de expressão gênica traçados para a resposta da cultura das linhagens de melanoma a cada um dos tratamentos (abordagem *in vitro*) e dos tumores gerados pela implantação destas mesmas linhagens nos animais (abordagem *in vivo*), identificar qual o componente do tumor estaria respondendo ao tratamento: as células de melanoma ou algum outro componente do estroma tumoral.

Realizamos inicialmente uma análise de variância das amostras tratadas *in vitro* a fim de determinar se seria possível agrupar as amostras das linhagens B16F1 e B16F10 submetidas ao mesmo tratamento e obter um número suficiente de amostras em cada grupo de tratamento para se proceder alguma análise estatística. Entretanto, a variância intra-grupo para cada linhagem era maior do que a variância inter-grupos, não sendo possível, desta feita, agrupar os dados das duas linhagens.

No intuito de, contudo, realizar alguma comparação entre o efeito das drogas empregadas sobre a expressão gênica das células de melanoma (experimento *in vitro*) e no tumor (experimento *in vivo*), foi feita uma análise comparativa entre os gráficos de dispersão das razões de intensidade entre a amostra e a referência de cada gene no conjunto de dados *in vitro* com o observado *in vivo* e, desta forma, foi inferida a variação da expressão do gene em questão em cada uma destas abordagens experimentais. Adotando este tipo de análise para cada gene de interesse foi, então, possível inferir se os tratamentos estão interferindo na modulação de genes na célula tumoral diretamente ou em algum outro componente celular do estroma do tumor.

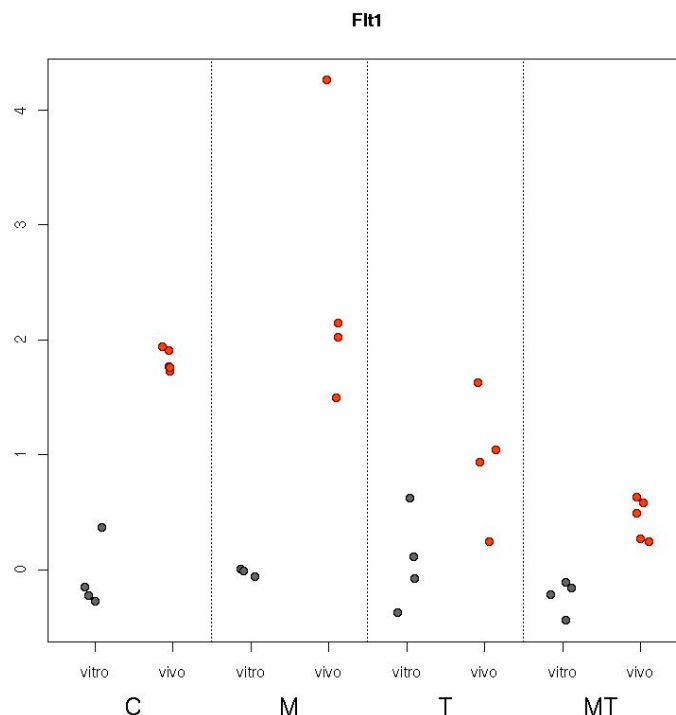
Como exemplo das possibilidades deste tipo de análise, mostramos na Figura 33 o gráfico de dispersão para o gene Mib2. O gráfico de dispersão para este gene, mostrado na Figura 33, revela que o perfil de modulação deste gene nas amostras *in vitro* segue o mesmo padrão observado para *in vivo*, o que sugere que este gene estaria sendo modulado em um elemento comum presente nas duas abordagens, portanto a linhagem de melanoma.



**Legenda:** O gene Mib2 sofre modulação nas amostras *in vitro* pelo melfalano na mesma direção que é observada para as amostras *in vivo*, o que sugere que este gene está sendo modulado em um elemento comum presente nas duas abordagens, portanto, provavelmente as células de melanoma. C – controle; M – melfalano, T – TNF; MT – TNF + melfalano.

**Figura 33** - Gráfico de dispersão da razão de intensidade entre a amostra e a referência do gene Mib2 em resposta a cada um dos tratamentos, tanto na cultura das células de melanoma (verde - abordagem *in vitro*), quanto nos tumores extraídos dos animais (vermelho - abordagem *in vivo*).

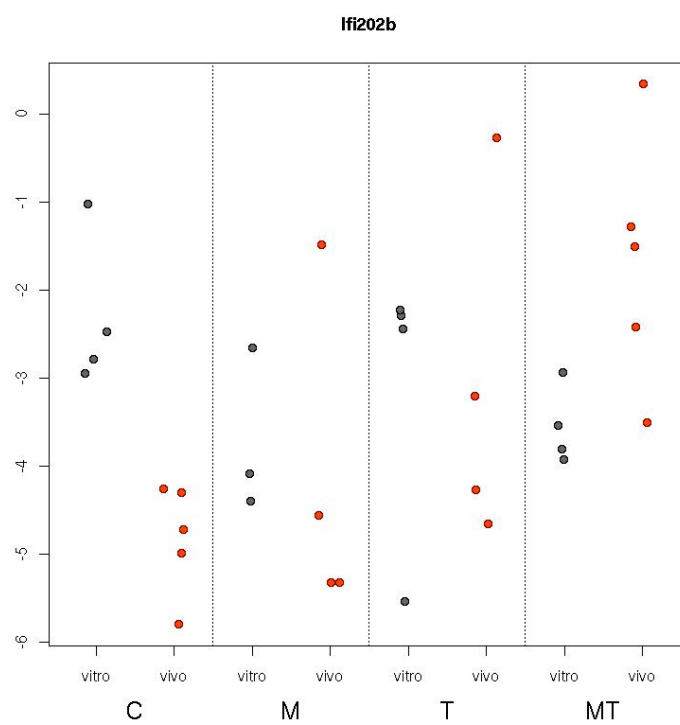
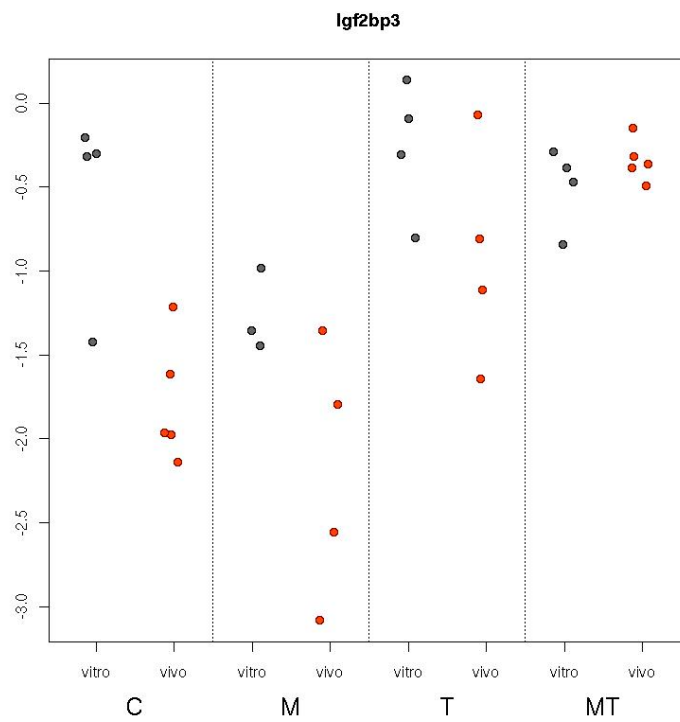
Já o gráfico da Figura 34 representa a análise de dispersão do gene Flt1, e aponta que o perfil observado nos experimentos realizados *in vitro* é diferente daquele encontrado nos ensaios *in vivo*, sugerindo que outro tipo celular, que não os melanomas, seja o alvo da modulação gênica pelos tratamentos. Um possível candidato a alvo da ação dos tratamentos no nosso modelo são as células endoteliais. De fato Flt1 é um dos receptores reportados na literatura para o VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Interessantemente, os nossos dados indicam que o tratamento com TNF regula negativamente a expressão deste gene e o efeito da combinação de TNF com MEL aumenta a inibição desta expressão.

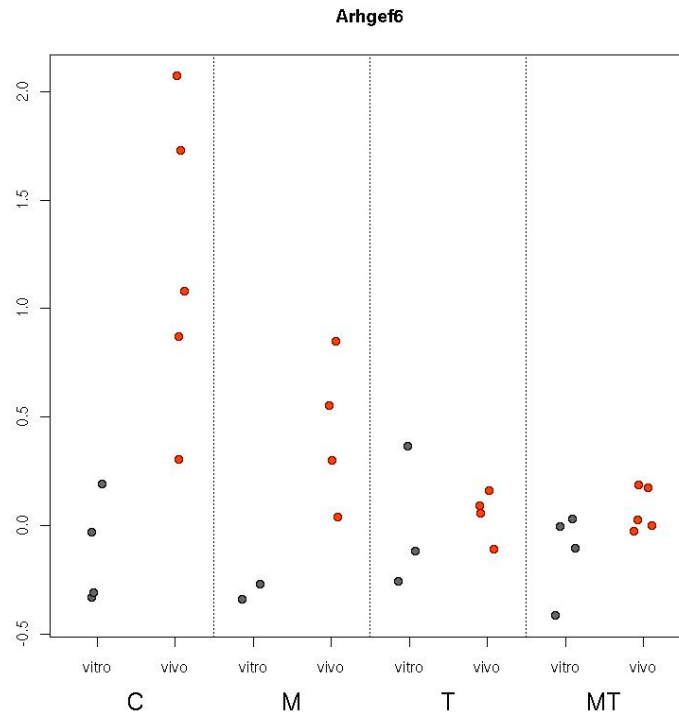


**Legenda:** O perfil de expressão observado nos experimentos realizados *in vitro* é diferente daquele encontrado nos ensaios *in vivo*, sugerindo que outro tipo celular, e não as células de melanoma (único componente celular da abordagem *in vitro*), provavelmente é o alvo da modulação gênica pelos tratamentos. C – controle; M – melfalano, T – TNF; MT – TNF + melfalano.

**Figura 34** - Gráfico de dispersão da razão de intensidade entre a amostra e a referência do gene Flt1 em resposta a cada um dos tratamentos, tanto na cultura das células de melanoma (verde - abordagem *in vitro*), quanto nos tumores extraídos dos animais (vermelho - abordagem *in vivo*).

A maioria dos genes, contudo, que tiveram sua expressão modulada de forma significativa ( $p < 0,05$  e “fold”  $\geq 2,0$ ), parecem ter sido modulados em elementos do tumor que não a célula do melanoma, ou alternativamente, estarem sendo modulados realmente nas células do melanoma, mas mediante alguma modificação de resposta destas em virtude da interação com o micro-ambiente tumoral, uma vez que se observa discordância na direção da modulação destes genes entre as abordagens *in vitro* e *in vivo* (Figura 35).





**Legenda:** A maioria dos genes que tiveram sua expressão modulada pelos tratamentos parecem não tê-lo feito na mesma direção quando comparamos as abordagens *in vitro* e *in vivo*, sugerindo, talvez um maior efeito dos tratamentos sobre outros elementos do tumor, que não a célula do melanoma. Dispostos acima os gráficos de dispersão dos genes *Igf2bp3*, *Ifi202b* e *Arhgef6*. C – controle; M – melfalano, T – TNF; MT – TNF + melfalano.

**Figura 35** – Gráficos de dispersão comparando o padrão de expressão gênica para as abordagens *in vitro* (verde) e *in vivo* (vermelho) para alguns genes que se foram modulados de forma significativa ( $p > 0,05$  e “fold”  $\geq 2,0$ ) nos tumores.

## 6 DISCUSSÃO

O melfalano é um quimioterápico cujos efeitos sobre o melanoma já foram relatados (LEJÉUNE et al. 2006). Entretanto, seu uso sistêmico no tratamento deste tipo de tumor não é eficaz, estando restrito à realização de ILP, onde o uso conjunto de TNF aumenta as taxas de resposta, e eventualmente, prolonga o tempo de controle do tumor. Com o intuito de entender melhor os mecanismos envolvidos na interação destas duas drogas no tratamento do melanoma pretendemos analisar o perfil de expressão dos genes modulados pela exposição de células melanoma murino *in vitro* e *in vivo* e, desta forma, tentar apontar possíveis alvos celulares e moleculares da ação de cada um destes agentes.

Inicialmente foi investigado o efeito direto do melfalano e TNF sobre a proliferação das células de melanoma. Os testes de citotoxicidade mostraram que as linhagens de melanoma murino B16F1 e B16F10 são sensíveis às doses de melfalano empregadas (36,9 $\mu$ M), uma vez que se observa uma redução significativa no número de células viáveis após 48h e 72h de tratamento. Contudo, a resposta citotóxica ao melfalano não foi modificada com a adição de TNF, quer seja na concentração de 10ng/ml ou 30ng/ml. Da mesma forma o tratamento isolado com TNF não mostrou atividade citotóxica após 24h, 48h ou 72h. O tratamento isolado com TNF não mostrou atividade citotóxica após 24h, 48h ou 72h quer seja na concentração de 10ng/ml ou 30ng/ml. Da mesma forma, nas doses empregadas, a adição de TNF ao melfalano não alterou a atividade citotóxica do melfalano sobre as células de melanoma. Realizamos ensaios de citotoxicidade *in vitro* realizando ou não



centrifugação das placas, após a reação com MTT, e antes da remoção do sobrenadante, e não verificamos alteração dos dados.

Inserimos controles negativos com melfalano ou TNF apenas, sem plaqueamento de células, e não observamos diferença na absorbância desses grupos em relação ao grupo controle. Desta forma, as diferenças de absorbância entre os grupos de tratamento não se devem a oxidação do MTT diretamente pelo melfalano ou TNF.

A atividade do TNF murino empregado foi avaliada num ensaio de citotoxicidade com MTT, empregando cultura primária de ceratinócitos de prepúcio, que foram tratados ou não com TNF 10ng/ml por 48 horas. Observamos que houve inibição de proliferação celular no grupo exposto ao TNF, mas não no grupo incubado com meio de cultura apenas. Assim sendo, o TNF utilizado encontra-se biologicamente ativo.

Os dados de citotoxicidade *in vitro* mediada por melfalano para as linhagens B16F10 e B16F1 encontram-se em conformidade com aqueles já descritos na literatura para a linhagem B16F10, onde se verificou que a exposição destas células a melfalano na concentração de 36,9 $\mu$ M promovia a morte de 50% das células após 24h de exposição ao agente (RODRIGUEZ-VICENTE et al. 1998). Já havia sido descrita anteriormente a ausência de atividade citotóxica do TNF *in vitro* contra a linhagem de melanoma murino B16BL6, uma variante da linhagem B16F0 com capacidade invasiva (BROUCKAERT et al. 1986), desta forma, não é de surpreender a ausência de efeito direto do TNF sobre a morte celular das linhagens B16F10 e B16F1.

As células de melanoma das linhagens B16F1 e B16F10 foram capazes de formar tumores quando injetadas subcutaneamente em camundongos machos isogênicos C57BL/6 em todas as doses testadas ( $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^5$  e  $5 \times 10^4$ ). Não

houve diferença significativa no tempo que os tumores levaram para atingir  $1,0 \pm 0,3$   $\text{cm}^2$  nos grupos inoculados com as diferentes doses (10 a 12 dias), entretanto, a estrutura histológica dos tumores obtidos a partir da inoculação de  $5,0 \times 10^5$  células apresentavam arquitetura mais preservada, com áreas menos extensas de necrose e hemorragia (Anexo 1).

Escolhemos o produto dos maiores diâmetros para avaliar o crescimento tumoral no lugar de utilizar o volume tumoral calculado por ser mais simples. Não existe consenso sobre que medida deva ser utilizada, alguns autores empregam volume, outros a área. O método utilizado, no nosso caso, é o mesmo para todos os grupos o que uniformiza o critério de medida e, além disso, o nosso objetivo é acompanhar as variações do tamanho do tumor, e não definir medidas precisas em cada tempo de medida; desta forma, já que se espera que o crescimento do tumor seja homogêneo, não haverá modificação da mudança percentual do tamanho quer se considere medidas uni, bi ou tridimensionais do tumor. Alguns estudos empregaram peso relativo do tumor (HARANAKA et al. 1984), outros volume tumoral (GUTMAN et al. 1997) e outros a área do tumor ou o produto dos maiores diâmetros perpendiculares (BROUCKAERT et al. 1986; ASHER et al. 1987; KROSNICK et al. 1989) como foi o caso.

Na escolha das doses de MEL e TNF a serem adotadas neste estudo foram levadas em consideração dados da literatura (FURRER et al. 1997; GUTMAN et al. 1997) e os resultados dos ensaios descritos no anexo 2. Desta forma, a administração sistêmica, por via intravenosa, das doses de melfalano e TNF adotadas neste estudo para tratamento, a camundongos inoculados com células de melanoma mostrou-se factível e reprodutível nas doses padronizadas por apresentarem efeito sob o crescimento tumoral e não apresentarem toxicidade letal.

Verificamos uma redução da velocidade de crescimento tumoral nos grupos de animais tratados com melfalano, enquanto que o crescimento tumoral nos animais tratados com TNF isolado foi semelhante ao do grupo controle, tanto nos animais inoculados com a linhagem B16F10 (Figura 10), quanto com a linhagem B16F1 (Figura 13). Embora pareça existir uma diferença na velocidade de crescimento nos animais tratados com melfalano+TNF em relação aos tratados com melfalano isolado, não foi possível comprovar tal diferença estatisticamente, mesmo após agruparmos os dados referentes ao crescimento tumoral dos animais inoculados com a linhagem B16F10 e B16F1 (Figura 16).

Observamos aumento da sobrevida livre de eventos e livre de progressão nos animais inoculados com ambas as linhagens e tratados com melfalano ou melfalano+TNF, mas não naqueles tratados com salina ou TNF apenas (Figura 11, 12, 17 e 18). A concordância das curvas de sobrevida livre de eventos e livre de recorrência fala a favor da ausência de um aumento de mortalidade relacionado ao tratamento, ou seja, os decrementos nas curvas de sobrevida deveram-se na maior parte dos animais à progressão do tumor, e não morte por toxicidade.

A análise histológica dos tumores removidos dos animais inoculados com células de melanoma da linhagem B16F10 e B16F1 evidenciou um aumento da área total e relativa de necrose nos grupos tratados com TNF. Essa resposta parece não ser modificada pelo tratamento com melfalano (Tabela 1).

Todavia, o tratamento com melfalano induziu redução do número de mitoses total e mitoses por área do tumor. Embora, tenhamos visto um menor número de mitoses também nos animais tratados com TNF apenas, tal fato pode ser devido a uma maior área de necrose nestes tumores (Tabela 1).

Muito embora o TNF tenha produzido um aumento significativo da área de necrose nos tumores em relação aos grupos controle e MEL, isso não se traduziu em retardo do crescimento tumoral ou aumento da sobrevida livre de progressão. Essa discrepância deve-se possivelmente ao crescimento do tumor a partir das células remanescentes ao redor das áreas necróticas, uma vez que o TNF não parece apresentar um efeito citostático direto contra essas linhagens de melanoma, como descrito por ASHER et al. (1984). A impossibilidade, contudo, de quantificar a área de necrose no tumor que permanece no camundongo para acompanhamento do crescimento tumoral, pode mascarar um eventual efeito real do TNF sobre este parâmetro. No grupo que recebeu o melfalano concomitante não se observou tal recrescimento, pelo menos por um período mais longo, devido ao efeito citostático da droga.

Entretanto, no nosso estudo, não verificamos diferenças significativas entre os grupos quanto à área de hemorragia ou à densidade vascular (Tabelas 1 e 2). Contudo, isso pode ser resultado do pequeno intervalo de tempo entre a inoculação do TNF e a remoção dos tumores (3 horas), não tendo permitido um tempo de ação suficiente do TNF para observarmos um grau de desorganização estrutural tissular e inibição da neo-angiogênese/lesão endotelial a ponto de percebermos alterações significativas nestes parâmetros. Talvez, se tivéssemos feito coletas em tempos de exposição mais longos tais parâmetros fossem diferentes.

A análise conjunta de todos os parâmetros estudados sobre a resposta ao tratamento dos tumores, combinando os dados de crescimento tumoral, da sobrevida livre de recorrência e da área de necrose tumoral, mostra ser possível separar claramente, em termos de comportamento biológico, os quatro grupos de tratamento como resumido na no quadro abaixo:

<b>Grupos</b>	<b>Aumento de sobrevida livre de progressão</b>	<b>Retardo do crescimento tumoral</b>	<b>Necrose</b>
<b>Controle</b>	-	-	-
<b>Melfalano</b>	+	+	-
<b>TNF</b>	-	-	+
<b>Melfalano + TNF</b>	+	+	+

A análise dos parâmetros descritos acima parece corroborar os dados que apontam para uma ação primordial do TNF no microambiente tumoral, uma vez que os efeitos do mesmo são bem mais marcantes durante o tratamento *in vivo*, pouco modificando a resposta biológica ao melfalano *in vitro*.

O desenho experimental do braço *in vitro* deste projeto gera uma dificuldade, devido ao número reduzido de duplicatas biológicas, na análise estatística dos dados. Portanto, foi adotada uma abordagem alternativa para análise destes dados que foi o emprego da sobreposição dos MA-plots para identificação dos genes cujos valores de intensidade de expressão eram diferentes dos observados para o grupo tomado como referência (controle não tratado). Desta forma, vários genes foram identificados como sendo, aparentemente, regulados pelo tratamento com melfalano, TNF ou a combinação destas drogas *in vitro*, contudo entretanto não foi possível estimar o valor estatístico destas diferenças e, por isso, deve-se ter cautela na interpretação destes dados. Uma análise complexa e mais criteriosa será necessária antes de podermos

sugerir uma associação dos genes encontrados com a resposta observada aos tratamentos.

Apenas um gene foi comum entre aqueles identificados como diferencialmente expressos nas abordagens *in vitro* e *in vivo*: Aff1 (AF4/FMR2 family, member 1). O mesmo foi modulado positivamente por melfalano nas duas condições e na mesma linhagem tumoral (B16F10). Encontra-se descrito na literatura que o produto de Aff1 se liga ao promotor de CDKN1B e inibe a atividade do mesmo em células epiteliais, mas aumenta a expressão de p27 (produto de CDKN1B) em células linfóides, podendo desta forma aumentar ou inibir a proliferação celular, dependendo do tipo de célula (XIA et al. 2005). Seria interessante avaliar o que está acontecendo com a expressão de CDKN1B no nosso modelo, a fim termos uma correlação melhor com as repostas biológicas encontradas (maior citotoxicidade *in vitro* e retardo de crescimento tumoral *in vivo*).

Vários genes foram identificados como diferencialmente expressos em resposta aos tratamentos *in vivo*, e alguns destes genes apresentam funções reportadas na literatura indicativas de um papel biológico importante na tumorigênese e na mediação dos efeitos biológicos observados em resposta ao tratamento do melanoma com Melfalano e/ou TNF.

Dentre eles foram encontrados elementos envolvidos com adesão celular (Pecam1, Dlg5), apoptose (Bcl2111), regulação de citoesqueleto (Arhgef6, Palld, Kifap3, Kif1b), receptores de fatores de crescimento (Flt1), vias de transdução de sinal e ativação de fatores de transcrição (Pard3, Arhgef6, Ifi202b, Trp73, Trim24, Irak1bp1, Fabp4), regulação da tradução (Igf2bp3), regulação de vias de transdução de sinal (Sigirr, Ptprij, Rps6ka3), regulação do ciclo celular (Cdc7, Tacc2) e alguns

citados na literatura como relacionados ao metabolismo de drogas (Akr1b7) e potencial metatástico de tumores (Trpm1, Mib2).

Dentre os genes identificados à partir da comparação do grupo tratado com TNF contra o grupo controle, quatro genes regulados negativamente apresentavam razão de expressão  $\geq 1,5$  (Quadro 2): Ptpn22, Glul, Arhgef6 e Cckk.

Dez genes foram diferencialmente expressos entre o grupo tratado *in vivo* com TNF e o grupo controle, dentre estes, um gene foi negativamente regulado e apresentava razão de expressão  $\geq 2,0$ : Arhgef6 (Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor 6). Arhgef6 também foi modulado negativamente pelo tratamento combinado de TNF e MEL.

Arhgef6 (Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor 6), que codifica a proteína  $\alpha$ -PIX, é descrito na literatura como sendo um modulador positivo da atividade das proteínas G monoméricas (ligadoras de GTP) semelhantes à Rho: Rac1 e Cdc42. Arhgef6 ou  $\alpha$ -PIX age acelerando a troca de GDP por GTP nestas proteínas (guanine exchange factor – GEF), o que as tornam ativas. Estas por sua vez estão envolvidas em diversos processos celulares e vias metabólicas como remodelação do cito-esqueleto de actina, polarização celular, transcrição de genes, progressão do ciclo celular, dinâmica dos microtúbulos, e transporte de vesículas. A ativação de Rac1 e Cdc42, especificamente, está associada com a formação de filopódios, lamelipódios, rugosidades da membrana plasmática e contatos/complexos focais (complexos protéicos que ligam a matriz extracelular ao cito-esqueleto através das integrinas). A proteína foi descrita pela primeira vez em camundongos, como sendo uma proteína que se co-localizava com paxilina na periferia das células, posteriormente viu-se que  $\alpha$ -PIX é uma proteína ligadora de PAK (p21-activated kinase).  $\alpha$ -PIX apresenta seis domínios na sua estrutura, da região N-terminal para à COOH-terminal: homóloga à

calponina (CH), homóloga à SH3 (SH3) (domínio de interação com PAK), homóloga à dbl (DH), homóloga à pleckstrina (PH), um domínio de ligação à GIT1 (GBD) e um domínio do tipo “coiled-coil” (CC) (responsável por homo- e hétero-dimerização) (ROSENBERGER e KUTSCHE 2006).

A homo-dimerização de  $\alpha$ -PIX permite que esta proteína aja como um GEF específico para Rac-GDP, através da ação em *trans* dos domínios DH e PH. A forma monomérica necessita da interação, através do domínio SH3, com PAK ou Cbl (Casitas B-lymphoma), para agir como um GEF tanto para Rac-GDP ou Cdc42-GDP. A separação do dímero em monômeros necessita da interação de PAK com a subunidade  $\beta\gamma$  de proteínas G triméricas (FENG et al. 2004). Além disso,  $\alpha$ PIX pode ineragir com as formas ativas de Rac1 e Cdc42, sendo que a ligação de Cdc42-GTP (forma ativa) a  $\alpha$ -PIX aumenta a capacidade deste de se associar a Rac-GDP e estimular a sua ativação; enquanto que a ligação de  $\alpha$ -PIX a Rac-GTP inibe fortemente a atividade de GEF da sua forma dimérica (BAIRD et al. 2005).

$\alpha$ -PIX é capaz de ligar-se a PAK e ativá-lo, independentemente da interação simultânea com Cdc42, embora a ligação concomitante destes dois a fatores a PAK aumente a atividade deste último (DANIELS et al. 1999). Essa ativação de PAK, contudo depende da interação de PAK com GIT1 (G-protein-coupled receptor kinase-interacting target), e  $\alpha$ -PIX parece funcionar como uma proteína de sustentação e posicionamento (“scaffolding”) (ROSENBERGER e KUTSCHE 2006).

Existem evidências de que  $\alpha$ -PIX forma um complexo multiprotéico com PAK, GIT1, paxilina e p95-APP1 que se move entre a membrana plasmática (em áreas de ativação de Rac) e o compartimento de recirculação endocítico, sendo importante no processo de migração celular, mediando a formação de complexos de adesão focal nas frentes de protrusão celular (MATAFORA et al. 2001).



BIALKOWSKA et al. (2000) demonstraram que durante as fases iniciais do processo de adesão da célula à matriz extracelular são formados complexos contendo integrinas (“integrin clusters”) que contêm calpaína,  $\beta$ 3-integrina clivada por calpaína e uma proteína capaz de se ligar a Rac e ativá-lo, que foi identificada como sendo complexo Arhgef6/ $\alpha$ -PIX ligado à parvina.

A ligação de Arhgef6/ $\alpha$ -PIX à  $\beta$ -parvina (afixina) ocorre em lamelipódios e protrusões membranais de células CHO sobre fibronectina, por intermédio dos domínios CH e CC.  $\beta$ -parvina é uma proteína que está envolvida nos estágios iniciais de interação entre a célula e o substrato mediada por integrinas, e que sabidamente interage com ILK (integrin-linked kinase) durante este processo (ROSENBERGER et al. 2003).

FILIPENKO et al. (2005) mostraram, em células epiteliais mamárias, que ILK, uma proteína de adesão focal ativada por componentes da matriz extracelular e fatores de crescimento, é necessária para ativação de Rac e Cdc42 em células epiteliais, uma vez que modificações do local de expressão e da atividade de ILK se correlacionaram diretamente com a redistribuição do citoesqueleto de actina e da ativação de Rac e Cdc42, modulando a capacidade de invasão e migração das mesmas, e que este processo é mediado por  $\alpha$ -PIX e  $\beta$ -parvina.

Existem dados mostrando que  $\alpha$ -PIX pode ser ativado por PDGFR (platelet-derived growth factor receptor), EphB2R (ephrin B2 receptor) e via integrina formando um complexo com estes receptores através da associação com PAK e NcK ou associando-se diretamente à subunidade regulatória p85 de PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase), aumentando a atividade migratória de células mesodérmicas de *X. Levis* (YOSHII et al. 1999).

Rac1 e Cdc42, juntamente com RhoA, estão envolvidos na retração celular com formação de “gaps” intercelulares, formação de filopódios, protrusões membranais e fibras de estresse de actina e dispersão de VE-caderina das junções intercelulares de células HUVEC após tratamento com TNF (WÓJCIAK-STOTHARD et al. 1998).

A inibição de Rac1 está associada com inibição da ativação de NF- $\kappa$ B, aumento da atividade de caspase-3 e aumento significativo da susceptibilidade à apoptose em células endoteliais de cordão umbilical (HUVECS) tratadas com TNF (DESHPANDE et al. 2000).

Cdc42 e Rac1 estão envolvidos na formação de vacúolos e de lúmens em células endoteliais crescendo em modelos artificiais de matriz extracelular tridimensional. Cdc42 parece ser necessário para iniciar o processo de formação de lúmens vasculares em matrizes de colágeno ou fibrina, enquanto Rac1 parece ser mais importante em fases mais tardias para manutenção da integridade dos lúmens formados (BAYLESS e DAVIS 2002).

A ativação de NF- $\kappa$ B por TNF é mediada por RhoA e Cdc42, através de um mecanismo que envolve fosforilação de I $\kappa$ B e a translocação de p50/p50 e p50/p65 para o núcleo, mas independente de Ras e Raf-quinase, uma vez que mutantes dominantes-negativos de RhoA e Cdc42 inibem drasticamente a ativação de NF- $\kappa$ B por TNF, o mesmo não se observando com o emprego dos mutantes dominantes-negativos de Ras e Raf-quinase (PERONA et al. 1997).

Conjuntamente, estes dados podem sugerir que a inibição da expressão de Arhgef6 observada no grupo tratado com TNF ou melfalano+TNF, pode levar a uma redução dos níveis de  $\alpha$ -PIX, conseqüentemente interferindo diretamente em processos de adesão focal mediada por integrinas e impedindo a ativação de Rac1 e

Cdc42, levando a incapacidade de ativação NF- $\kappa$ B (um importante fator de sobrevivência celular e provável responsável pela inibição da apoptose mediada por TNF), interferindo no processo de neo-angiogênese, promovendo remodelação do endotélio com aumento de permeabilidade e exposição da membrana basal (com resultante aumento de processos trombo-embólicos) e aumentando a susceptibilidade do endotélio à apoptose mediada pelo próprio TNF e, talvez, pelo melfalano. Paralelamente, o fato da modulação do gene ter ocorrido na mesma direção (“down-regulation”) nos grupos tratados com TNF e melfalano+TNF sugere que este gene está tendo sua expressão modulada por TNF. Como só observamos modulação da expressão de Arhgef6 em amostras de tumores tratados *in vivo*, e não nas células tratadas *in vitro*, e o TNF *in vitro* não apresentou citotoxicidade contra a linhagem empregada, provavelmente não é a célula do melanoma que está sofrendo esta modulação, e sim alguma célula do estroma, endotélio ou do sangue (embora não possa ser descartada a hipótese da célula do melanoma possa ter-se tornado sensível mediante interação com alguma destas células ou algum produto por elas secretadas no micro-ambiente tumoral). RUEGG et al. (1998) mostraram que o tratamento de células HUVEC com TNF e IFN promoveu a diminuição da adesão mediada pela integrina  $\alpha$ V $\beta$ 3 (colágeno desnaturado, vitronectina e fibrinogênio), uma integrina que expressa em células endoteliais da vasculatura do tumor, mas não pela integrina  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 (fibronectina), sem contudo diminuir a expressão destas integrinas na superfície da célula. Este dado está em concordância com evidências que mostram que  $\alpha$ -PIX está envolvido na iniciação dos processos focais, em associação com  $\beta$ -integrina clivada,  $\beta$ -parvina, ILK e calpaína (BIALKOWSKA et al. 2000; ROSENBERGER et al. 2003), e manutenção e sinalização através de adesões focais (MATAFORA et al. 2001; FILIPENKO et al. 2005).

Da comparação *in vivo* entre o grupo tratado com melfalano e o grupo controle foram encontrados 20 genes diferencialmente expressos. Pard3 (partitioning defective 3 homolog) sofreu regulação negativa neste grupo com um “fold” maior que 2,0.

Pard3 codifica a proteína Par3 que foi descrita pela primeira vez, juntamente com outras proteínas do grupo, durante um “screening” genético de mutações capazes de desorganizar a polarização de zigotos de *C. elegans*. Vários estudos mostraram que Par3 forma um complexo com Par6 e aPKC (atypical protein kinase), com recrutamento de proteínas G monoméricas (Cdc42, Rac, TC10) através do domínio CRIB/PDZ de Par6 e subsequente ativação de aPKC, regulando o estabelecimento e a manutenção da polarização celular (HURDe MARGOLIS 2005).

O complexo Par3/Par6/aPKC se localiza nas “tight junctions” e é essencial para formação destas. EBNET et al. (2003) demonstraram que Par3 se liga diretamente a JAM (junctional adhesion molecule) 2 e 3, proteínas da superfamília das imunoglobulinas, através do primeiro domínio PDZ. ZO-1, sua vez, se liga a JAM2/3 por intermédio também de um domínio PDZ. Quando JAM2/3 é expresso ectopicamente em células CHO, ela se localiza nas junções intercelulares e recruta Par3 e ZO-1. A fosforilação de JAM por serina-quinases inibe a localização de JAM2/3 nas áreas de contato célula-célula.

Em células endoteliais Par3 é capaz de se ligar diretamente à VE-caderina e tardiamente recrutar Par6, mas não aPKC, em áreas de contato célula-célula. Este tipo de interação nas células endoteliais permite que existam domínios de membrana onde estão misturadas proteínas associadas com “tight junctions” e “adherens junctions”, normalmente separadas em células epiteliais (IDEN et al. 2006).

Foi demonstrado também em células endoteliais que a perda da expressão de Par3 interrompe a formação das “tight junctions” e que Par3 é capaz de inibir a atividade de Rac através do seqüestro ou inibição de Tiam1, uma GEF específica para Rac (CHEN e MACARA 2005).

Recentemente foi demonstrado que Par3 pode associar-se com as proteínas Ku70 e Ku80 que são as sub-unidades regulatórias da proteína-quinase DNA-dependente (DNA-PK) a qual desempenha um papel fundamental no reparo de quebras de fitas duplas de DNA. O “knock-down” de Par3 em células HeLa esteve associado com uma menor atividade de DNA-PK, maior susceptibilidade à irradiação, reparo deficiente de quebras de DNA e diminuição da integração randômica de plasmídeos (FANG et al. 2007).

No nosso modelo, não é possível inferir com clareza qual a célula que está tendo a expressão de Par3 modulada positivamente pelo melfalano, uma vez que observamos modificação da expressão *in vitro* do gene no grupo tratado com MEL na mesma direção da observada *in vivo*, em comparação ao grupo controle, no “scatter-plot” (Anexo 4). Isso poderia se refletir, por exemplo, numa alteração de permeabilidade do endotélio, permitindo o acesso de doses maiores do melfalano ao tumor o que se correlacionaria com uma maior atividade tumoricida como observado neste grupo de tratamento. Entretanto, face à informação de que esta proteína pode estar associada com uma menor capacidade da célula de promover reparos a danos no DNA (mecanismo de ação primordial do melfalano), seria interessante observar o comportamento dela numa cinética de exposição à droga em questão.

O tratamento combinado de Melfalano+TNF foi o que mais impacto teve sobre a modulação de genes, tendo sido encontrados 59 genes diferencialmente expressos. Destes genes, 3 genes positivamente regulados com razão de expressão  $\geq$

2,0 foram identificados: Ifi202b (interferon activated gene 202B), Zc3hav1 (Zinc finger CCCH type, antiviral 1) e Igfbp3 (insulin growth factor binding-protein 3). Foram também identificados seis genes com razão de expressão  $\geq 2,0$  e que foram modulados negativamente pelo tratamento combinado em comparação com as amostras do grupo controle: Glul (glutamate-ammonia ligase), Arhgef6, Flt1 (FMS-like tyrosine kinase 1), Aph1c (anterior pharynx defective 1b homolog), Art5 (ADP-ribosyltransferase 5) e Cck (cholekytokinin).

Ifi202 é uma proteína induzida por exposição a interferon. Já foi demonstrado que o produto de Ifi202 inibe a atividade de NF- $\kappa$ B e de AP-1, e que ele pode ligar-se a p50, p65, c-jun e c-fos (MIN et al. 1996).

WEN et al. (2000) mostraram uma diminuição da tumorigenicidade de células de carcinoma mamário transfectadas com Ifi202, bem como da capacidade proliferativa das mesmas *in vitro*. Além disso, a indução da expressão de Ifi202 pelas células tumorais tornou-as sensíveis à apoptose medida por TNF. O mesmo grupo de pesquisadores também verificou inibição de crescimento tumoral, redução de tumorigenicidade, aumento de sobrevida e supressão de metástases e angiogênese em modelos de xeno-enxertos ectópicos e ortotópicos em camundongos “nude” de tumores pancreáticos humanos transfectados com Ifi202 em lipossomas. Foi visto também, uma menor capacidade de invasão destas células *in vitro*, e os tumores apresentaram uma menor expressão de citocinas pró-angiogênicas (IL-8 e VEGF) e de metaloproteinase 2 (WEN et al. 2001).

Ifi202a inibe a ligação do homodímero p65/p65 e do heterodímero p50/p65 ao DNA *in vivo* e *in vitro*, e aumenta a ligação do homodímero p50/p50, desta maneira ele impede a atividade de NF- $\kappa$ B pela inibição dos dímeros transcricionalmente ativos e pelo aumento da afinidade do homodímero inativo pelo DNA. Foi mostrado por Ma

e colaboradores que células 3T3 transfectadas com Ifi202 apresentaram maior susceptibilidade à apoptose quando expostas ao TNF (MA et al. 2003).

A expressão de Ifi202 é regulada por Rb/JunD e os níveis de Ifi202 são significativamente menores em culturas de fibroblastos murinos (MEFs) Rb<sup>-/-</sup> e JunD<sup>-/-</sup>. A expressão aumentada de Ifi202 por sua vez, aumenta a inibição de proliferação imposta por Rb, ação que é abolida por mutações no sítio de ligação de Rb (XIN et al. 2003).

Dados de crescimento tumoral e a análise histológica dos tumores no grupo tratado com a combinação de melfalano e TNF estão de acordo com os efeitos descritos de Ifi202 sobre os tumores. Como o mecanismo principal de ação de Ifi202 parece ser a inibição da atividade de NF- $\kappa$ B, drogas que possam inibir a ativação de NF- $\kappa$ B, como bortezomib, devem aumentar a eficácia do tratamento com TNF, ou até mimetizar parte dos efeitos sobre o tumor.

Igf2bp3 codifica para a proteína IMP3 que faz parte de uma família que se caracteriza por apresentar 6 domínios de ligação ao RNA, sendo dois domínios de reconhecimento de motivos e quatro domínios de homologia à ribonucleoproteína heterogênea nuclear K. Células de leucemia K562 expressando RNA de interferência para Igf2bp3 apresentaram menor secreção de IGF-II e marcada redução da proliferação. (LIAO et al. 2005).

JIANG et al. (2006) avaliaram 501 pacientes com carcinoma renal, dos quais 371 apresentavam doença localizada (não-metastática). A expressão de IMP-3, avaliada por imuno-histoquímica foi mais elevada nos tumores metastáticos. Em tumores localizados a expressão elevada de IMP-3 esteve associada com uma menor sobrevida global e menor sobrevida livre de metástases, e a análise multivariada mostrou que este evento tratava-se de um fator prognóstico independente.

Embora o aumento da expressão de Igf2bp3 provavelmente confira uma vantagem proliferativa, ao mesmo tempo deixa as células tumorais mais susceptíveis aos efeitos de uma droga citotóxica como o melfalano, dentro de um cenário que favorecesse a apoptose desencadeada por dano genotóxico, isso poderia se correlacionar com uma maior atividade da combinação do melfalano ao TNF. Interessantemente, contudo, nas células tratadas *in vitro* parece haver uma redução da expressão deste gene no grupo que recebeu melfalano em relação ao grupo controle (Anexo 4).

Cck (colecistocinina) é um dos agonistas dos receptores de gastrina e colecistocinina: CCK<sub>A</sub>, CCK<sub>B</sub> e CCK<sub>C</sub>. MATHIEU et al. (2005) demonstraram a expressão de do RNAm do receptor CCK<sub>C</sub> em linhagens de melanoma humano (HT-144, C32, G-361 e SK-MEL28) e em amostras de metástases de melanoma, enquanto o RNAm de CCK<sub>A</sub> não foi expresso por nenhuma linhagem ou amostra de tumor e o de CCK<sub>B</sub> esteve expresso em apenas uma amostra de metástase de melanoma. Verificaram também que a exposição à gastrina (um peptídeo estruturalmente semelhante à colecitocinina) foi capaz de inibir a motilidade das linhagens HT-144 e C32, e que houve redução da expressão da integrina  $\alpha V\beta 3$  pela linhagem HT-144, bem como redução da capacidade invasiva em camada de Matrigel, mediada pela menor expressão de MMP-14 (metaloproteinase-14), após tratamento com gastrina. No estudo conduzido por MATHIEU et al. (2005), foi visto que o tratamento crônico (2 meses) de xeno-enxertos da linhagem C32 em camundongos nude com o antagonista do receptor CCK<sub>B</sub> (L-365,260) por via intraperitoneal reduziu de forma significativa a neo-angiogênese destes tumores.

O tratamento de linhagens de tumor de pâncreas (SNU-308) e de vias biliares (SNU-478) *in vitro* com colecistocinina promoveu a proliferação destas células efeito



que foi completamente abolido pela administração concomitante do antagonista específico (L-368,718) (JANG et al. 2005). Foi visto também que a administração de gastrina é capaz de suprimir o efeito inibitório de PPAR $\gamma$ , aumentando a degradação do mesmo, sobre a proliferação de células de tumor de cólon, num processo que envolve a fosforilação de ERK1/2 e a ativação de EGFR (epidermal growth factor receptor) (CHANG et al. 2006). Recentemente, observou-se que a inibição da expressão de colecistocinina em linhagens de tumores de Ewing, através do emprego de um RNA de interferência, reduziu a secreção de colecistocinina por essas células, promovendo redução do crescimento de tumores obtidos pela inoculação de células destas linhagens e da proliferação das células *in vitro*, inibição que era revertida quando as células eram cultivadas na presença de colecistocinina, sugerindo uma atividade da mesma como fator de crescimento autócrino (CARRILLO et al. 2007).

Destarte, a inibição da expressão de Cck, provavelmente mediada por TNF no nosso modelo, pode estar participando da inibição da proliferação das células do tumor (ou modificando suas características de motilidade e invasão) ou colaborando para inibição do processo de neo-angiogênese, agindo sobre o endotélio tumoral.

Embora não tenha apresentado p significativo em nenhuma das comparações com o grupo controle, Fabp4 apresentou modulação da sua expressão de forma importante quando avaliada pelos “folds” em todos os grupos tratamento, sendo aparentemente inibido por TNF (TNF e melfalano+TNF) e estimulado por melfalano isolado, o que também parece sugerir o resultado da comparação entre o grupo tratado pela combinação das drogas com o grupo tratado apenas por MEL que gera um “fold” de -22,18 e p=0,02.

Fabp4 faz parte de um grupo de 9 proteínas pequenas com capacidade de se ligar a compostos lipofílicos e está envolvida na diferenciação de adipócitos,

homeostase da glicose, inflamação e atividade antiproliferativa contra vários tipos de carcinoma. Foi demonstrado que, embora não apresente em sua estrutura primária um sinal de localização nuclear (NLS) nem de exportação nuclear (NES), após interação com seus ligantes, a estrutura tridimensional aproxima três resíduos básicos que funcionam como NSL e três resíduos de leucina que agem como NES. Esta estrutura possibilita a translocação da proteína para o núcleo, onde ela interage especificamente com PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) que, por sua vez, é capaz de ligar-se a vários ácidos graxos de cadeia longa, eicosanóides e tiazolidinedionas, ativando a atividade transcricional daquele (AYERS et al. 2007). Logo a modulação da expressão de Fabp4 poderia ter um efeito direto sobre a atividade de PPAR $\gamma$ , aumentando a atividade do mesmo ao estar super-expresso e diminuindo a mesma quando está com a expressão reduzida.

PLACHA et al. (2003) verificaram inibição da proliferação de duas linhagens de melanoma (WM35 e A375) *in vitro* após tratamento com um agonista específico (ciglitazona) de PPAR $\gamma$ .

PPAR $\gamma$  é altamente expresso no endotélio tumoral e o tratamento de camundongos inoculados com células de uma linhagem de câncer de pulmão de células não-pequenas (A549) com troglitazona e pioglitazona, agonistas de PPAR $\gamma$ , foi capaz de promover redução do crescimento tumoral e da densidade vascular dos tumores. A transdução de células desta linhagem tumoral com uma forma constitutivamente ativa de PPAR $\gamma$  bloqueou a síntese de quimiocinas pró-angiogênicas (CXCL8, CXCL5 e CXCL1) e inibiu a atividade transcricional de NF- $\kappa$ B (KESHAMOUNI et al. 2005). Outros grupos também demonstraram que a administração de agonistas de PPAR $\gamma$  pode inibir o crescimento, a neo-angiogênese

tumoral e reduzir o potencial metastático de tumores (PANIGRAHY et al. 2002, 2005).

A administração de um agonista de PPAR $\gamma$  concomitante ao melfalano poderia constituir uma eventual estratégia para aumentar o efeito tumoricida do melfalano na ILP, reduzindo a necessidade do TNF e, conseqüentemente, a toxicidade do tratamento. Ao mesmo tempo, um agonista de PPAR $\gamma$  fornecido junto com o TNF poderia minimizar algum efeito deletério desta droga, considerando que o TNF parece inibir a expressão de PPAR $\gamma$ , e potencializar a eficiência do tratamento combinado melfalano+TNF.

Flt1 codifica o receptor 1 de VEGF (VEGFR1). São ligantes deste receptor VEGFA, VEGFB e PlGF. A função precisa de VEGFR1 na angiogênese e hematopoiese permanece obscura, tendo sido sugerida inicialmente uma regulação negativa da atividade de VEGF, funcionando como um receptor falso (“decoy receptor”) ou suprimindo a sinalização através de VEGFR2. No entanto, foi verificado um motivo repressor justa-membranal capaz de inibir a sinalização mediada por PI3K e a migração celular. Em algumas células parece ter um papel funcional positivo participando da migração de macrófagos, recrutamento de progenitores de células endoteliais, aumento das propriedades adesivas de células NK e induzindo a produção de fatores de crescimento pelas células dos sinusóides hepáticos. Além disso, vários estudos têm apontado um papel de VEGFR1 como um potente regulador positivo da angiogênese durante a tumorigênese (HICKLIN e ELLIS 2005).

STRAUME e ASKLEN (2001) demonstraram uma associação entre a expressão de Flt1 e de VEGF em amostras de melanoma em crescimento vertical. Observaram também a correlação positiva entre Flt1 e de p16 nuclear (proteína com

atividade supressora sobre ciclina D e, portanto, capaz de regular a progressão do ciclo celular). A presença de proliferações microvasculares glomerulóides (GMPs), brotamentos proliferativos focais de células endoteliais que lembram um glomérulo renal, está associado com um pior prognóstico em melanomas. Foi visto uma associação positiva da expressão de VEGFA, KDR, Flt1 e neuropilina-1 e na formação de GMPs em melanomas em fase de crescimento vertical (STRAUME e AKSLEN 2003).

Flt1 apresenta uma afinidade cerca de 10 vezes maior pela ligação com VEGF, contudo uma atividade de tirosina-quinase muito menor. No entanto, sob condições patológicas onde exista um aumento da expressão de PlGF, seu ligante específico, Flt1 poderia ter um papel significativo na promoção da neo-angiogênese. A co-expressão de PlGF e Flt1 em células de carcinoma de pulmão murino da linhagem Lewis, promoveu um crescimento tumoral muito mais rápido do que o observado em tumores obtidos a partir de células nas quais foi co-transfectado uma proteína Flt1 deficiente para atividade de tirosina-quinase. Do mesmo modo, a formação de vasos sanguíneos intratumorais foi muito maior em camundongos do tipo selvagem, do que naqueles expressando uma Flt1 deficiente para atividade de tirosina-quinase. Por outro lado, os tumores induzidos tanto nos camundongos nocaute, quanto nos do tipo selvagem, pela inoculação de células do tumor super-expressando VEGF, não apresentaram diferenças de crescimento (HIRATSUKA et al. 2001).

PATTERSON et al. (1996) já haviam demonstrado que TNF é capaz de bloquear a síntese de DNA induzida por VEGF em células endoteliais humanas. O tratamento de células endoteliais venosas e arteriais *in vitro* com 1ng/ml de TNF foi capaz de reduzir a expressão dos RNAm de FLT1 e KDR (VEGFR2) em cerca de

70% após 24h de exposição, bem como uma reduzir cerca de 18% a expressão das respectivas proteínas, quando avaliada por imunoprecipitação.

Um grupo de pesquisadores mostrou que VEGFR1 (flt1) é capaz de inibir o efeito sobre a proliferação celular, mas não sobre a migração, promovido sobre células HUVEC após a ligação de VEGF ao receptor VEGFR2. Esta inibição parece ser mediada, pelo menos em parte, através de PI3K, já que a administração de inibidores de PI3K ou a expressão do mutante dominante-negativo de p85 (a sub-unidade regulatória), abolia o efeito inibitório de Flt1, enquanto que a super-expressão da sub-unidade p110 de PI3K mimetiza o efeito de Flt1 (ZENG et al. 2001).

O mesmo grupo de pesquisadores verificou que o efeito anti-proliferativo promovido por Flt1 em HUVEC é completamente abolido por um mutante negativo de Cdc42 e parcialmente pelo mutante negativo de Rac, estes contudo não afetam a fosforilação de KDR ou MAPK. A ligação de VEGF a Flt1 é capaz de ativar Cdc42 e Rac, ativação que é totalmente abolida com a inibição de PI3K através de inibidores específicos (wortmanina e LY294002) ou do mutante dominante-negativo da sub-unidade p85, mas não pela inibição de fosfolipase C por BAPTA/AM. Além disso, a administração de toxina diftérica e a super-expressão de h $\beta$ ARK1, um minigene seqüestrador de G $\beta$  $\gamma$ , também inibiu completamente a ativação de Cdc42 e Rac mediada por Flt1 (ZENG et al. 2002).

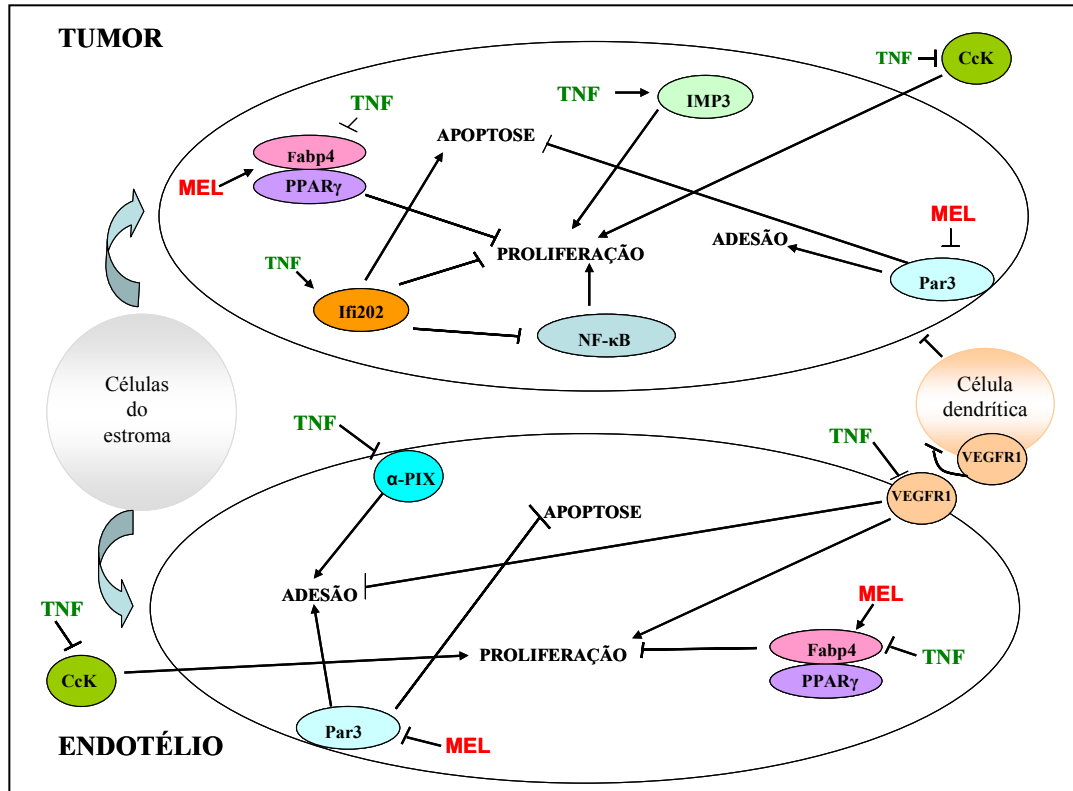
A ligação de PlGF a VEGFR1 num sistema com células dendríticas nocaute para VEGFR2 é capaz de inibir a maturação destas células e bloquear a ativação de NF- $\kappa$ B em células hematopoiéticas da medula óssea. Este efeito não é completamente revertido pelo inibidor da tirosina-quinase associada ao receptor de VEGF, SU5416.

Tal dado sugere um potencial efeito imunossupressor de VEGF em pacientes com câncer, mediado através de VEGFR1 (DIKOV et al. 2005).

GILLE et al. (2007) mostraram, em modelos de crescimento de tumores em subcutâneo e de colonização pulmonar com a linhagem de melanoma murino B16 (que não expressa os receptores VEGFR1 e VEGFR2), que é necessário o bloqueio simultâneo de VEGFR1 e VEGFR2 para inibição do crescimento tumoral e da formação de metástases pulmonares. Interessantemente, a inibição de Flt1 promoveu uma redução dramática do infiltrado tumoral por células inflamatórias CD45 positivas.

Desta maneira, a diminuição da expressão de Flt1 em tumores tratados com TNF poderia estar associado com uma menor atividade proliferativa do endotélio tumoral e decorrente diminuição do crescimento tumoral (observa-se um discreto retardo do crescimento tumoral também nos tumores tratados com TNF apenas, embora não tenha sido estatisticamente diferente em relação ao controle), principalmente quando combinado ao efeito genotóxico do melfalano. Essa inibição poderia também explicar, em parte, a ocorrência de respostas tardias em pacientes tratados com ILP contendo TNF e melfalano, baseado na liberação do efeito supressivo de Flt1 sobre células dendríticas e uma eventual apresentação de antígenos tumorais mais eficiente, permitindo uma resposta anti-tumoral imune adaptativa de longa duração.

Quando avaliados conjuntamente, os dados acima permitem a proposição de um modelo teórico da ação destas drogas sobre o melanoma como demonstrado na figura abaixo (Figura36).



**Legenda:** Esquema com os principais genes modulados *in vivo* pelos tratamentos com TNF e melfalano e sua interação com processos celulares básicos envolvidos nos eventos biológicos observados com os tratamentos, bem como as possíveis células-alvo. As setas indicam estimulação e a linha barrada, inibição.

**Figura 36** – Diagrama das possíveis interações entre as células do modelo *in vivo*, tratamentos administrados e genes modulados.

## 7 CONCLUSÕES

- O tratamento *in vitro* com melfalano esteve associado com aumento de citotoxicidade nas linhagens de melanoma B16F1 e B16F10, sendo mais evidente 48 horas após o tratamento;
- O tratamento *in vitro* com TNF não aumentou a citotoxicidade nas linhagens empregadas;
- O tratamento *in vivo* com melfalano, na dose e via de administração empregada neste estudo, promoveu retardo de crescimento tumoral, redução do número de mitoses nos tumores tratados e aumento de sobrevida dos animais;
- O tratamento *in vivo* com TNF, na dose e via de administração empregada neste estudo, promoveu aumento da área de necrose dos tumores tratados, mas não esteve associado com aumento de sobrevida ou retardo de crescimento tumoral;
- O tratamento *in vivo* com melfalano+TNF, nas doses e via de administração empregada neste estudo, promoveu retardo de crescimento tumoral, redução do número de mitoses e aumento da área de necrose nos tumores tratados, bem como aumento de sobrevida dos animais, sendo que, no nosso modelo, aparentemente, a adição de TNF induziu apenas aumento da área de necrose, sem alteração dos demais parâmetros, quando comparado ao grupo tratado com melfalano apenas;
- Não foi observada alteração de densidade vascular ou número de vasos neoformados com o marcador empregado (CD34) no tempo de 3 horas após os



tratamentos, embora pareça existir alterações estruturais importantes do endotélio;

- O tratamento *in vitro* com MEL e TNF parece ter um grande impacto sobre o perfil dos genes expressos nas células de melanoma, já que muitos genes com intensidade de expressão alterada em relação as células não tratadas foram detectados;
- O gene *Aff1* foi aparentemente modulado positivamente por MEL nas células em cultura e também no tumor. Como este gene codifica uma proteína envolvida com a proliferação celular, sua modulação pode ser um dos eventos relacionados á atividade anti-tumoral;
- O tratamento *in vivo* com MEL e TNF causou grande alteração no padrão de expressão de genes nos tumores, tendo sido encontrados 20 genes diferencialmente expressos em resposta ao melfalano, 10 ao TNF e 59 à combinação das duas drogas, dos quais 9 genes apresentaram razão de intensidade  $\geq 2,0$ ;
- Dentre os genes diferencialmente expressos em resposta ao tratamento com MEL, TNF ou ambos, estão elementos envolvidos em adesão celular, apoptose, regulação de citoesqueleto, receptores de fatores de crescimento, vias de transdução de sinal e ativação de fatores de transcrição, regulação da tradução, regulação de vias de transdução de sinal, regulação do ciclo celular e alguns citados na literatura como relacionados ao metabolismo de drogas e potencial metatástico de tumores;
- O tratamento do melanoma com TNF (sozinho ou associado a MEL) leva à modulação negativa do gene *Arhgef6* em alvos celulares diferentes da célula do melanoma, provavelmente nas células endoteliais, e pode ser um dos

importantes aspectos da ação de TNF, uma vez que a proteína codificada por este gene ( $\alpha$ -PIX) está envolvida na regulação de adesão celular mediada por integrinas e na ativação de Cdc42 e Rac. Paralelamente, como só observamos modulação da expressão de Arhgef6 em amostras de tumores tratados *in vivo*, e não nas células tratadas *in vitro*, e o TNF *in vitro* não apresentou citotoxicidade contra a linhagem empregada, provavelmente não é a célula do melanoma que está sofrendo esta modulação, e sim alguma célula do estroma, endotélio ou do sangue (embora a célula do melanoma possa ter-se tornado sensível mediante interação com alguma destas células ou algum produto por elas secretadas no micro-ambiente tumoral);

- O melfalano promoveu a diminuição da expressão de Par3 num tipo celular que, provavelmente, não é a célula do melanoma, já que não vemos modificação significativa da expressão desse gene *in vitro* e esta alteração pode ser um dos mediadores da modificação de permeabilidade do endotélio, que permite o acesso de doses maiores do melfalano ao tumor e poderia estar correlacionada com um maior retardo do crescimento tumoral como observado no grupo tratado com MEL;
- A inibição da expressão de Cck, provavelmente mediada por TNF no nosso modelo, pode participar da inibição da proliferação das células do tumor (ou modificando suas características de motilidade e invasão) ou colaborar para inibição do processo de neo-angiogênese, agindo sobre o endotélio tumoral;
- Ifi202 deve aumentar a susceptibilidade dos tumores à apoptose desencadeada pelo melfalano e pelo TNF a partir da inibição de NF- $\kappa$ B, correlacionando-se com a maior atividade anti-tumoral observada no grupo do tratamento combinado;

- O aumento da expressão de Igf2bp3 mediado por TNF pode ser um dos fatores que tornam as células tumorais mais susceptíveis aos efeitos de citotóxicos do melfalano, por estimular a proliferação celular, dentro de um cenário que favorecesse a apoptose desencadeada por dano genotóxico, isso poderia se correlacionar com uma maior atividade da combinação melfalano+TNF;
- A diminuição da expressão de Flt1 encontrada nos tumores tratados com TNF pode estar associada a menor atividade proliferativa do endotélio tumoral e decorrente diminuição do crescimento tumoral, principalmente quando combinado ao efeito genotóxico do melfalano; além disso, a inibição de VEGFR1 poderia também explicar a ocorrência de respostas tardias em pacientes tratados com ILP contendo TNF e melfalano, baseado na liberação do efeito supressivo de Flt1 sobre células dendríticas e uma eventual apresentação de antígenos tumorais mais eficiente, permitindo uma resposta anti-tumoral imune adaptativa de longa duração.

## 8 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos com este trabalho suscitam a elaboração de muitas hipóteses sobre os alvos e o mecanismo de ação do melfalano e TNF sobre o melanoma, abrindo portanto perspectivas para a investigação do papel de vários dos genes aqui identificados tanto na biologia do melanoma, quanto na resposta deste tipo de tumor ao tratamento com MEL e TNF.

Dentre estas possibilidades de investigação está a realização de cinéticas de expressão gênica a fim de observar o comportamento dos genes identificados neste estudo ao longo de tempos diferentes de exposição ao melfalano e TNF, bem como avaliação da modificação dos níveis celulares das proteínas por eles codificadas ou com as quais interagem.

Por análise imuno-histoquímica dos produtos dos genes referidos poderia ser avaliada a mudança do padrão de expressão dos mesmos, e identificadas quais as células no contexto tumoral estão sendo responsáveis por estas modificações.

Seria importante também de avaliar a presença de substâncias secretadas no meio de cultura de células de melanoma capazes de modificarem a resposta de células endoteliais ao tratamento com TNF e melfalano e vice-versa, ou a expressão dos genes supracitados. A realização de ensaios empregando culturas organotípicas, com células endoteliais, células de melanoma, macrófagos e fibroblastos em combinações diferentes, é outra abordagem que permitiria a análise da interação dos componentes do tumor e a observação das alterações fenotípicas das células em resposta aos tratamentos com TNF e melfalano e alterações no padrão dos genes identificados neste estudo.

Outra estratégia seria o uso de drogas, com a capacidade de interferir nas vias de VEGFR1 (sunitinib), PPAR $\gamma$  (rosiglitazona) e Ifi202 (bortezomib), identificadas como alteradas pelos tratamentos na busca de a combinação das mesmas entre si ou em associação com quimioterápicos ou TNF em modelos pré-clínicos e eventualmente, clínicos.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aggarwal BB, Samanta A, Feldmann M. TNF receptors. In: Oppenheim JJ, Feldmann M, editors. **Cytokine reference: a compendium of cytokines and other mediators of host defense**. San Diego: Academic Press; 2001. p.1619-37.

Asher A, Mule JJ, Reichert CM, Shiloni E, Rosenberg SA. Studies on the anti-tumor efficacy of systemically administered recombinant tumor necrosis factor against several murine tumors in vivo. **J Immunol** 1987; 138(3):963-74.

Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. **N Engl J Med** 1996; 335:91-7.

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

Baird D, Feng Q, Cerione RA. The Cool-2/alpha-Pix protein mediates a Cdc42-Rac signaling cascade. **Curr Biol** 2005; 15:1-10.

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** 2001; 19:3635-48.

Bauer GB, Povirk LF. Specificity and kinetics of interstrand and intrastrand bifunctional alkylation by nitrogen mustards at a G-G-C sequence. **Nucleic Acids Res** 1997; 25:1211-8.

Bauer TW, Gutierrez M, Dudrick DJ, Li J, Blair IA, Menon C, Fraker DL. A human melanoma xenograft in a nude rat responds to isolated limb perfusion with TNF plus melphalan. **Surgery** 2003; 133:420-8.

Bayless KJ, Davis GE. The Cdc42 and Rac1 GTPases are required for capillary lumen formation in three-dimensional extracellular matrices. **J Cell Sci** 2002; 115:1123-36.

Bialkowska K, Kulkarni S, Du X, Goll DE, Saido TC, Fox JE. Evidence that beta3 integrin-induced Rac activation involves the calpain-dependent formation of integrin clusters that are distinct from the focal complexes and focal adhesions that form as Rac and RhoA become active. **J Cell Biol** 2000; 151:685-96.

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

Brouckaert PG, Leroux-Roels GG, Guisez Y, Tavernier J, Fiers W. In vivo anti-tumour activity of recombinant human and murine TNF, alone and in combination with murine IFN-gamma, on a syngeneic murine melanoma. **Int J Cancer** 1986; 38:763-9.

Calabresi P, Chabner BA. Chemotherapy of neoplastic diseases. In: Hardman JG, Limbird LE, editors. **The pharmacological basics of therapeutics**. 9<sup>th</sup> ed. New York McGraw-Hill, 1996. p.1225-33.

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

Carrillo J, Garcia-Aragoncillo E, Azorin D, et al. Cholecystokinin down-regulation by RNA interference impairs Ewing tumor growth. **Clin Cancer Res** 2007; 13:2429-40.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1975; 72:3666-70.

Chang AJ, Song DH, Wolfe MM. Attenuation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) mediates gastrin-stimulated colorectal cancer cell proliferation. **J Biol Chem** 2006; 281:14700-10.

Chapman PB, Lester TJ, Casper ES, et al. Clinical pharmacology of recombinant human tumor necrosis factor in patients with advanced cancer. **J Clin Oncol** 1987; 5:1942-51.

Chen X, Macara IG. Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. **Nat Cell Biol** 2005; 7:262-9.

Church GM, Gilbert W. Genomic sequencing. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1984; 81:1991-5.

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

Creech O Jr, Krementz ET, Ryan RF, Winblad JN. Chemotherapy of cancer: regional perfusion utilizing an extracorporeal circuit. **Ann Surg** 1958; 148:616-32.

Curnis F, Sacchi A, Corti A. Improving chemotherapeutic drug penetration in tumors by vascular targeting and barrier alteration. **J Clin Invest** 2002; 110:475-82.

Daniels RH, Zenke FT, Bokoch GM. alphaPix stimulates p21-activated kinase activity through exchange factor-dependent and -independent mechanisms. **J Biol Chem** 1999; 274:6047-50. Erratum in: **J Biol Chem** 1999; 274:15292.

de Kossodo S, Moore R, Gschmeissner S, East N, Upton C, Balkwill FR. Changes in endogenous cytokines, adhesion molecules and platelets during cytokine-induced tumour necrosis. **Br J Cancer** 1995; 72:1165-72.

de Wilt JH, Manusama ER, van Tiel ST, van Ijken MG, ten Hagen TL, Eggermont AM. Prerequisites for effective isolated limb perfusion using tumour necrosis factor alpha and melphalan in rats. **Br J Cancer** 1999; 80:161-6.



de Wilt JH, ten Hagen TL, de Boeck G, van Tiel ST, de Bruijn EA, Eggermont AM. Tumour necrosis factor alpha increases melphalan concentration in tumour tissue after isolated limb perfusion. **Br J Cancer** 2000; 82:1000-3.

De Wilt JH, Thompson JF. Is there a role for isolated limb perfusion with tumor necrosis factor in patients with melanoma? **Ann Surg Oncol** 2004; 11:119-21.

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

Deshpande SS, Angkeow P, Huang J, Ozaki M, Irani K. Rac1 inhibits TNF-alpha-induced endothelial cell apoptosis: dual regulation by reactive oxygen species. **FASEB J** 2000; 14:1705-14.

Dikov MM, Ohm JE, Ray N, et al. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. **J Immunol** 2005; 174:215-22.

Ebnet K, Aurrand-Lions M, Kuhn A, et al. The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. **J Cell Sci** 2003; 116:3879-91.

Eggermont AM, Schraffordt Koops H, Lienard D, et al. Isolated limb perfusion with high-dose tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma and melphalan for nonresectable extremity soft tissue sarcomas: a multicenter trial. **J Clin Oncol** 1996; 14:2653-65.

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

Feng Q, Baird D, Cerione RA. Novel regulatory mechanisms for the Dbl family guanine nucleotide exchange factor Cool-2/alpha-Pix. **EMBO J** 2004; 23:3492-504.

Fidler IJ. The relationship of embolic homogeneity, number, size and viability to the incidence of experimental metastasis. **Eur J Cancer** 1973; 9:223-7.

Filipenko NR, Attwell S, Roskelley C, Dedhar S. Integrin-linked kinase activity regulates Rac- and Cdc42-mediated actin cytoskeleton reorganization via alpha-PIX. **Oncogene** 2005; 24:5837-49.

Fraker DL, Alexander HR, Ross M, et al. A phase III trial of isolated limb perfusion for extremity melanoma comparing melphalan alone versus melphalan plus tumor necrosis factor (TNF) plus interferon-gamma (IFN) [abstract]. **Ann Surg Oncol** 2002; 9:S8.

Frater-Schroder M, Risau W, Hallmann R, Gautschi P, Bohlen P. Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1987; 84:5277-81.

Freeman WM, Robertson DJ, Vrana KE. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. **Biotechniques** 2000; 29:1042-6, 1048-55.

Furrer M, Altermatt HJ, Ris HB, Althaus U, Ruegg C, Lienard D, Lejeune FJ. Lack of antitumour activity of human recombinant tumour necrosis factor-alpha, alone or in combination with melphalan in a nude mouse human melanoma xenograft system. **Melanoma Res** 1997; 7 Suppl 2:S43-9.

Garban F, Attal M, Michallet M, et al. Prospective comparison of autologous stem cell transplantation followed by dose-reduced allograft (IFM99-03 trial) with tandem autologous stem cell transplantation (IFM99-04 trial) in high-risk de novo multiple myeloma. **Blood** 2006; 107:3474-80.

Gene and immunity: genetics, genomics and function. Available from: <URL: <http://www.nanea.dk/cytokinesnps/>> [2007 out 29]

Gille J, Heidenreich R, Pinter A, et al. Simultaneous blockade of VEGFR-1 and VEGFR-2 activation is necessary to efficiently inhibit experimental melanoma growth and metastasis formation. **Int J Cancer** 2007; 120:1899-908.

Glosli H, Prydz H, Roald B. Involution of thymus and lymphoid depletion in mice expressing the hTNF transgene. **APMIS** 2004; 112:63-73.

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

Grunhagen DJ, Brunstein F, Graveland WJ, van Geel AN, de Wilt JH, Eggermont AM. One hundred consecutive isolated limb perfusions with TNF-alpha and melphalan in melanoma patients with multiple in-transit metastases. **Ann Surg** 2004; 240:939-47; discussion 947-8.

Grunhagen DJ, de Wilt JH, van Geel AN, Eggermont AM. Isolated limb perfusion for melanoma patients--a review of its indications and the role of tumour necrosis factor-alpha. **Eur J Surg Oncol** 2006a; 32:371-80.

Grunhagen DJ, de Wilt JH, Graveland WJ, van Geel AN, Eggermont AM. The palliative value of tumor necrosis factor alpha-based isolated limb perfusion in patients with metastatic sarcoma and melanoma. **Cancer** 2006b; 106:156-62.

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

Haranaka K, Satomi N, Sakurai A. Antitumor activity of murine tumor necrosis factor (TNF) against transplanted murine tumors and heterotransplanted human tumors in nude mice. **Int J Cancer** 1984; 34:263-7.

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

Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **J Clin Oncol** 2005; 23:1011-27.

Hiratsuka S, Maru Y, Okada A, Seiki M, Noda T, Shibuya M. Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. **Cancer Res** 2001; 61:1207-13.

Hurd TW, Margolis B. Pars and polarity: taking control of Rac. **Nat Cell Biol** 2005; 7:205-7.

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

Jaeger J, Koczan D, Thiesen HJ, Ibrahim SM, Gross G, Spang R, Kunz M. Gene expression signatures for tumor progression, tumor subtype, and tumor thickness in laser-microdissected melanoma tissues. **Clin Cancer Res** 2007; 13:806-15.

Jang JY, Kim SW, Ku JL, Park YH, Park JG. Presence of CCK-A, B receptors and effect of gastrin and cholecystokinin on growth of pancreatobiliary cancer cell lines. **World J Gastroenterol** 2005; 11:803-9.

Jiang Z, Chu PG, Woda BA, et al. Analysis of RNA-binding protein IMP3 to predict metastasis and prognosis of renal-cell carcinoma: a retrospective study. **Lancet Oncol** 2006; 7:556-64.

Kelley ST, Menon C, Buerk DG, Bauer TW, Fraker DL. Acidosis plus melphalan induces nitric oxide-mediated tumor regression in an isolated limb perfusion human melanoma xenograft model. **Surgery** 2002; 132:252-8.

Keshamouni VG, Arenberg DA, Reddy RC, Newstead MJ, Anthwal S, Standiford TJ. PPAR-gamma activation inhibits angiogenesis by blocking ELR+CXC chemokine production in non-small cell lung cancer. **Neoplasia** 2005; 7:294-301.

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

Kircheis R, Ostermann E, Wolschek MF, et al. Tumor-targeted gene delivery of tumor necrosis factor-alpha induces tumor necrosis and tumor regression without systemic toxicity. **Cancer Gene Ther** 2002; 9:673-80.

Koops HS, Vaglini M, Suciu S, et al. Prophylactic isolated limb perfusion for localized, high-risk limb melanoma: results of a multicenter randomized phase III trial. European Organization for Research and Treatment of Cancer Malignant Melanoma Cooperative Group Protocol 18832, the World Health Organization Melanoma Program Trial 15, and the North American Perfusion Group Southwest Oncology Group-8593. **J Clin Oncol** 1998 ;16:2906-12.

Krosnick JA, Mule JJ, McIntosh JK, Rosenberg SA. Augmentation of antitumor efficacy by the combination of recombinant tumor necrosis factor and chemotherapeutic agents in vivo. **Cancer Res** 1989; 49:3729-33.

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

Leiter U, Meier F, Schittek B, Garbe C. The natural course of cutaneous melanoma. **J Surg Oncol** 2004; 86:172-8.

Lejeune FJ, Lienard D, Matter M, Ruegg C. Efficiency of recombinant human TNF in human cancer therapy. **Cancer Immunol** 2006; 6:6.

Lens MB, Dawes M. Isolated limb perfusion with melphalan in the treatment of malignant melanoma of the extremities: a systematic review of randomised controlled trials. **Lancet Oncol** 2003; 4:359-64.

Liao B, Hu Y, Herrick DJ, Brewer G. The RNA-binding protein IMP-3 is a translational activator of insulin-like growth factor II leader-3 mRNA during proliferation of human K562 leukemia cells. **J Biol Chem** 2005; 280:18517-24.

Lienard D, Eggermont AM, Schraffordt Koops H, et al. Isolated perfusion of the limb with high-dose tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interferon-gamma (IFN-gamma) and melphalan for melanoma stage III. Results of a multi-centre pilot study. **Melanoma Res** 1994; 4 Suppl 1:21-6.

Lienard D, Eggermont AM, Koops HS, et al. Isolated limb perfusion with tumour necrosis factor-alpha and melphalan with or without interferon-gamma for the treatment of in-transit melanoma metastases: a multicentre randomized phase II study. **Melanoma Res** 1999; 9:491-502.

Lotze MT, Dallal RM, Kirkwood JM, et al. Cutaneous melanoma. In: De Vita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, editors. **Cancer: principles and practice of oncology**. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p.2012-69

Ma XY, Wang H, Ding B, Zhong H, Ghosh S, Lengyel P. The interferon-inducible p202a protein modulates NF-kappaB activity by inhibiting the binding to DNA of p50/p65 heterodimers and p65 homodimers while enhancing the binding of p50 homodimers. **J Biol Chem** 2003; 278:23008-19.

Manusama ER, Nooijen PT, Stavast J, Durante NM, Marquet RL, Eggermont AM. Synergistic antitumour effect of recombinant human tumour necrosis factor alpha with melphalan in isolated limb perfusion in the rat. **Br J Surg** 1996; 83:551-5.

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

Matafora V, Paris S, Dariozzi S, de Curtis I. Molecular mechanisms regulating the subcellular localization of p95-APP1 between the endosomal recycling compartment and sites of actin organization at the cell surface. **J Cell Sci** 2001; 114:4509-20.

Mathieu V, Mijatovic T, van Damme M, Kiss R. Gastrin exerts pleiotropic effects on human melanoma cell biology. **Neoplasia** 2005; 7:930-43.

Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. **N Engl J Med** 2006; 355:51-65.

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

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa/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.

Mule JJ, Asher A, McIntosh J, et al. Antitumor effect of recombinant tumor necrosis factor-alpha against murine sarcomas at visceral sites: tumor size influences the response to therapy. **Cancer Immunol Immunother** 1988; 26:202-8.

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

Nooijen PT, Manusama ER, Eggermont AM, et al. Synergistic effects of TNF-alpha and melphalan in an isolated limb perfusion model of rat sarcoma: a histopathological, immunohistochemical and electron microscopical study. **Br J Cancer** 1996; 74:1908-15.

Nooijen PT, Eggermont AM, Schalkwijk L, Henzen-Logmans S, de Waal RM, Ruiter DJ. Complete response of melanoma-in-transit metastasis after isolated limb perfusion

with tumor necrosis factor alpha and melphalan without massive tumor necrosis: a clinical and histopathological study of the delayed-type reaction pattern. **Cancer Res** 1998; 58:4880-7.

Noorda EM, Vrouenraets BC, Nieweg OE, van Geel BN, Eggermont AM, Kroon BB. Isolated limb perfusion for unresectable melanoma of the extremities. **Arch Surg** 2004; 139:1237-42.

Noorda EM, van Kreijl RH, Vrouenraets BC, et al. The health-related quality of life of long-term survivors of melanoma treated with isolated limb perfusion. **Eur J Surg Oncol** 2007; 33:776-82.

Osterlund C, Lilliehook B, Ekstrand-Hammarstrom B, Sandstrom T, Bucht A. The nitrogen mustard melphalan activates mitogen-activated phosphorylated kinases (MAPK), nuclear factor-kappaB and inflammatory response in lung epithelial cells. **J Appl Toxicol** 2005; 25:328-37.

Pagotto AH. **Modulação expressão gênica em células de melanoma tratadas com fator de necrose tumoral e/ou melfalano**. São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

Palladino MA Jr, Shalaby MR, Kramer SM, et al. Characterization of the antitumor activities of human tumor necrosis factor-alpha and the comparison with other cytokines: induction of tumor-specific immunity. **J Immunol** 1987; 138:4023-32.

Palumbo A, Brinchen S, Caravita T, et al. Oral melphalan and prednisone chemotherapy plus thalidomide compared with melphalan and prednisone alone in elderly patients with multiple myeloma: randomised controlled trial. **Lancet** 2006; 367:825-31.

Panigrahy D, Singer S, Shen LQ, et al. PPARgamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. **J Clin Invest** 2002; 110:923-32.



Panigrahy D, Huang S, Kieran MW, Kaipainen A. PPARgamma as a therapeutic target for tumor angiogenesis and metastasis. **Cancer Biol Ther** 2005; 4:687-93.

Patterson C, Perrella MA, Endege WO, Yoshizumi M, Lee ME, Haber E. Downregulation of vascular endothelial growth factor receptors by tumor necrosis factor-alpha in cultured human vascular endothelial cells. **J Clin Invest** 1996; 98:490-6.

Perona R, Montaner S, Saniger L, Sanchez-Perez I, Bravo R, Lacal JC. Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. **Genes Dev** 1997; 11:463-75.

Placha W, Gil D, Dembinska-Kiec A, Laidler P. The effect of PPARgamma ligands on the proliferation and apoptosis of human melanoma cells. **Melanoma Res** 2003; 13:447-56.

Povirk LF, Shuker DE. DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards. **Mutat Res** 1994; 318:205-26.

Renard N, Lienard D, Lespagnard L, Eggermont A, Heimann R, Lejeune F. Early endothelium activation and polymorphonuclear cell invasion precede specific necrosis of human melanoma and sarcoma treated by intravascular high-dose tumour necrosis factor alpha (rTNF alpha). **Int J Cancer** 1994; 57:656-63.

Rodriguez-Vicente J, Vicente-Ortega V, Canteras-Jordana M. The effects of different antineoplastic agents and of pretreatment by modulators on three melanoma lines. **Cancer** 1998; 82:495-502.

Rosenberger G, Jantke I, Gal A, Kutsche K. Interaction of alphaPIX (ARHGEF6) with beta-parvin (PARVB) suggests an involvement of alphaPIX in integrin-mediated signaling. **Hum Mol Genet** 2003; 12:155-67.

Rosenberger G, Kutsche K. AlphaPIX and betaPIX and their role in focal adhesion formation. **Eur J Cell Biol** 2006; 85:265-74.

Rossi CR, Foletto M, Pilati P, Mocellin S, Lise M. Isolated limb perfusion in locally advanced cutaneous melanoma. **Semin Oncol** 2002; 29:400-9.

Rossi CR, Foletto M, Mocellin S, Pilati P, Lise M. Hyperthermic isolated limb perfusion with low-dose tumor necrosis factor-alpha and melphalan for bulky in-transit melanoma metastases. **Ann Surg Oncol** 2004; 11:173-7.

Ruegg C, Yilmaz A, Bieler G, Bamat J, Chaubert P, Lejeune FJ. Evidence for the involvement of endothelial cell integrin alphaVbeta3 in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN-gamma. **Nat Med** 1998; 4:408-14.

Ryu B, Kim DS, Deluca AM, Alani RM. Comprehensive expression profiling of tumor cell lines identifies molecular signatures of melanoma progression. **PLoS ONE** 2007; 2:e594.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science** 1995; 270:467-70.

[SEER] Surveillance Epidemiology and end Results. **Melanoma of the skin**. Available from: <URL:<http://www.seer.cancer.gov/faststats/sites.php?stat=Incidence&site=Melanoma+of+the+Skin&x=13&y=16>> [2007 out 29].

Seynhaeve AL, de Wilt JH, van Tiel ST, Eggermont AM, ten Hagen TL. Isolated limb perfusion with actinomycin D and TNF-alpha results in improved tumour response in soft-tissue sarcoma-bearing rats but is accompanied by severe local toxicity. **Br J Cancer** 2002; 86:1174-9.

Stehlin JS Jr. Hyperthermic perfusion with chemotherapy for cancers of the extremities. **Surg Gynecol Obstet** 1969; 129:305-8.

Stoelcker B, Ruhland B, Hehlgans T, Bluethmann H, Luther T, Mannel DN. Tumor necrosis factor induces tumor necrosis via tumor necrosis factor receptor type 1-expressing endothelial cells of the tumor vasculature. **Am J Pathol** 2000; 156:1171-6.

Straume O, Akslen LA. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptors (FLT-1, KDR) and TSP-1 related to microvessel density and patient outcome in vertical growth phase melanomas. **Am J Pathol** 2001; 159:223-35.

Straume O, Akslen LA. Increased expression of VEGF-receptors (FLT-1, KDR, NRP-1) and thrombospondin-1 is associated with glomeruloid microvascular proliferation, an aggressive angiogenic phenotype, in malignant melanoma. **Angiogenesis** 2003; 6:295-301.

Szlosarek PW, Balkwill FR. Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours. **Lancet Oncol** 2003; 4:565-73.

Talantov D, Mazumder A, Yu JX, Briggs T, Jiang Y, Backus J, Atkins D, Wang Y. Novel genes associated with malignant melanoma but not benign melanocytic lesions. **Clin Cancer Res** 2005; 11:7234-42.

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

ten Hagen TL, Seynhaeve AL, van Tiel ST, Ruiter DJ, Eggermont AM. Pegylated liposomal tumor necrosis factor-alpha results in reduced toxicity and synergistic antitumor activity after systemic administration in combination with liposomal doxorubicin (Doxil) in soft tissue sarcoma-bearing rats. **Int J Cancer** 2002; 97:115-20.

Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. **N Engl J Med** 2004; 351:998-1012. Erratum in: **N Engl J Med** 2004; 351:2461.

Tyler D. Where are we going with regional therapy for melanoma? **Ann Surg Oncol** 2004; 11:455-7.

Valéry C, Grob JJ, Verrando P. Identification by cDNA microarray technology of genes modulated by artificial ultraviolet radiation in normal human melanocytes: relation to melanocarcinogenesis. **J Invest Dermatol** 2001; 117:1471-82.

van Etten B, van Geel AN, de Wilt JH, Eggermont AM. Fifty tumor necrosis factor-based isolated limb perfusions for limb salvage in patients older than 75 years with limb-threatening soft tissue sarcomas and other extremity tumors. **Ann Surg Oncol** 2003; 10:32-7.

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

Vargas HI, McFarlane M, Vargas MP, et al. Effects of intravascular (IV) tumor necrosis factor (TNF) on vascular permeability (VP) and blood flow (BF) in tumor and normal tissue [abstract]. **Proc Am Assoc Cancer Res** 1996; 37:486.

Wallach D. TNF ligand and TNF/NGF receptor families. In: Oppenheim JJ, Feldmann M, editors. **Cytokine reference: a compendium of cytokines and other mediators of host defense**. San Diego: Academic Press; 2001. p.377-411.

Watanabe N, Niitsu Y, Umeno H, et al. Toxic effect of tumor necrosis factor on tumor vasculature in mice. **Cancer Res** 1988; 48:2179-83.

Wen Y, Yan DH, Spohn B, Deng J, Lin SY, Hung MC. Tumor suppression and sensitization to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis by an interferon-inducible protein, p202, in breast cancer cells. **Cancer Res** 2000; 60:42-6.

Wen Y, Yan DH, Wang B, et al. p202, an interferon-inducible protein, mediates multiple antitumor activities in human pancreatic cancer xenograft models. **Cancer Res** 2001; 61:7142-7.

Wheatley K, Ives N, Hancock B, et al. Does adjuvant interferon-alpha for high-risk melanoma provide a worthwhile benefit? A meta-analysis of the randomised trials. **Cancer Treat Rev** 2003; 29:241-52.

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.

Wójciak-Stothard B, Entwistle A, Garg R, Ridley AJ. Regulation of TNF-alpha-induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in human endothelial cells. **J Cell Physiol** 1998; 176:150-65.

Xia ZB, Popovic R, Chen J, et al. The MLL fusion gene, MLL-AF4, regulates cyclin-dependent kinase inhibitor CDKN1B (p27kip1) expression. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2005; 102:14028-33.

Xin H, Pramanik R, Choubey D. Retinoblastoma (Rb) protein upregulates expression of the Ifi202 gene encoding an interferon-inducible negative regulator of cell growth. **Oncogene** 2003; 22:4775-85.

Yilmaz A, Bieler G, Spertini O, Lejeune FJ, Ruegg C. Pulse treatment of human vascular endothelial cells with high doses of tumor necrosis factor and interferon-gamma results in simultaneous synergistic and reversible effects on proliferation and morphology. **Int J Cancer** 1998; 77:592-9.

Yoshii S, Tanaka M, Otsuki Y, et al. alphaPIX nucleotide exchange factor is activated by interaction with phosphatidylinositol 3-kinase. **Oncogene** 1999; 18:5680-90.

Zhang M, Tracey KJ. Tumor necrosis factor. In: Thomson AW, editor. **The cytokine handbook**. 3<sup>rd</sup> ed. San Diego: Academic Press; 1998. p.517-48.

Zeng H, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) peceptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. **J Biol Chem** 2001; 276:26969-79.

Zeng H, Zhao D, Mukhopadhyay D. Flt-1-mediated down-regulation of endothelial cell proliferation through pertussis toxin-sensitive G proteins, beta gamma subunits, small GTPase CDC42, and partly by Rac-1. **J Biol Chem** 2002; 277:4003-9.

Zogakis TG, Bartlett DL, Libutti SK, et al. Factors affecting survival after complete response to isolated limb perfusion in patients with in-transit melanoma. **Ann Surg Oncol** 2001; 8:771-8.

***ANEXOS***

---

## **Anexo 1** - Determinação da dose tumorigênica e das curvas de crescimento tumoral de cada linhagem celular

Para desenvolvermos um cronograma eficiente de inoculação das células e tratamento, era necessário padronizar a dose de células a serem injetadas e verificar o tempo decorrido até que os tumores atingissem  $1 \pm 0,3 \text{ cm}^2$ . O tamanho de  $1,0 \text{ cm}^2$  foi estipulado pretendendo obter-se tumores de tamanho relativamente pequenos, que apresentassem pouca área necrótica e que pudessem ser removidos cirurgicamente sem muita mutilação e suficientemente grandes para apresentarem uma complexidade arquitetural típica contendo, inclusive, vasos neoformados.

Inicialmente pretendíamos incluir no estudo maior número de linhagens de melanoma com características variadas no que se refere ao potencial metastático e à produção de melanina. As linhagens disponíveis eram B16F1, B16F10, M2R, K1735CL10 e K1735M2 Testamos, portanto, primeiramente a capacidade destas linhagens em gerarem tumor quando injetadas s.c. nos camundongos. De cada linhagem foram inoculadas  $5 \times 10^6$  células de melanoma obtidas de culturas com 80-100% de viabilidade, em 5 camundongos machos C57BL/6 com idade entre 6 a 8 semanas.

As linhagens B16F10 e B16F1 mostraram-se tumorigênicas. Entretanto, a linhagem M2R revelou-se não ser tumorigênica em camundongos C57BL/6, mesmo quando quantidades da ordem de  $1 \times 10^6$  céls foram injetadas. Os animais foram observados durante 29 dias sem que nenhum tumor se desenvolvesse.

Alternativamente à M2R, testamos outras 2 linhagens de melanoma cutâneo murino que nos foram gentilmente doadas pelo Dr. Jan Vilcek (New York University School of Medicine): a K1735CL10 (originalmente isoladas de camundongos



C3H/HeN induzidos por luz ultravioleta e óleo de cróton e caracterizada como não-metastática; Kripke M.L. 1979) e a K1735M2 (variante com capacidade metastática). Contudo, estas duas linhagens também foram incapazes de promover crescimento tumoral nos camundongos da linhagem C57BL/6 utilizados em nossos experimentos, mesmo na dose de  $1,0 \times 10^6$  células.

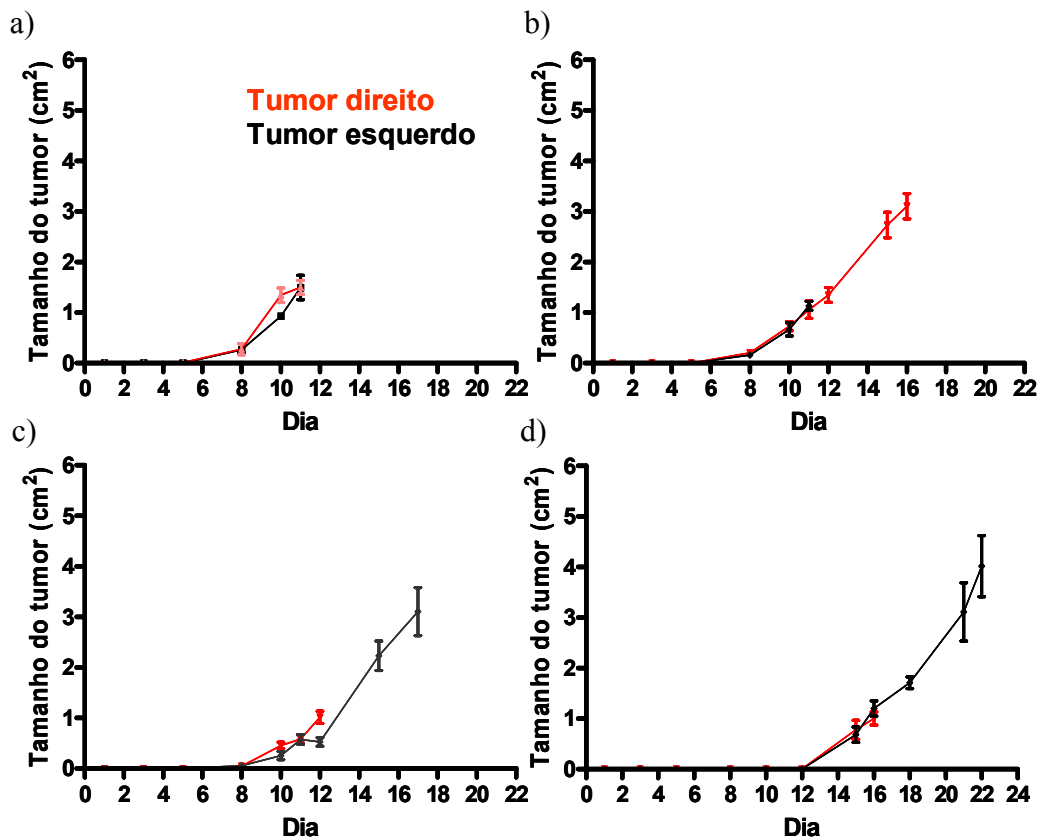
As linhagens B16F1, B16F10 e M2R são derivadas de tumores de camundongos C57BL6. As linhagens K1735CL 10 e K1735M2 são compatíveis com camundongos C57BL/6.

Visando estabelecer a dose de células a serem inoculadas, camundongos C57BL/6 (n= 5 por grupo), com idade entre 6 a 8 semanas, foram injetados s.c. com  $5,0 \times 10^6$ ,  $1,0 \times 10^6$ ,  $5,0 \times 10^5$  ou  $5,0 \times 10^4$  células de melanoma da linhagem B16F10.

Não houve diferença significativa no tempo que os tumores levaram para atingir  $1,0 \pm 0,3 \text{ cm}^2$  nos grupos inoculados com as diferentes doses (10 a 12 dias) (Figura1). Entretanto, ao avaliarmos a estrutura histológica dos tumores observamos que os tumores obtidos a partir da inoculação de  $5,0 \times 10^5$  células apresentavam uma melhor arquitetura com áreas menos extensas de necrose e hemorragia (Figura2). Desta forma, elegemos este número de células como padrão, e testamos esta dose para a linhagem B16F1.

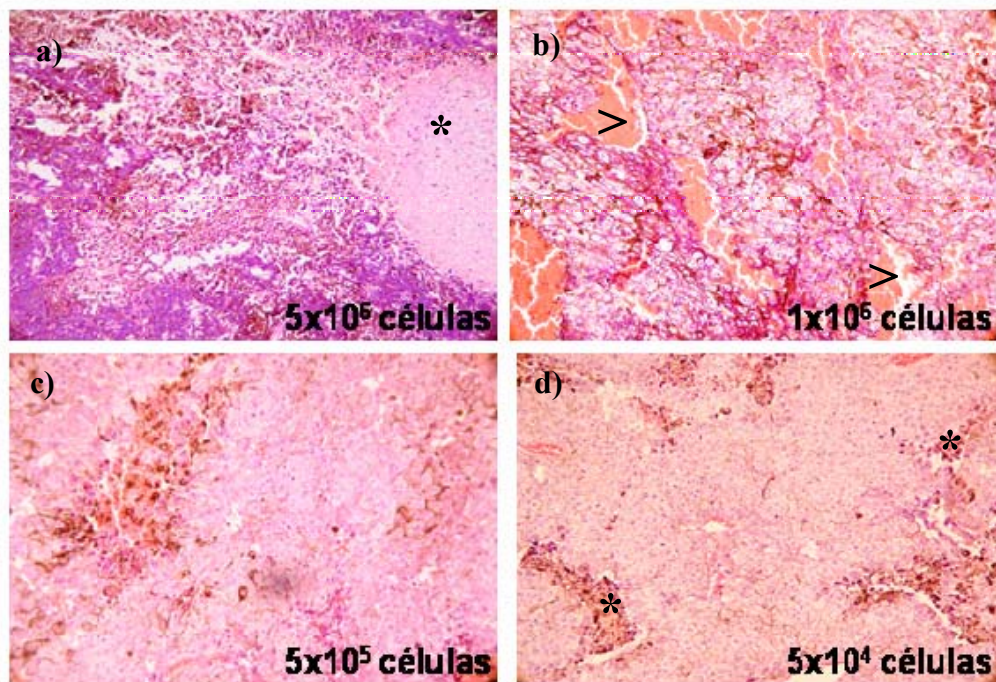
Os tumores desenvolvidos a partir da injeção subcutânea de  $5,0 \times 10^5$  células de B16F1 levaram, em média, 11 dias para atingirem  $1,0 \pm 0,3 \text{ cm}^2$  (Figura3), seguindo o mesmo padrão observado para B16F10.

Como não houve diferença significativa de crescimento quanto à lateralidade do tumor, estabelecemos a retirada do tumor esquerdo como padrão e o seguimento do tumor direito para avaliação de resposta aos tratamentos.



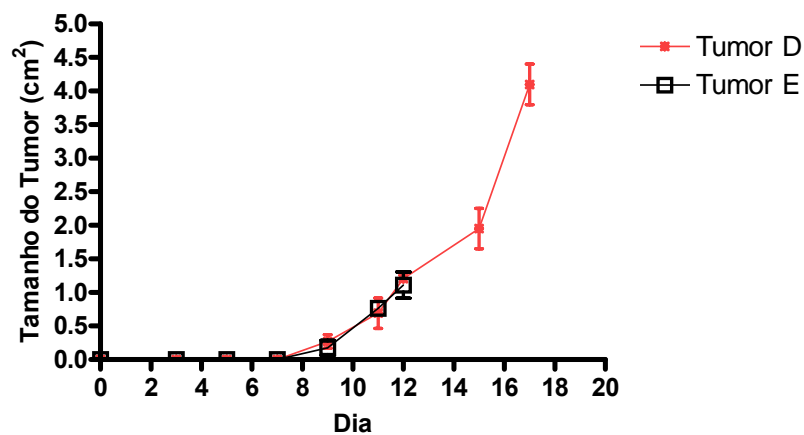
**Legenda:** Células de melanoma, suspensas em 100 $\mu$ L de PBS, foram injetadas s.c. nos flancos traseiros de 5 camundongos machos C57BL/6 com 6 a 8 semanas de idade. Os maiores diâmetros dos tumores foram medidos a cada dois dias. O gráfico mostra as médias dos tamanhos dos tumores dos cinco animais em cm<sup>2</sup> e a barra de erro médio. a)  $5,0 \times 10^6$  células, b)  $1,0 \times 10^6$  células, c)  $5,0 \times 10^5$  células, d)  $5,0 \times 10^4$  células. Alguns tumores foram removidos cirurgicamente ao atingirem  $1,0 \pm 0,3$  cm<sup>2</sup> para avaliação histológica (curvas interrompidas). Quando os tumores remanescentes atingiam 3,0cm<sup>2</sup> os animais eram sacrificados para minimizar sofrimento.

**Figura 1** – Curvas de crescimento tumoral após inoculação subcutânea de B16F10 em camundongos C57BL/6.



**Legenda:** Cortes histológicos de tumores desenvolvidos a partir da inoculação subcutânea de células de diferente número de células de melanoma da linhagem B16F10 em camundongos C57BL/6 (coloração: HE, 400x). a e b) Observa-se extensa necrose (\*) e hemorragia (>). c e d) A estrutura tissular está relativamente bem preservada, com apenas áreas focais de necrose.

**Figura 2** – Histologia dos tumores.



**Legenda:** Inoculou-se  $5 \times 10^5$  células de B16F1, suspensas em  $100 \mu\text{L}$  de PBS, em ambos os flancos traseiros de 5 camundongos machos C57BL/6 com 6 a 8 semanas e observou-se o crescimento tumoral. Estão plotadas as médias dos tamanhos dos tumores em  $\text{cm}^2$  e a barra de erro médio. A curva interrompida corresponde aos tumores que foram retirados para análise histológica.

**Figura 3** – Curva de crescimento tumoral após inoculação subcutânea de B16F1 em camundongos C57BL/6.

## **Anexo 2** - Determinação da dose de melfalano e de tnf e avaliação de resposta ao tratamento *in vivo*

Encontramos na literatura duas referências sobre a dose de MEL a ser empregada em camundongos. No primeiro estudo, empregou-se 6-9mg/Kg/semana i.p. durante três semanas (FURRER et al. 1997). No segundo estudo os autores administraram uma dose i.p. de 5-10mg/Kg (GUTMAN et al. 1997). A nossa idéia era criar um modelo que mimetizasse os efeitos da ILP e, desta forma, o ideal seria a administração de uma dose única, a mais alta possível, mas que não fosse tóxica ao ponto de causar letalidade.

Pela impossibilidade de realizarmos ILP em animais tão pequenos como camundongos e visando atingir de forma mais homogênea toda a massa tumoral, optamos pela via intravenosa de administração das drogas. Inicialmente testamos a dose de 18mg/Kg a dose utilizada por FURRER et al. (1997) administrada de uma só vez. Observamos uma mortalidade aguda (no período de 24h da administração da droga) muito alta em decorrência da toxicidade do MEL.

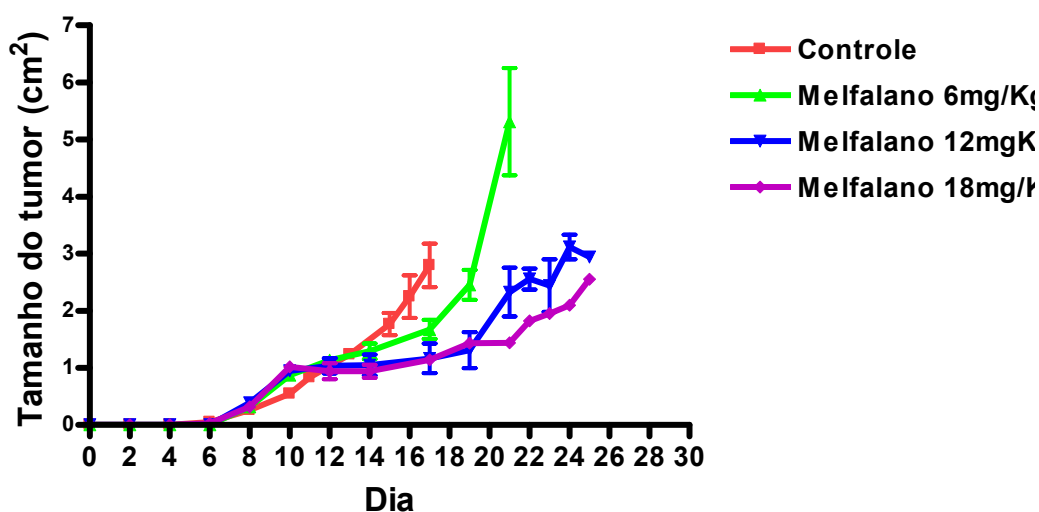
Realizamos, então, uma curva dose-resposta para o melfalano tratando os camundongos inoculados com B16F10 com doses crescentes de MEL (6,0mg/Kg, 12mg/Kg e 18 mg/Kg).

Verificamos um retardo de crescimento tumoral importante nos grupos tratados com as doses de 12mg/Kg e 18mg/Kg (Figura1). No entanto, a toxicidade aguda no grupo tratado com 18mg/K foi consideravelmente alta, e apenas um animal sobreviveu além do dia 14. Repetimos o experimento injetando a dose de 12mg/Kg em 10 camundongos e comparamos a progressão tumoral observada nos animais que receberam salina apenas. Confirmamos o efeito da dose de 12mg/Kg em diminuir a

progressão do tumoral (fig 2), e verificamos um concomitante aumento da sobrevida livre de progressão (SLP) (tempo para o tumor atingir  $3,0\text{cm}^2$ ) ( $p < 0,001$ , log-rank) (Figura3) e sobrevida livre de eventos (SLE) (tempo até morte por qualquer causa ou progressão tumoral) ( $p = 0,0024$ , log-rank).

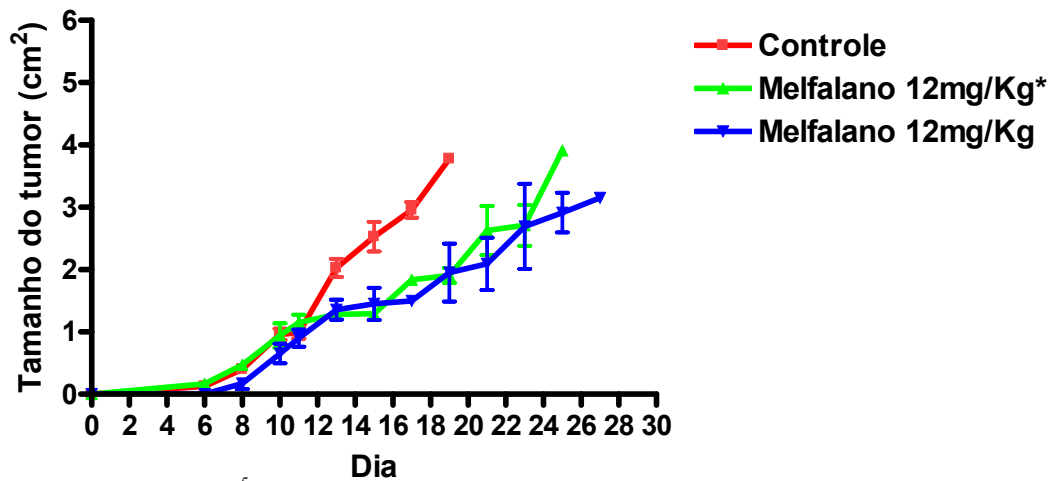
Injetamos também três camundongos apenas com o diluente na concentração equivalente àquela usada na administração da dose de  $18\text{mg/Kg}$  de MEL e constatamos que pelo menos parte da toxicidade aguda (convulsões e parada respiratória) era devida aos componentes do diluente (PVP, etanol, HCl).

Desta forma, decidimos adotar a dose de  $12\text{mg/Kg}$  como padrão para os experimentos seguintes, uma vez que ela esteve associada com retardo do crescimento tumoral e apresentou uma toxicidade aceitável.



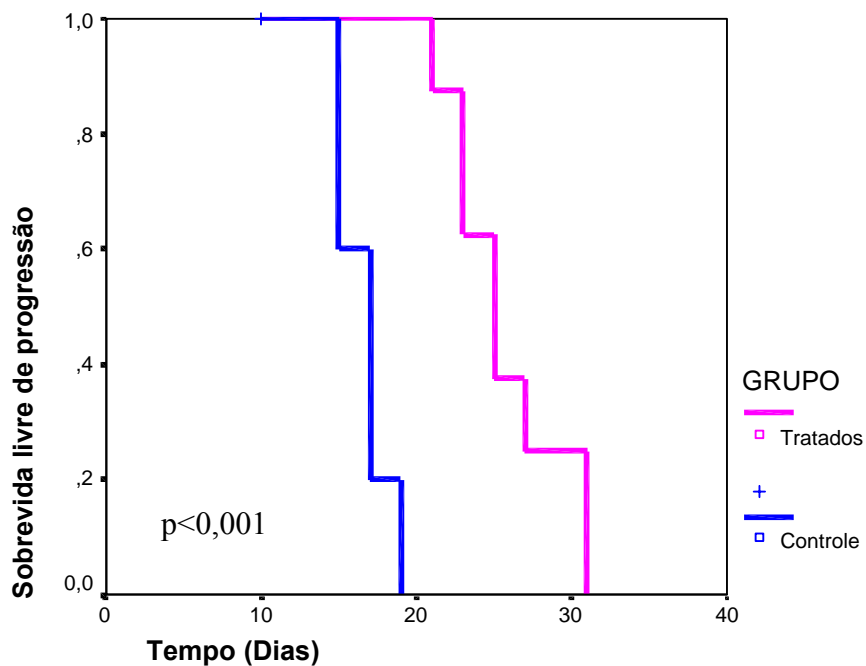
**Legenda** Injetou-se  $5 \times 10^5$  células de melanoma da linhagem B16F10 em 20 camundongos machos C57BL/6 de 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram divididos em 4 grupos e, quando os tumores atingiram  $1,0 \pm 0,3\text{cm}^2$ , cada grupo recebeu doses diferentes de melfalano ( $6\text{mg/Kg}$ ,  $12\text{mg/Kg}$  e  $18\text{mg/Kg}$ ) ou NaCl 0,9% (controle) através da veia da cauda. Após 3 horas, removeu-se cirurgicamente o tumor do lado esquerdo e acompanhou-se o crescimento do tumor remanescente. O gráfico mostra a média do tamanho dos tumores e a barra de erro médio.

**Figura 1** – Curva de crescimento tumoral de B16F10 em camundongos C57BL/6 após tratamento com melfalano.



**Legenda:** Injetou-se  $5 \times 10^5$  células de melanoma da linhagem B16F10 em 15 camundongos machos C57BL/6 de 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram divididos em 3 grupos. Quando os tumores atingiram  $1,0 \pm 0,3 \text{ cm}^2$ , dois grupos receberam melfalano (12mg/Kg) e o terceiro recebeu NaCl 0,9% (controle) através da veia da cauda. Após 3 e 24 horas (\*), removeu-se cirurgicamente o tumor do lado esquerdo e acompanhou-se o crescimento do tumor remanescente. O gráfico mostra a média do tamanho dos tumores e a barra de erro médio.

**Figura 2** – Curva de crescimento tumoral de B16F10 em camundongos C57BL/6 após tratamento com melfalano.



**Legenda:** Camundongos machos C57BL/6 de 6 a 8 semanas de idade foram inoculados com células de melanoma B16F10 e tratados com melfalano (12mg/Kg). Os dados referentes aos animais tratados com melfalano estão agrupados em uma única curva (tratados). As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e a diferença determinada pelo log-rank.

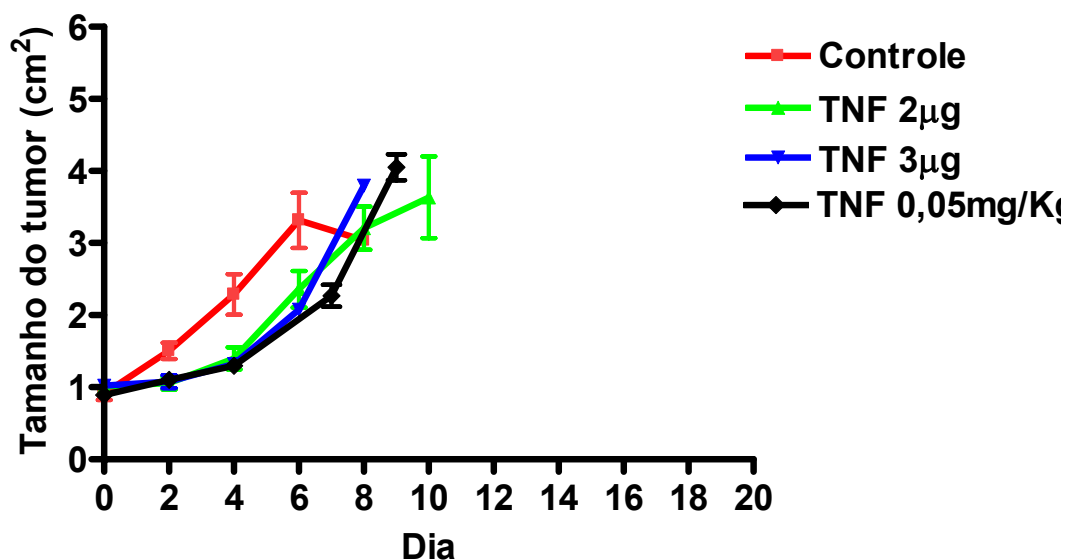
**Figura 3** – Curvas de sobrevivência livre de progressão tumoral.

Existem publicados vários trabalhos que descrevem o emprego de TNF sistêmico no tratamento de melanomas em camundongos com doses que variam de 20 $\mu$ g (dose cheia) a 0,05mg/Kg (HARANAKA et al. 1984; BROUCKAERT et al. 1986; ASHER et al. 1987). Baseados nestes trabalhos, resolvemos empregar uma dose intermediária de 4,5 $\mu$ g/animal. Injetamos então esta dose por via intravenosa em 10 animais previamente inoculados com B16F10, mas observamos uma mortalidade de 90% em 24 horas.

Dessa forma, resolvemos fazer uma curva dose resposta a fim de tentar determinar uma dose que apresentasse atividade anti-tumoral e toxicidade aceitável. Inicialmente, camundongos (n=5 por grupo), contendo tumores de  $1\pm 0,3\text{cm}^2$ , foram tratados com TNF (2 $\mu$ g e 3 $\mu$ g) ou salina (controle). Os grupos que receberam TNF apresentaram discreto retardo no crescimento e aumento na SLP e SLE (p=0,0042 e p=0,0295, log-rank, respectivamente). Contudo, três animais tratados com TNF 3 $\mu$ g morreram após 24 horas. Tratamos, então, 10 animais com a dose de 2 $\mu$ g, mas, surpreendentemente observamos uma alta mortalidade aguda (80% em 24 horas). Decidimos padronizar a dose de TNF por Kg e adotar uma dose um pouco mais baixa de 0,05mg/Kg. Alteramos também o sistema utilizado para dilatação da veia da cauda, via de administração empregada. Nos experimentos anteriores a veia era dilatada expondo-se os animais por 2 min. à luz infravermelha. Baseados em dados da literatura que associam a hipertermia à maior toxicidade do TNF, adotamos compressas aquecidas (45°C) colocadas sobre as caudas dos animais.

Assim, camundongos (n=6) com tumores de  $1,0\text{cm}^2$  foram injetados com 0,05mg/Kg de TNF. Constatamos uma menor velocidade de crescimento tumoral e manutenção do ganho nas curvas de sobrevida (SLP p=0,0009 e SLE p=0,0168)

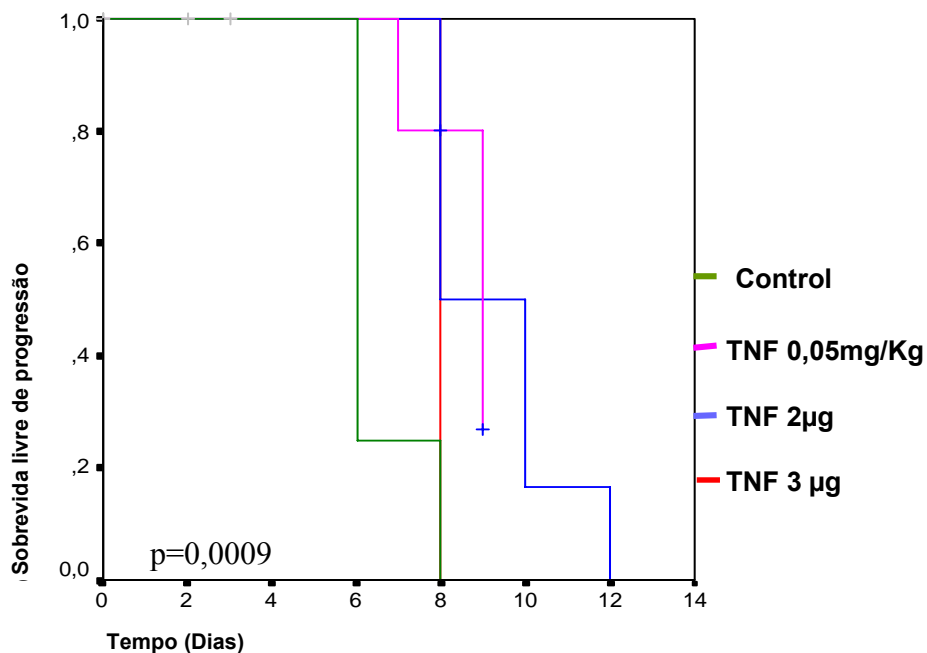
(Figuras 4 e 5). A curva de SLP referente ao tratamento com 0,05mg/Kg de TNF foi estatisticamente diferente do controle ( $p=0,018$ , regressão de Cox).



**Legenda** **Legenda:** Injetou-se  $5 \times 10^5$  células de melanoma da linhagem B16F10 em 21 camundongos machos C57BL/6 de 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram divididos em 4 grupos. Quando os tumores atingiram  $1,0 \pm 0,3 \text{ cm}^2$ , 3 grupos receberam TNF ( $3 \mu\text{g}$ , 5 animais;  $2 \mu\text{g}$ , 6 animais; e  $0,05 \text{ mg/Kg}$ , 6 animais) e o quarto recebeu NaCl 0,9% (controle) através da veia da cauda. Após 3 horas, removeu-se cirurgicamente o tumor do lado esquerdo e acompanhou-se o crescimento do tumor remanescente. O gráfico mostra a média do tamanho dos tumores e a barra de erro médio.

**Figura 4** – Curva de crescimento tumoral de B16F10 em camundongos C57BL/6 após tratamento com TNF.





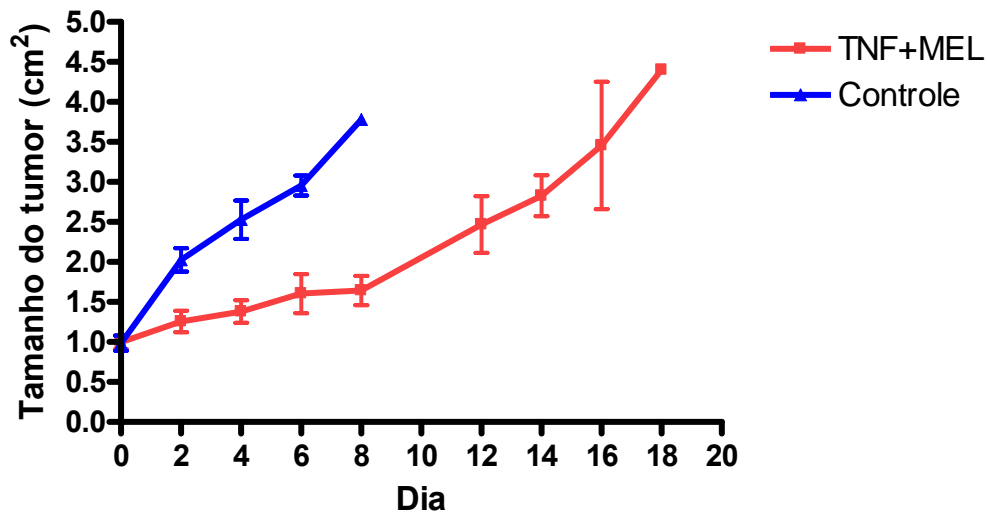
**Legenda:** Camundongos machos C57BL/6 de 6 a 8 semanas de idade foram inoculados com células de melanoma B16F10 e tratados com diferentes doses de TNF quando os tumores atingiram  $1,0 \pm 0,3 \text{ cm}^2$ . As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e a diferença determinada pelo log-rank.

**Figura 5** – Curvas de sobrevida livre de progressão tumoral de camundongos C57BL/6 tratados com TNF.

Desta forma, a dose de 0,05mg/Kg de TNF foi eleita para utilização nos experimentos posteriores.

No intuito de avaliar a tolerância ao tratamento *in vivo* e a resposta tumoral com a combinação de MEL e TNF, administramos TNF (0,05mg/Kg) e melfalano por via intravenosa em 6 camundongos de 6 a 8 semanas, com tumores de  $1 \text{ cm}^2$ , e avaliamos o crescimento tumoral.

Observamos que tal combinação estende significativamente o tempo de crescimento dos tumores (Figura 6). Uma vez que não houve mortes agudas, concluímos que a combinação das duas drogas não parecia ser mais tóxica do que nenhum dos tratamentos isoladamente.



**Legenda:** Injetou-se  $5 \times 10^5$  células de melanoma da linhagem B16F10 em 11 camundongos machos C57BL/6 de 6 a 8 semanas de idade. Quando os tumores atingiram  $1,0 \pm 0,3 \text{ cm}^2$ , 5 animais receberam salina (Controle) e 6 animais receberam TNF (0,05mg/Kg) e melfalano (12mg/Kg), através da veia da cauda. Após 3 horas, removeu-se cirurgicamente o tumor do lado esquerdo e acompanhou-se o crescimento do tumor remanescente. O gráfico mostra a média do tamanho dos tumores e a barra de erro médio.

**Figura 6** – Curva de crescimento tumoral de B16F10 em camundongos C57BL/6 após tratamento com melfalano e TNF.

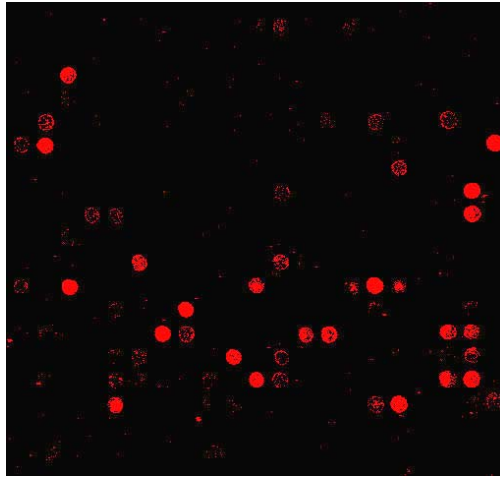
### **Anexo 3 - Padronização do método de hibridização dos arrays**

As lâminas de “array” inicialmente utilizadas nos nossos estudos eram provenientes do Sanger Center Institute e continham 15.000 elementos correspondentes a cDNAs de camundongos imobilizados.

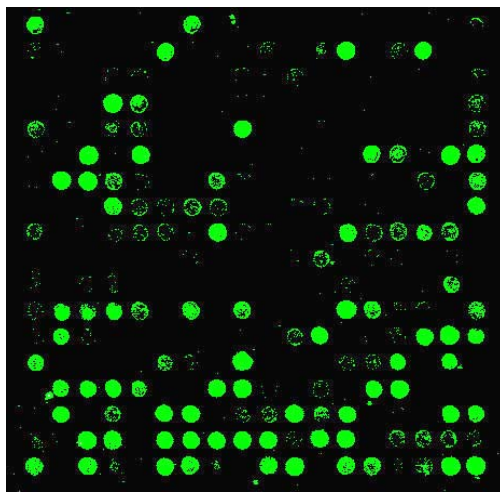
O nosso laboratório possui um protocolo padronizado para a hibridização dos “arrays” humanos produzidos pelo próprio laboratório. Assim, inicialmente, pretendíamos utilizar este mesmo protocolo na hibridização dos nossos “arrays” de camundongo mas o mesmo não se mostrou adequado uma vez que os resultados das hibridizações não apresentavam qualidade satisfatória. Foram testados, então, outros protocolos de marcação de cDNA e de hibridização. Quando foram feitas as análises de qualidades das 36 lâminas correspondentes às amostras dos tratamentos *in vitro*, percebemos que esta plataforma de microarray era incapaz de fornecer dados minimamente consistentes e reprodutíveis para uma análise estatística adequada, fornecendo péssima correlação entre as lâminas “main” e “swap”. Desta forma, tivemos que buscar outra plataforma de hibridização.

A nova plataforma, MO32KOAA versão 3.0.1, foi adquirida do Fox Chase Cancer Center (FCCC) e apresenta 16320 oligos correspondentes à seqüências de genes murinos imobilizados.

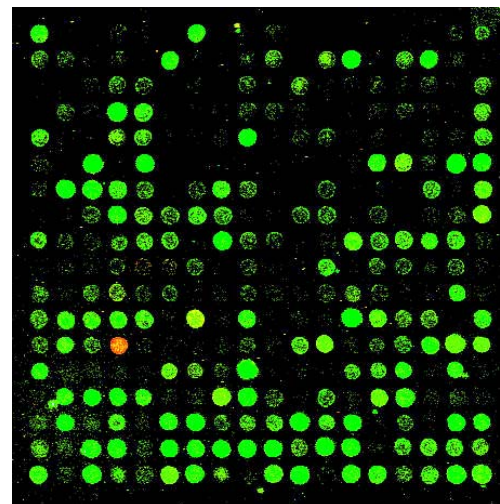
a)



b)



c)



**Legenda:** Marcamos cDNA sintetizado a partir de RNA total extraído de células de melanoma da linhagem B16F10 com Cy3 e tumor com Cy5 e hibrizamos em lâmina de vidro contendo 15000 elementos (11500 genes) de DNA de camundongo, fornecidas pelo Instituto Sanger. Foi empregado o protocolo de marcação e hibridização em câmara úmida padronizada pelo ILPC. Ao lado está exposta uma secção da lâmina. a) Secção lida no canal para Cy5 (cDNA de RNA de tumor). b) Secção lida no canal para Cy3 (cDNA de RNA de linhagem tumoral – B16F10). c) Secção de lâmina – imagem composta.

**Figura 15** – Secção de lâmina de microarray em vidro Mver 1.1.1 15K do Instituto Sanger.

Apesar da vasta experiência do Laboratório de Genômica Funcional do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer de São Paulo no uso da tecnologia de cDNA microarrays, a plataforma empregada neste estudo, , nunca havia sido utilizada antes neste laboratório. Isso requereu a realização de etapas para padronização do protocolo a ser empregado na hibridização destes “arrays”.

Ao todo, nas etapas de padronização foram testados e otimizados 3 protocolos diferentes: o proposto pelo FCCC, o de CHURCH e GILBERT (1984) e um terceiro proposto pela Corning para as lâminas com cobertura Ultra Gaps. Para os testes e otimizações foram usados RNAs obtidos de culturas de macrófagos e de tecidos murinos e não aqueles das amostras deste projeto.

Seguindo o protocolo sugerido pelo Fox Chase, as lâminas foram pré-hibridizadas a 42°C por 45 min., em câmara úmida, em solução contendo 5X SSC, 0.1% SDS e 1% de BSA. Após a adição dos aRNAs marcados, a hibridização foi feita por, pelo menos, 16 horas, também em câmara úmida, em solução contendo 40% de Formamida, 5X SSC e 0.1% SDS. A utilização da câmara úmida foi sugerida pelo FCCC devido à alta densidade de “spots” na plataforma. Após a hibridização, as lâminas foram lavadas de acordo com o seguinte esquema: (1) uma vez por 10 min. em solução contendo 1XSSC e 0,2%SDS; (2) 5min. em solução de 0,1XSSC e 0,2%SDS; (3) 1min. em 0,1XSSC; (4) 10 segundos em água.

Foi também testado o protocolo de Church e Gilbert onde as lâminas foram pré-hibridizadas por 45 min. à 60°C, em câmara úmida, em solução composta de 50% de solução fosfato, 7% SDS, 1% BSA e 1,0mM EDTA. Após este tempo, foram acrescentados os aRNAs marcados com os fluoróforos e as lâminas permaneceram a 60°C por, no mínimo 16h. Após este tempo foram feitas duas lavagens de 30 min. a 65°C na solução contendo 50% fosfato, 1%SDS e 1,0mM de EDTA.

Após as etapas de lavagem de cada um dos protocolos, as lâminas foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. para secagem e as imagens foram geradas e processadas em scanner de laser confocal, utilizando o programa ScanArray Express (PerkinElmer).

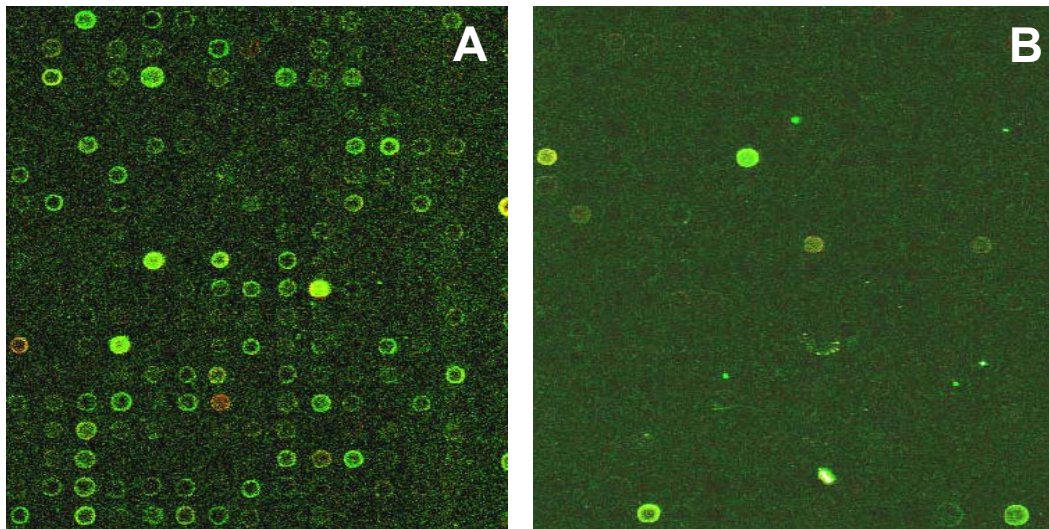
A Figura 3 mostra o resultado obtido das hibridizações-teste em câmara úmida. Os resultados gerados seguindo o protocolo de Church e Gilbert mostraram-se melhores do que os do protocolo sugerido pelo Instituto Fox Chase. Mesmo assim, como pode ser observado na Figura 3, os resultados obtidos seguindo ambos os protocolos não foram satisfatórios. Apesar da qualidade das marcações estarem dentro dos padrões recomendados e o “background” das lâminas não estar ruim, o sinal das hibridizações estava muito baixo.

Com o objetivo de melhorar a hibridização, testamos o protocolo sugerido pela Corning, realizando as hibridizações na estação de hibridização e não mais na câmara úmida. De acordo com este protocolo a pré hibridização foi feita em uma solução composta por 5x SSC, 0,1% SDS, 0,5mg/mL BSA a 42° C por 90 min.. As hibridizações foram feitas à 42° C, na estação de hibridização, por 16 horas, no mínimo. A solução de hibridização continha 25% de formamida, 5X SSC, 0,1% de SDS, 0,1mg/ml de esperma de salmão, PolyA e Cot 1 para um volume final de 100µL. Foram usados 5,0µg de aRNA total marcado com os fluoróforos em cada hibridização, sendo que destes 2,5µg eram provenientes da amostra e 2,5 µg do aRNA de referência.

As lavagens das lâminas foram feitas conforme o protocolo fornecido pela Corning: (1). Uma vez por 5 minutos em solução contendo 2X SSC e 0,1% SDS; (2) duas lavagens de 5 min cada em solução contendo 0,1X SSC e 0,1%; (3) cinco

lavagens de 1 min cada em solução de 0,1X SSC; (4) uma vez em solução contendo 0,01X SSC por 10 segundos.

A secagem foi feita por centrifugação a 1500 rpm em temperatura ambiente por 2 minutos, com as lâminas na posição vertical.

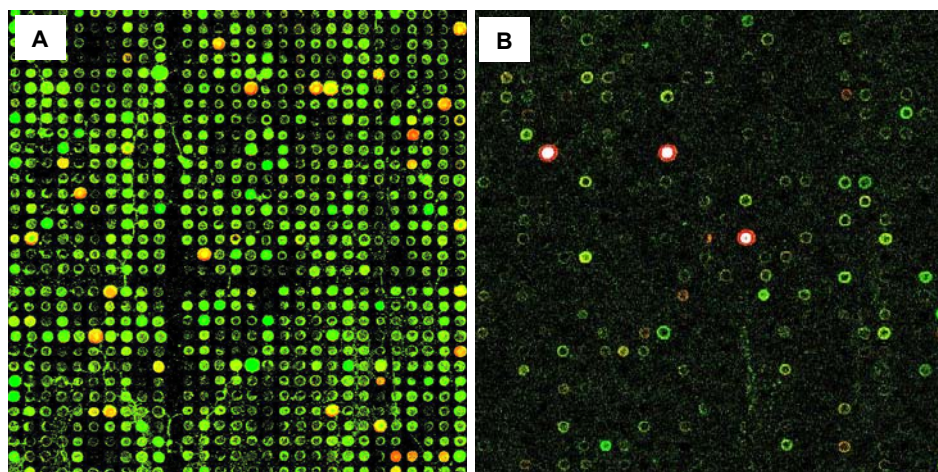


**Legenda:** As plataformas MO32KOAA provenientes do FCCC foram hibridizadas de acordo com o protocolo sugerido pelo próprio FCCC e pelo de Church e Gilbert usando aRNAs marcados com Alexa 555 (amostra proveniente de macrófagos murinos) e Alexa 647 (RNA proveniente de tecidos murinos usados como referência). Ambos os protocolos geraram perfis com baixa intensidade de sinal tanto para o background quanto para a leitura dos spots.

**Figura 3-** Imagens dos arrays após as etapas de hibridização e lavagens usando o protocolo de Church e Gilbert (Imagem A) do e Fox Chase para câmara úmida (imagem B).

A Figura 4 mostra a imagem obtida das lâminas hibridizadas de acordo com o protocolo da Corning em comparação com uma imagem obtida de lâmina hibridizada seguindo o protocolo anteriormente utilizado de Church e Gilbert para câmara úmida.



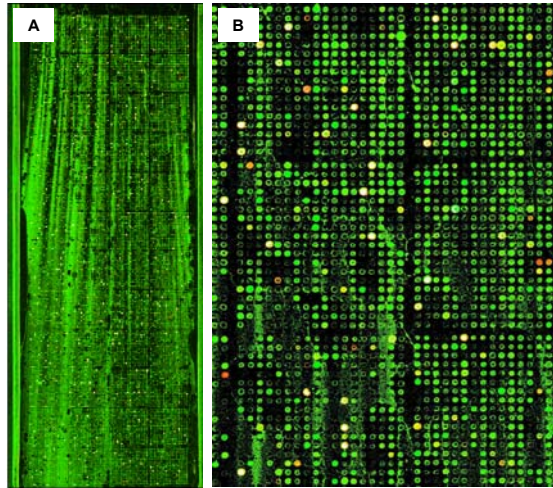


**Legenda:** As plataformas MO32KOAA provenientes do FCCC foram hibridizadas de acordo com o protocolo sugerido pela Corning para lâminas com cobertura Ultragaps ou pelo de Church e Gilbert usando aRNAs marcados com Alexa 555 (amostra proveniente de macrófagos murinos) e Alexa 647 (RNA proveniente de tecidos murinos usados como referência).

**Figura 4** – Imagem das lâminas após hibridização utilizando o protocolo da Corning (painel A) e o sugerido por Church e Gilbert.

A utilização do protocolo da Corning conferiu uma melhora significativa na qualidade das imagens como é mostrado na Figura 4, entretanto, apesar de o sinal obtido na hibridização dos “spots” ter sido bom, a qualidade geral da lâmina não foi satisfatória. Como pode ser verificado na imagem do painel A da Figura 5, foi freqüente, quando da utilização do protocolo da Corning, a presença de manchas de corante que pareciam escorrer do topo da lâmina e que aumentavam drasticamente o “background” em vários “subarrays”, inutilizando grande parte da lâmina. Resolvemos, então, melhorar a etapa de bloqueio das hibridizações inespecíficas nas lâminas. Além disso, suspeitávamos também que algum tipo de “cola” escorria da etiqueta contendo os códigos de barra que foram usadas na identificação da lâmina. Neste sentido, fizemos algumas modificações na solução e no tempo de pré-hibridização, na solução de hibridização e na forma de centrifugar e lavar as lâminas após a hibridização.





**Legenda:** As plataformas MO32KOAA provenientes do FCCC foram hibridizadas de acordo com o protocolo sugerido pela Corning para lâminas com cobertura Ultragaps usando aRNAs marcados com Alexa 555 (amostra proveniente de macrófagos murinos) e Alexa 647 (RNA proveniente de tecidos murinos usados como referência). Painel A: Foto da lâmina inteira onde pode-se notar a presença da mancha inutilizando quase toda a lâmina. Painel B: detalhe de alguns subarrays da lâmina mostrada em A.

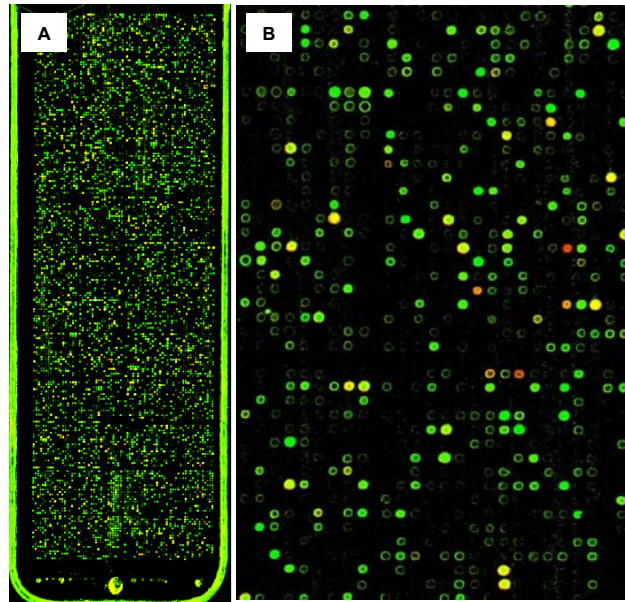
**Figura 5-** Imagem representativa dos arrays após a hibridização com o protocolo da Corning.

O tempo de pré-hibridização foi aumentado de 90 minutos para aproximadamente 16 horas a 42 °C, enquanto que a solução de pré-hibridização passou a conter 5X Denhardt's, além de 5X SSC, 0,2%SDS e 1% BSA.

À solução de hibridização (25% de formamida, 5x SSC, 0,1% SDS, 0,1 mg/mL de espermatozoides de salmão, Poly A, Cot 1) também acrescentamos 5X de Denhardt's em um volume final de 100uL. A hibridização foi feita na estação de hibridização Gene Tac (Genomic Solutions) a 42 °C por aproximadamente 16h, sob as mesmas condições mencionadas anteriormente.

A lavagem da lâmina, após a hibridização, teve algumas etapas reduzidas e alteradas. A lâmina passou a ser lavada na posição horizontal, para evitar que a “cola” escorresse da etiqueta, e as lavagens com a segunda solução tiveram seu tempo reduzido enquanto que a última lavagem, com a solução mais estrigente, foi eliminada. A secagem foi feita na centrífuga com a lâmina na posição vertical com a

etiqueta de identificação voltada para a base. Na Figura 6 são apresentadas imagens representativas do ganho de qualidade que as alterações feitas no protocolo da Corning promoveram.



**Legenda:** As plataformas MO32KOAA provenientes do FCCC foram hibridizadas de acordo com o protocolo sugerido pela Corning introduzindo adaptações para melhor bloqueio das lâminas. Foram usados aRNAs marcados com Alexa 555 (amostra proveniente de macrófagos murinos) e Alexa 647 (RNA proveniente de tecidos murinos usados como referência). Painei A: Foto da lâmina inteira onde se pode notar o desaparecimento da mancha apontada na figura 5. Painei B: detalhe de alguns “subarrays” da lâmina mostrada em A evidenciando a ausência de manchas e diminuição do “background”.

**Figura 6-** Imagem representativa dos arrays após segunda etapa de otimização da hibridização com o protocolo da Corning.

O aumento do tempo de pré-hibridização e a adição do Denhardt's nas soluções reduziu drasticamente o “background”. As alterações incluídas no processo de lavagem e secagem da lâmina após a hibridização pareceram ter evitado o aparecimento da mancha que suspeitávamos estar relacionada à etiqueta de identificação.

Embora este resultado da hibridização obtida tenha sido muito superior ao das hibridizações anteriores os novos procedimentos parecem ter levado a uma redução da

intensidade do sinal dos “spots”. Assim sendo, continuamos a trabalhar um pouco mais na otimização dos protocolos visando obter um aumento do sinal de hibridização.

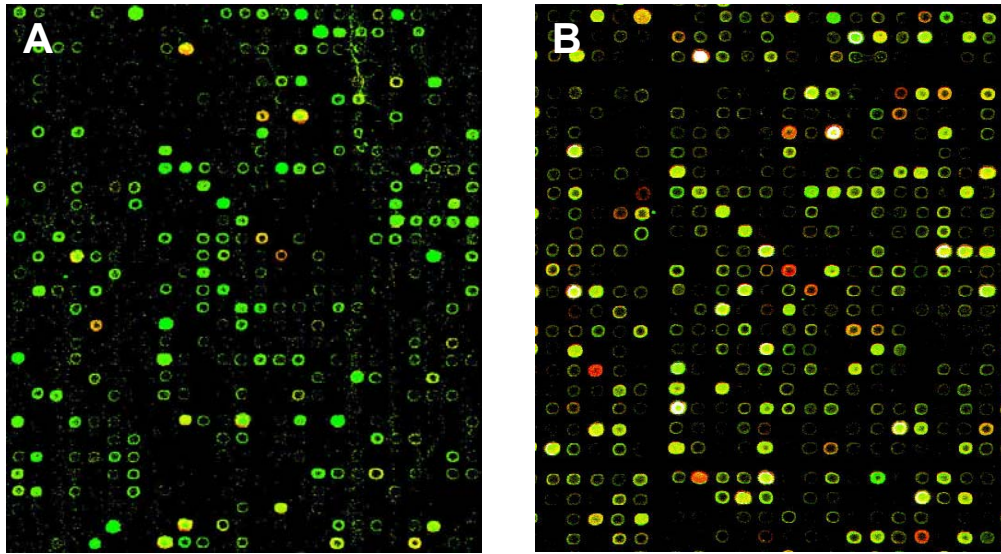
Desta forma, visando recuperar um aumento da intensidade de sinal dos “spots”, foram feitas novas alterações no protocolo. A pré-hibridização das lâminas por 16 horas a 42 °C, em uma solução contendo 5X Denhardt's, 5X SSC, 0,2% SDS e 1% BSA que havia sido padronizado previamente, foi mantida inalterada. Na hibridização, foi feita uma alteração visando aumentar a quantidade total de aRNA marcado com os fluoróforos de 5µg, usado anteriormente, para 7µg, dos quais 3,5µg eram provenientes da amostra e 3,5µg correspondentes ao aRNA de referência. Não foram feitas alterações referentes ao tipo de solução de hibridização utilizada, tendo sido mantida aquela contendo 5X Denhardt's, 25% de formamida, 5XSSC, 0,1% SDS, 0,1mg/mL de esperma de salmão, Poly A e Cot 1 em um volume final de 100µL. Os parâmetros da estação de hibridização Gene Tac (Genomic Solutions) também foram mantidos em uma temperatura de 42 °C por aproximadamente 16h.

No que se refere ao protocolo de lavagem das lâminas, as mesmas continuaram a ser lavadas na posição horizontal, mas alteramos os tempos e algumas soluções. Anteriormente, a primeira solução de lavagem continha 2X SSC e 0,1% SDS e as lâminas eram lavadas por 5 minutos, uma única vez, nesta solução. A segunda solução, continha 0,1X SSC e 0,1% SDS e lavávamos as lâminas durante 5 minutos duas vezes, enquanto que a terceira e última solução continha 0,1X SSC na qual lavávamos as lâminas por 1 minuto cinco vezes. Para esta lavagem, as lâminas foram retiradas do cassete de hibridização em um recipiente contendo uma solução 2X SSC 0,1% SDS, e suas etiquetas de identificação foram “esfregadas” manualmente para retirada de possíveis partículas e cola que possam grudar nelas. Depois, as lâminas

foram acomodadas horizontalmente num suporte dentro de outro recipiente com essa mesma solução, porém nova, onde foram então lavadas por 5 min. à 42°C. Após essa etapa, as lâminas foram lavadas por duas vezes numa solução contendo 0,1X SSC e 0,1% de SDS por 5 min. à temperatura ambiente e, em seguida, submetidas a cinco lavagens de 1 min. cada em 0,1X SSC.

A secagem continuou sendo feita na centrífuga com a lâmina na posição vertical com a etiqueta de identificação voltada para a base e a captura da imagem e intensidades dos “spots” foi feita no equipamento Scan Array.

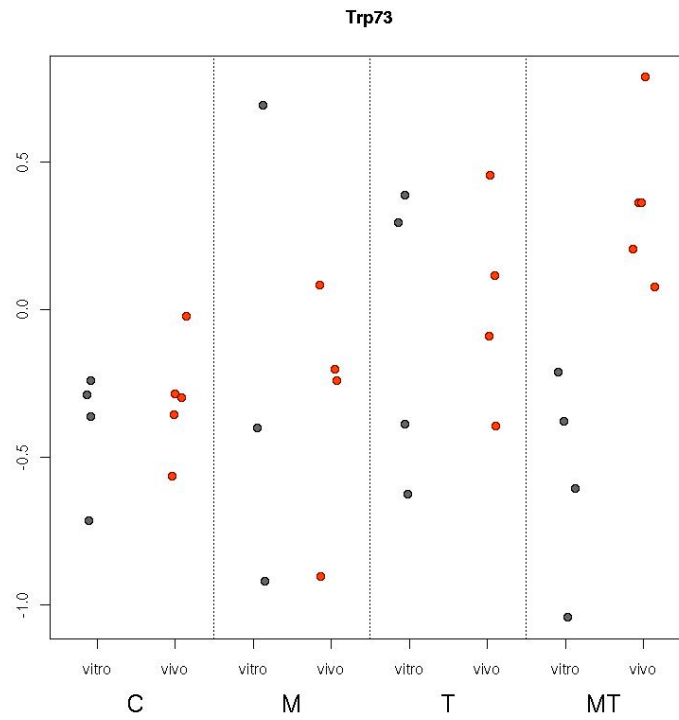
Como pode ser verificado na Figura 7, quando as lâminas hibridizadas foram submetidas a um protocolo de lavagem menos estridente, ocorreu um aumento nítido na qualidade, após uma breve análise comparativa das imagens obtidas (Painéis A e B da Figura 7), observamos que a quantidade de “spots” com intensidade de fluorescência maior que o “background” aumentou e que, aparentemente, a qualidade da intensidade dos sinais melhorou após a lavagem menos rigorosa. Desta forma, optamos por adotar este protocolo menos rigoroso de lavagem nos nossos experimentos.



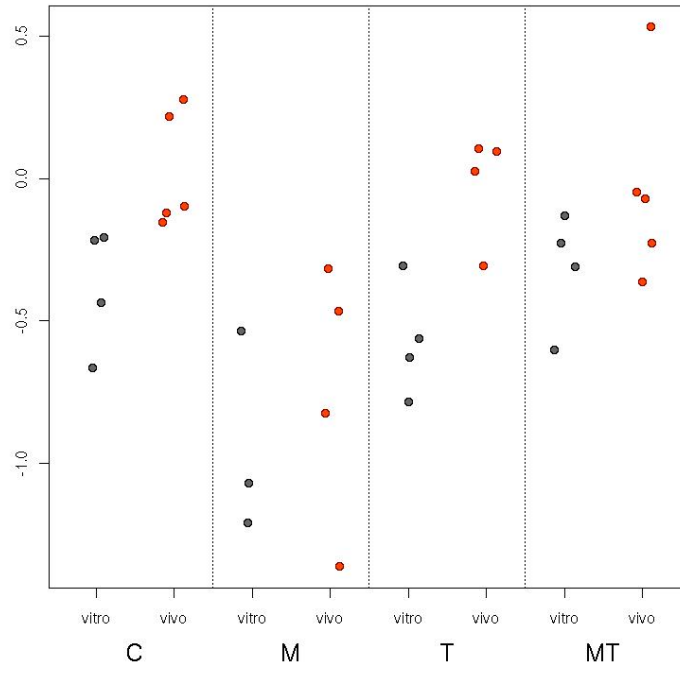
**Legenda:** As plataformas MO32KOAA provenientes do FCCC foram hibridizadas de acordo com o protocolo sugerido pela Corning para lâminas com cobertura Ultragaps usando aRNAs marcados com Alexa 555 (amostra de macrófagos murinos) e Alexa 647 (RNA proveniente de tecidos murinos usados como referência). Painel A: Imagem obtida pelo protocolo anterior mostrado na figura 6 onde um menor número de “spots” e uma baixa intensidade de sinal são visualizados após utilização de protocolo de lavagem muito estrigente. Painel B: Imagem representativa das lâminas obtidas após a etapa final de otimização do protocolo onde foi aumentada a quantidade de aRNAs usada na hibridização e diminuída a estringência das lavagens. Notar o aumento da quantidade de “spots” e da intensidade do sinal dos mesmos.

**Figura 7** - Imagem comparativa do resultado das modificações no protocolo de hibridização e lavagem do “microarray” de acordo com o protocolo da Corning.

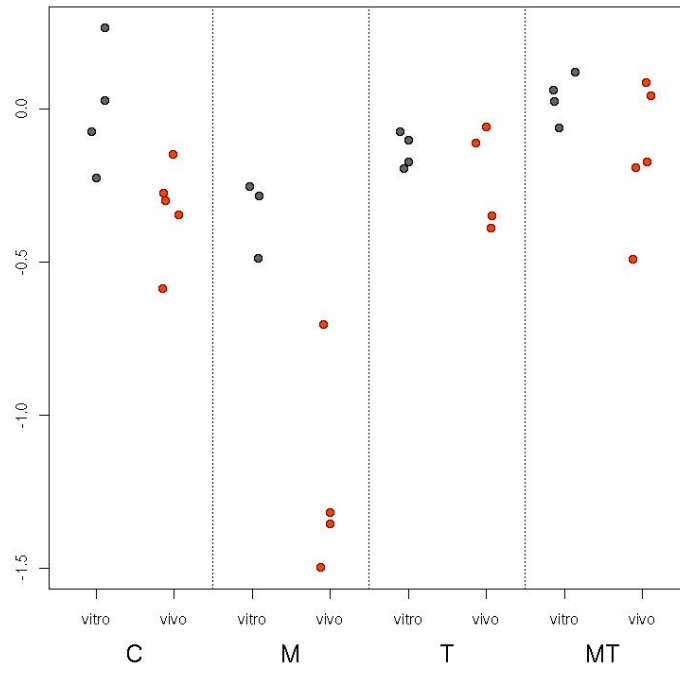
**Anexo 4** - Gráficos de dispersão (“scatter-plots”) dos valores das razões de intensidade entre a amostra e a referência para alguns genes diferencialmente expressos nos experimentos *in vivo*



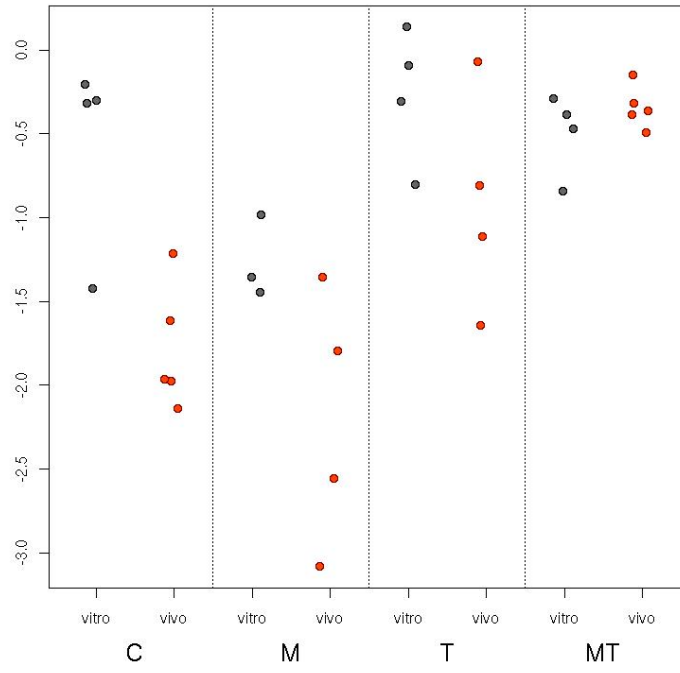
**Mib2**



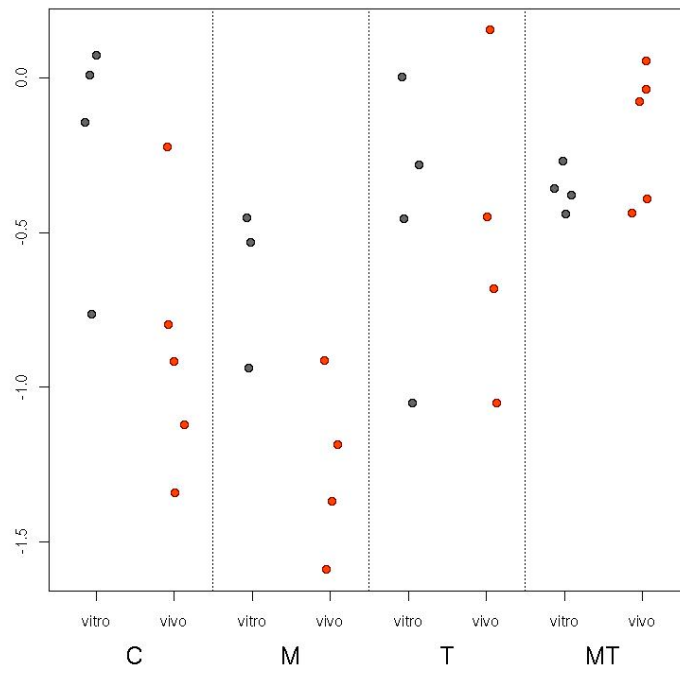
**Kif1b**



**Igf2bp3**

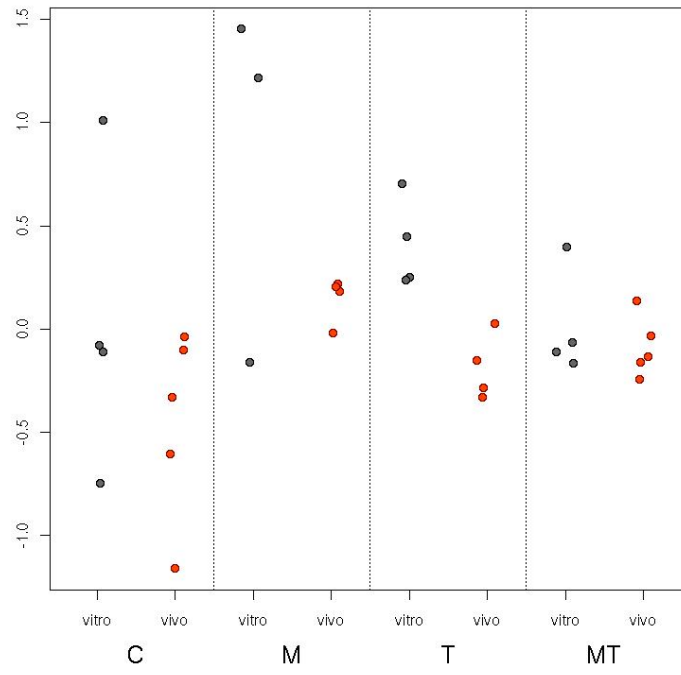


**Irak1bp1**

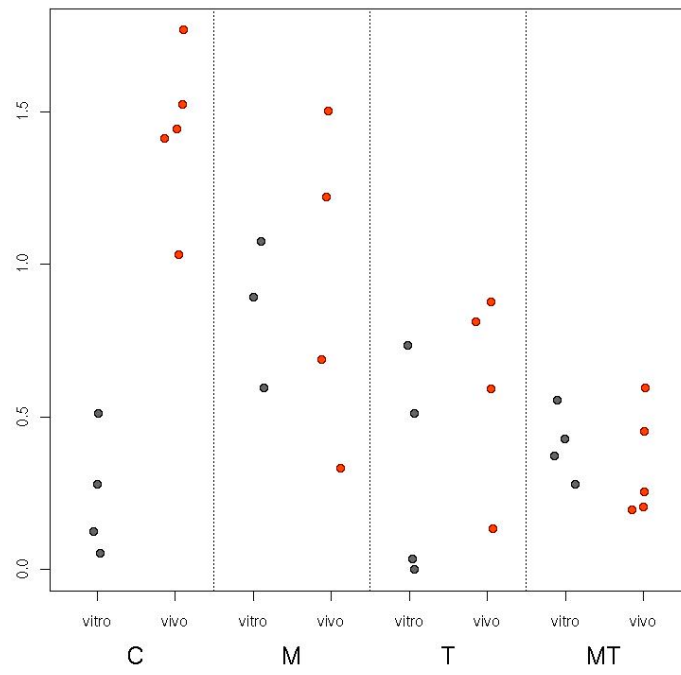


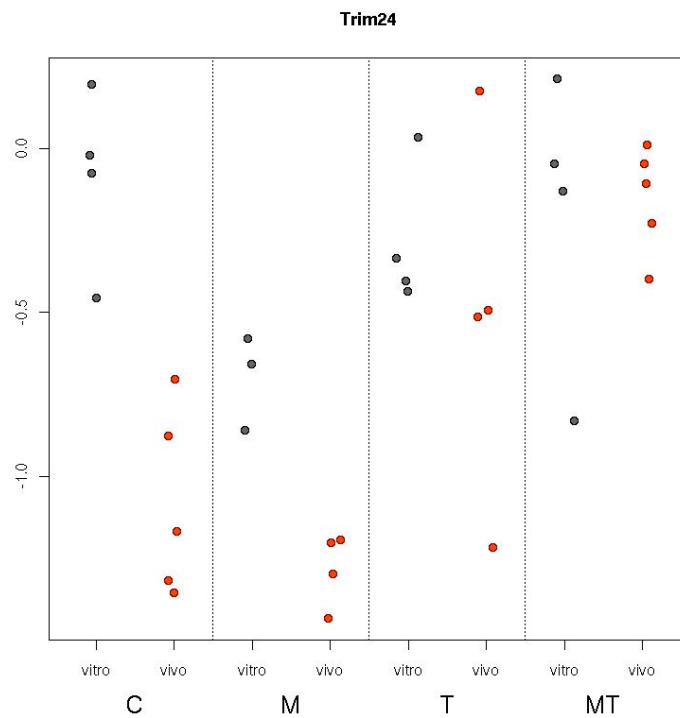
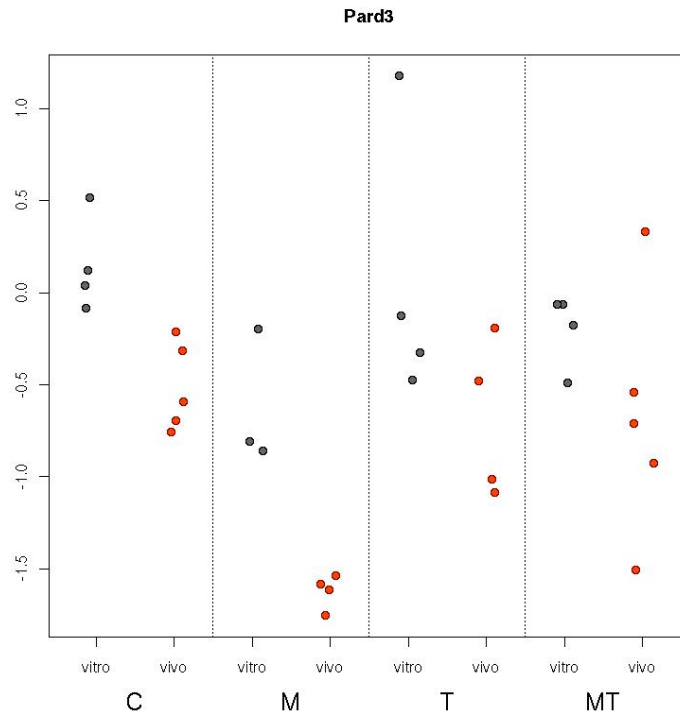


**Aff1**



**Glul**

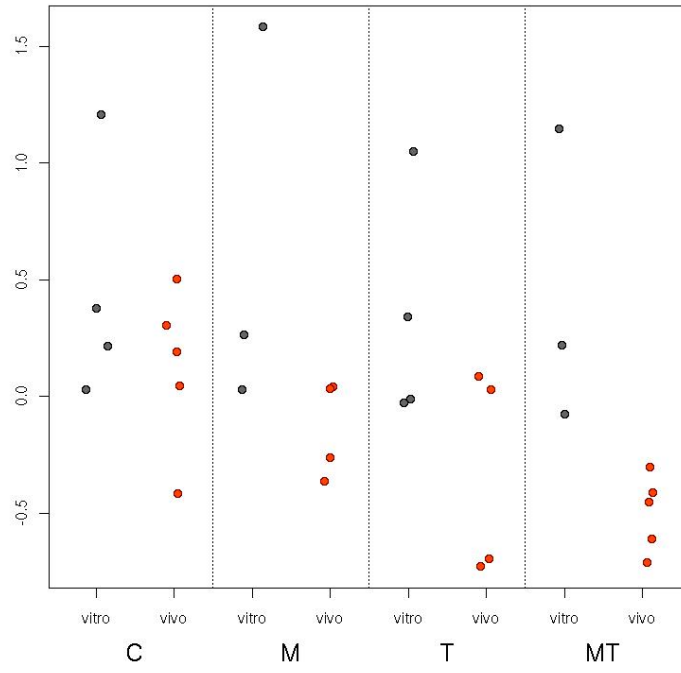




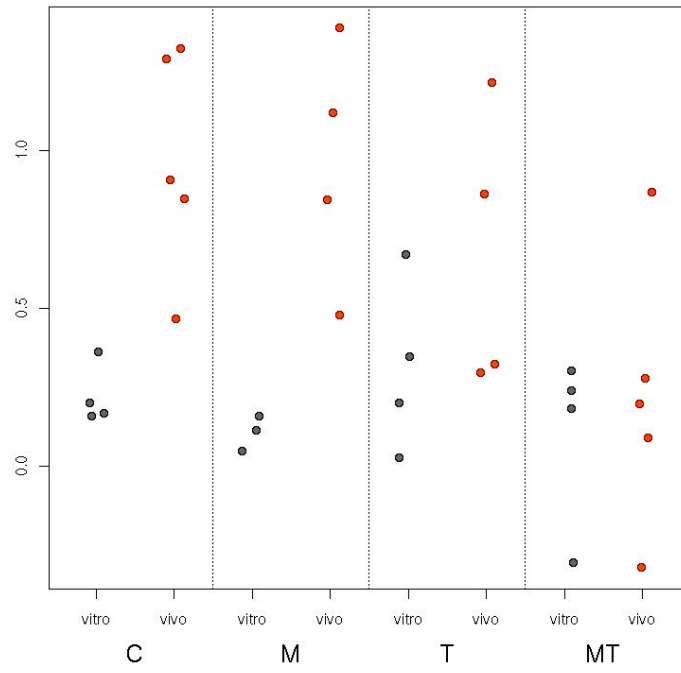
**Legenda:** Os gráficos mostram a distribuição das amostras tratadas *in vitro* (verde) e *in vivo* (vermelho) para cada grupo de tratamento de acordo com as suas razões de intensidade em relação ao RNA de referência.

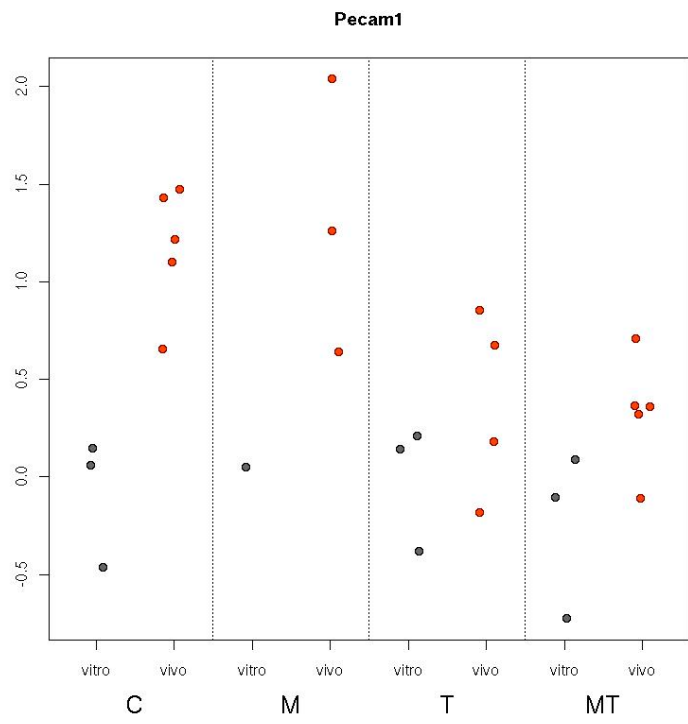
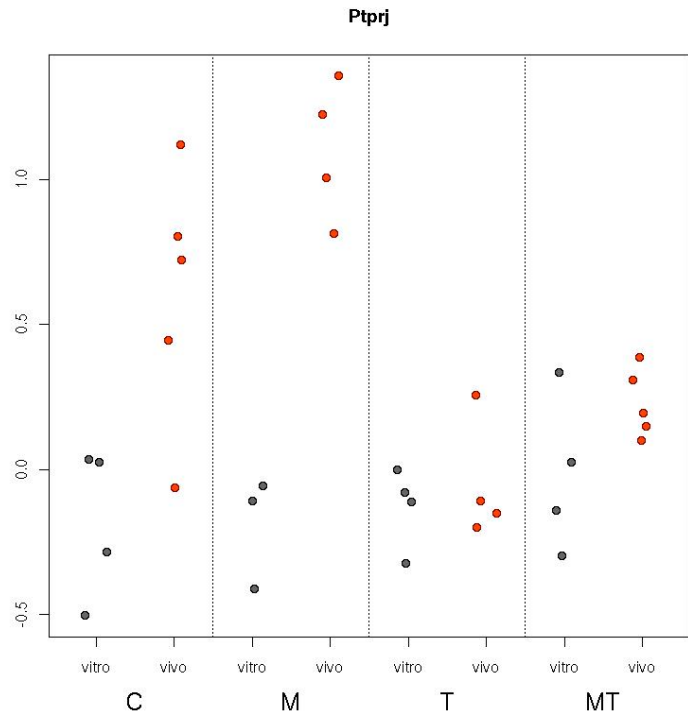
**Figura 1** - Gráficos de dispersão (“scatter-plots”) dos genes que apresentaram-se diferencialmente expressos com “fold” maior ou igual a 1,5, sofrendo variação de expressão *in vitro* e *in vivo*.

**Rnf135**

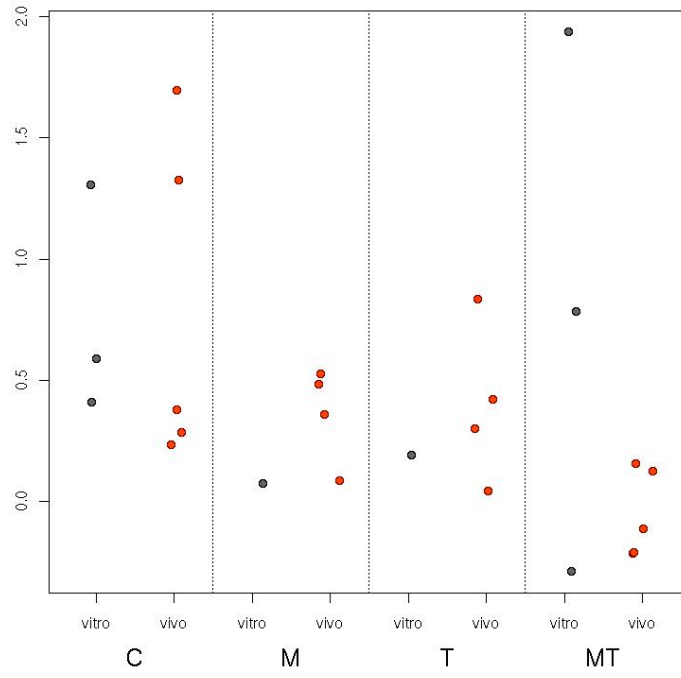


**Tia1**

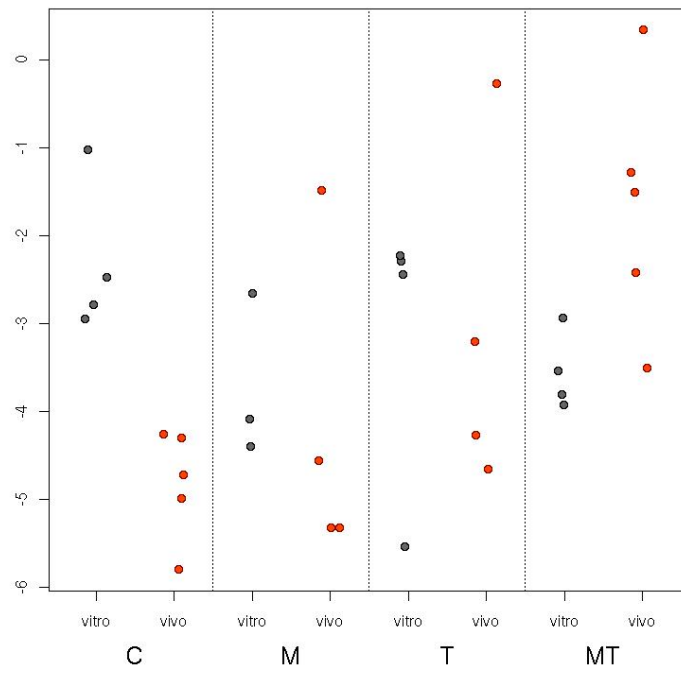




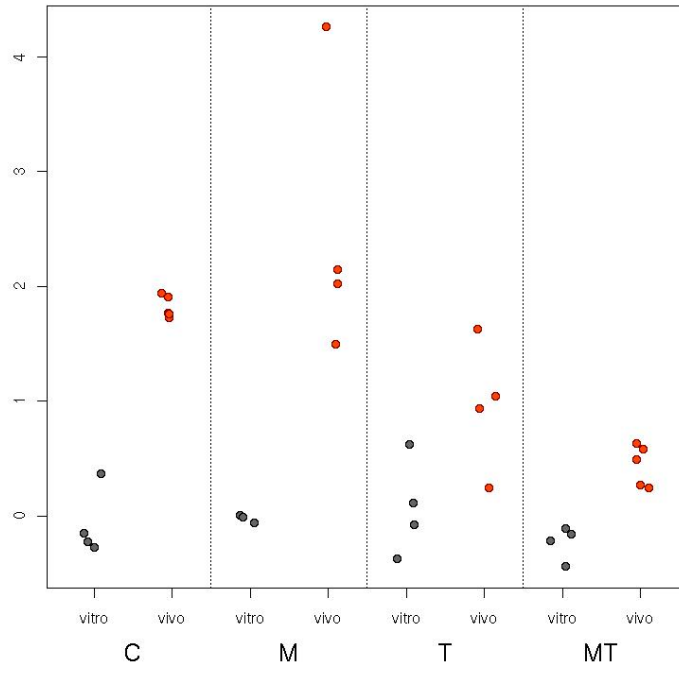
**Kifap3**



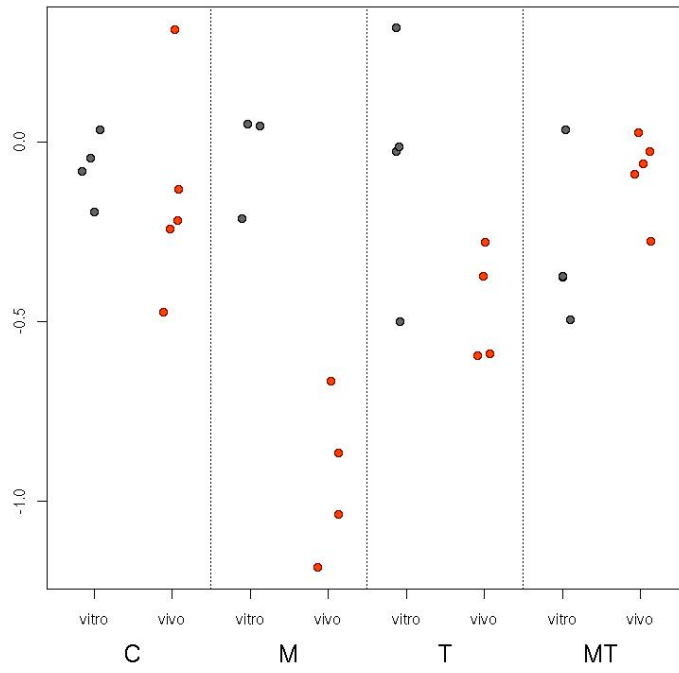
**Ifi202b**

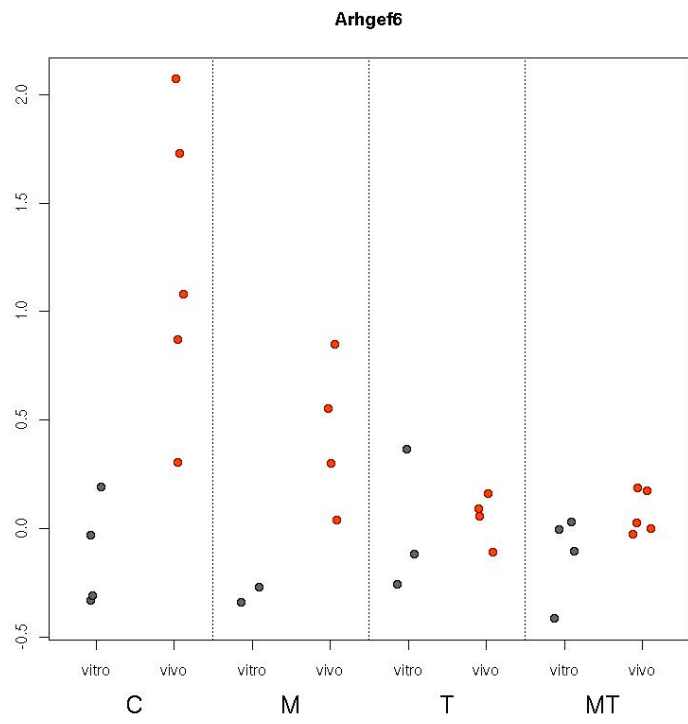
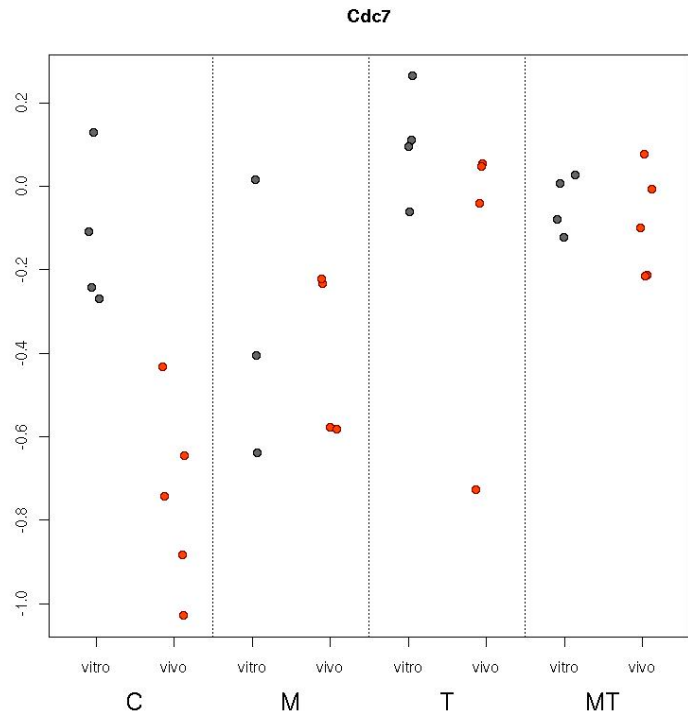


**Flt1**

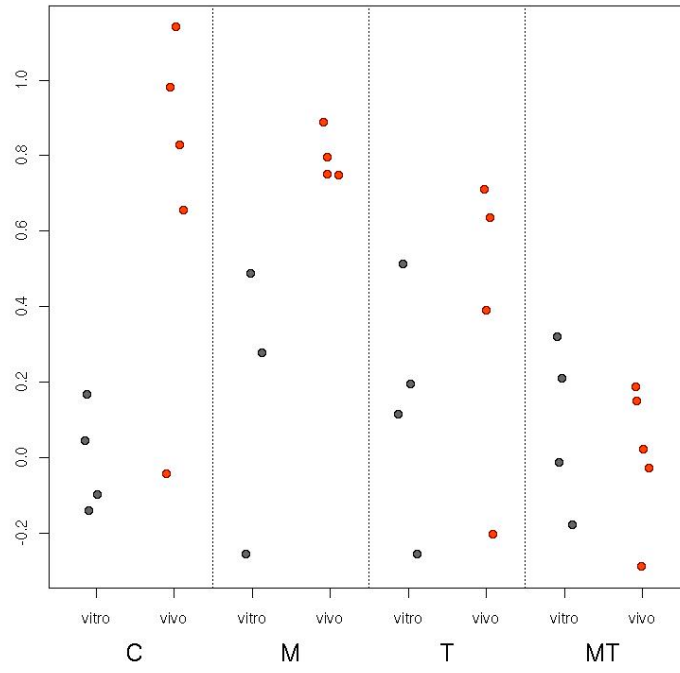


**Dlg5**

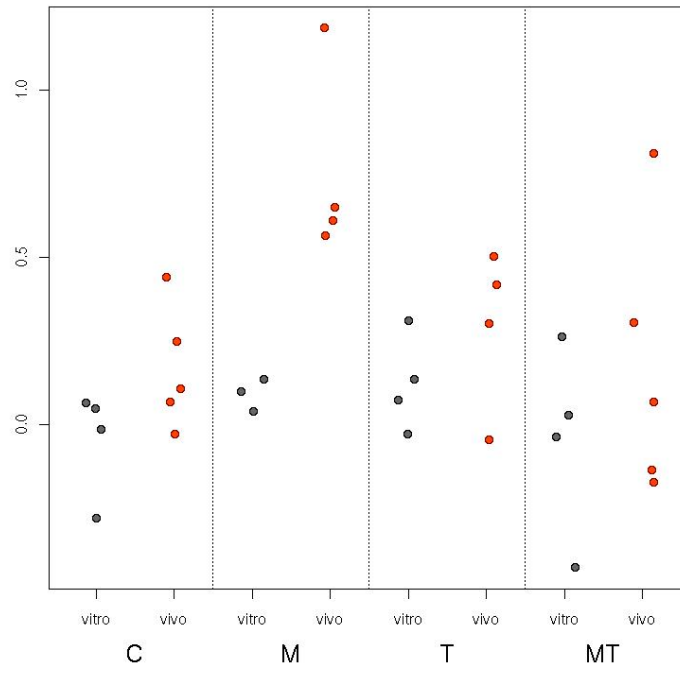




**Tmem176b**

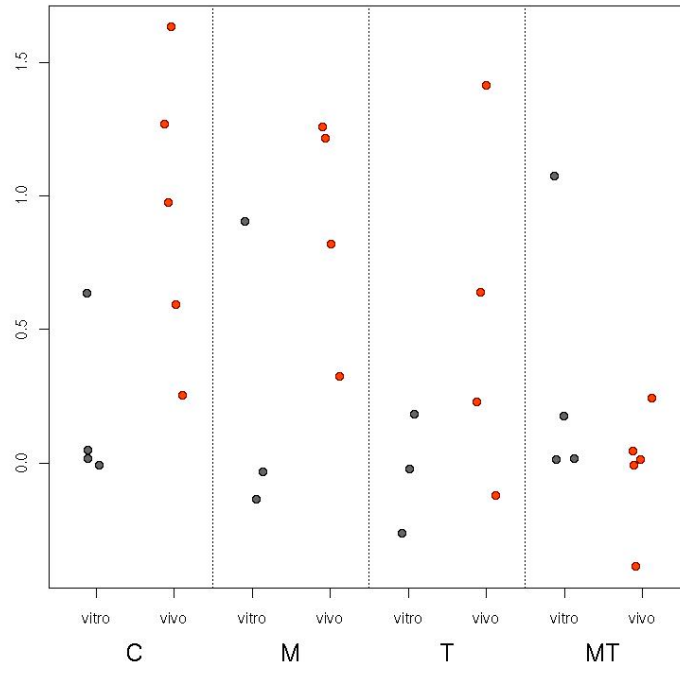


**Pdia6**

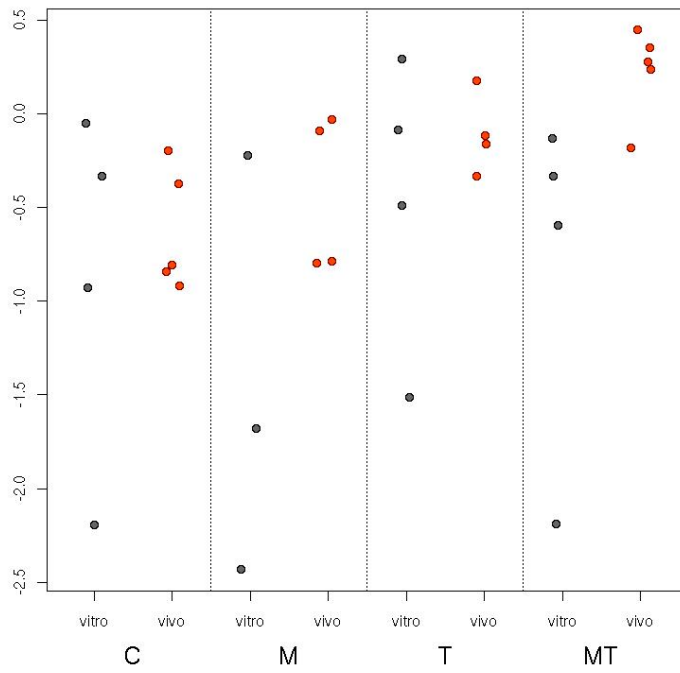




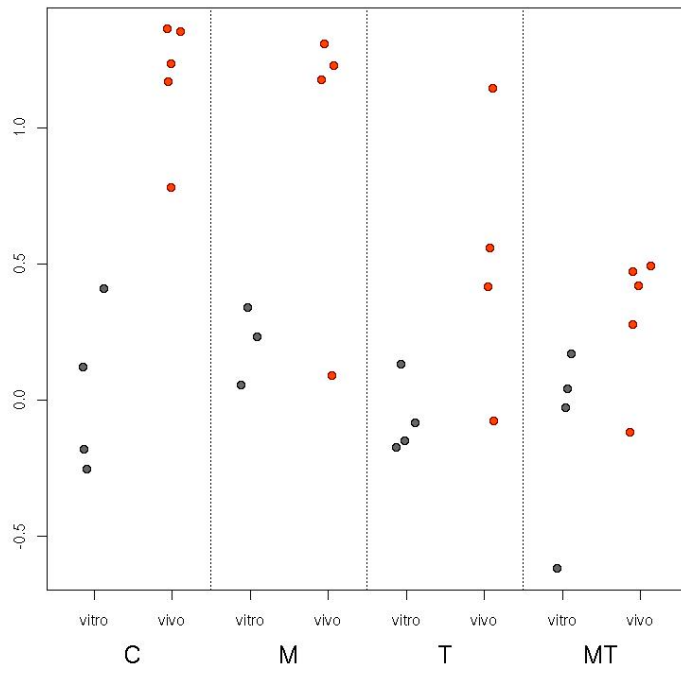
**Trpm1**



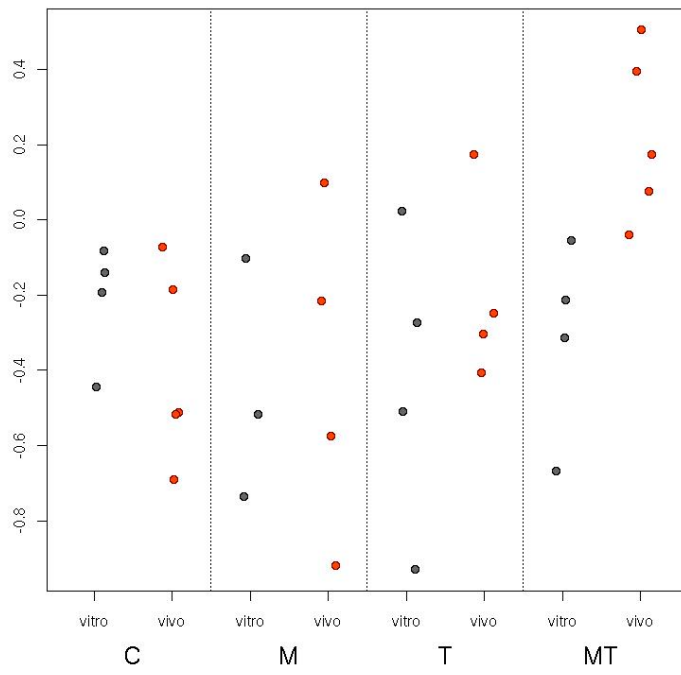
**Neb**



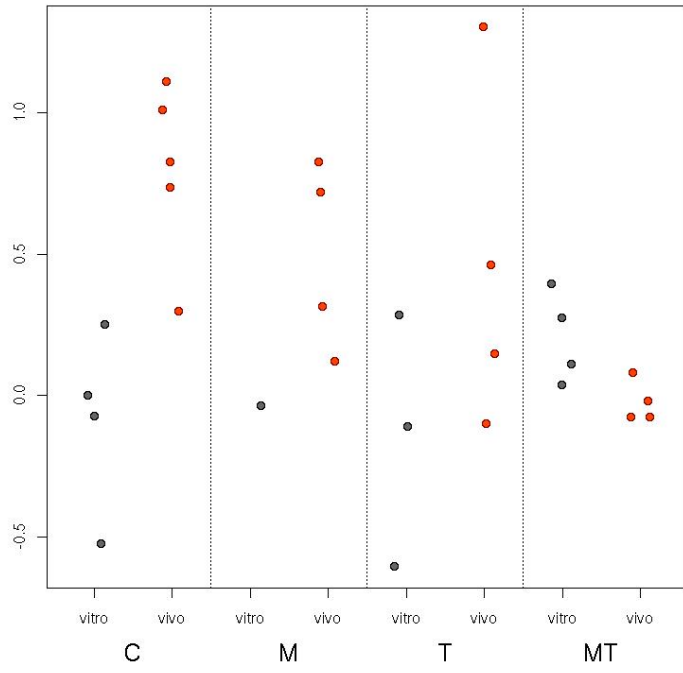
**Napb**



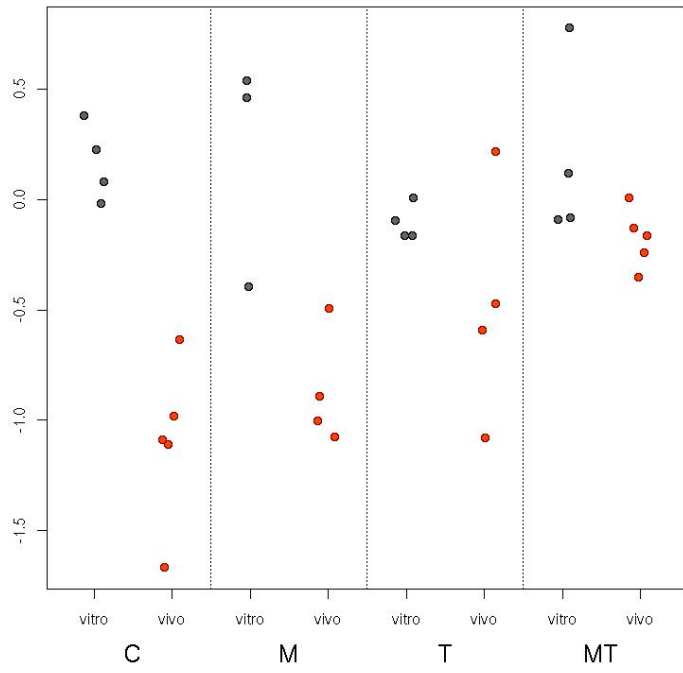
**Lepre1**



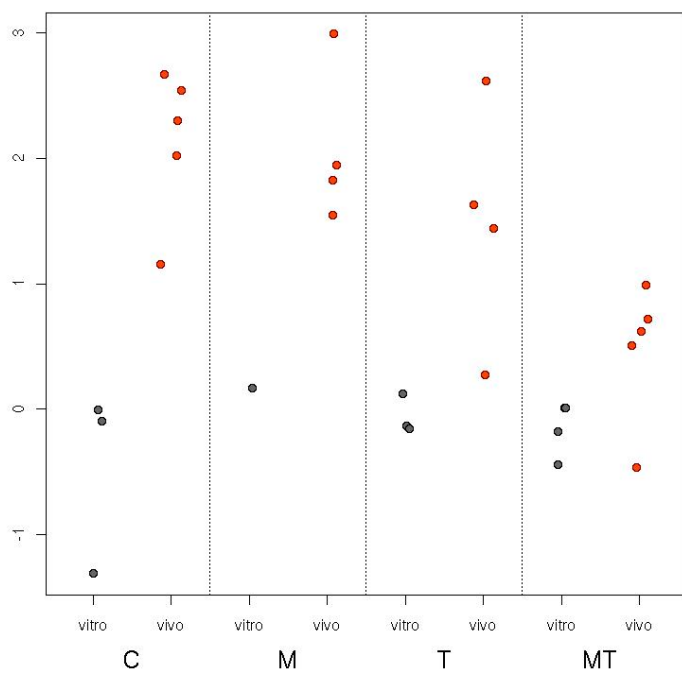
**Fbxw8**



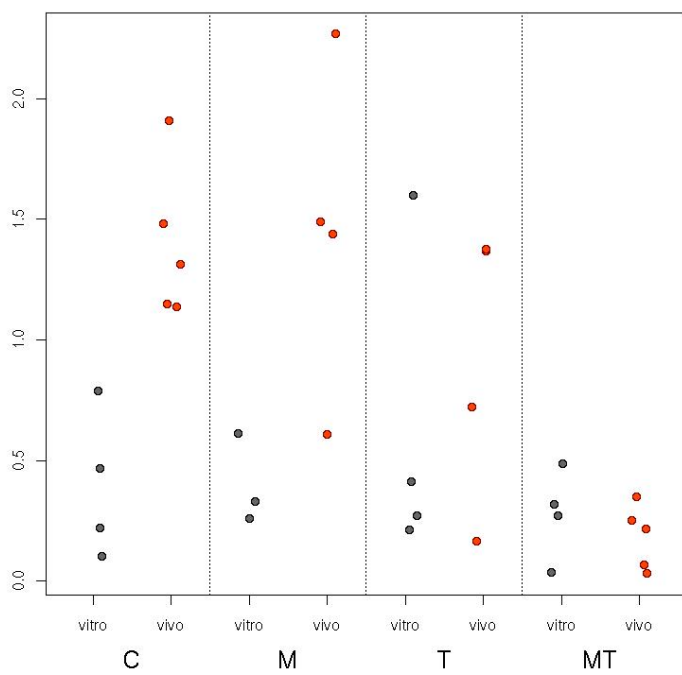
**Atpbd4**

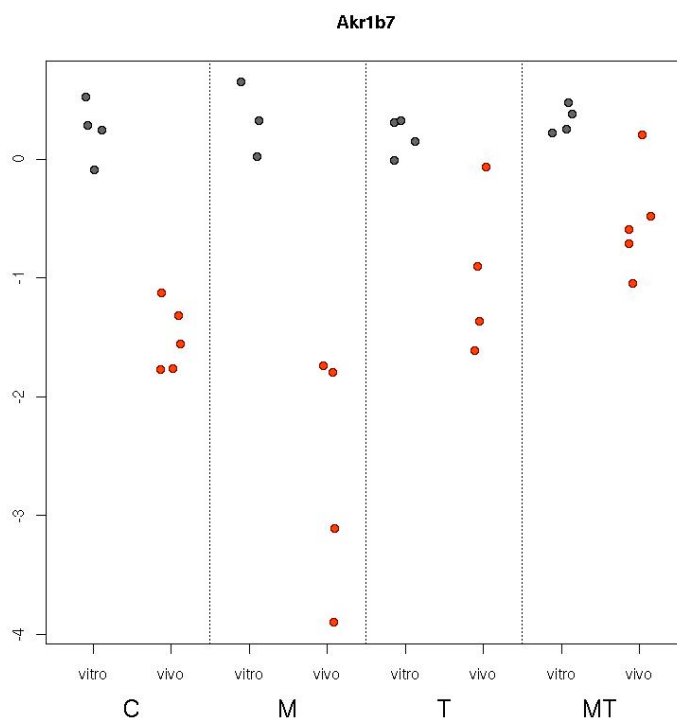
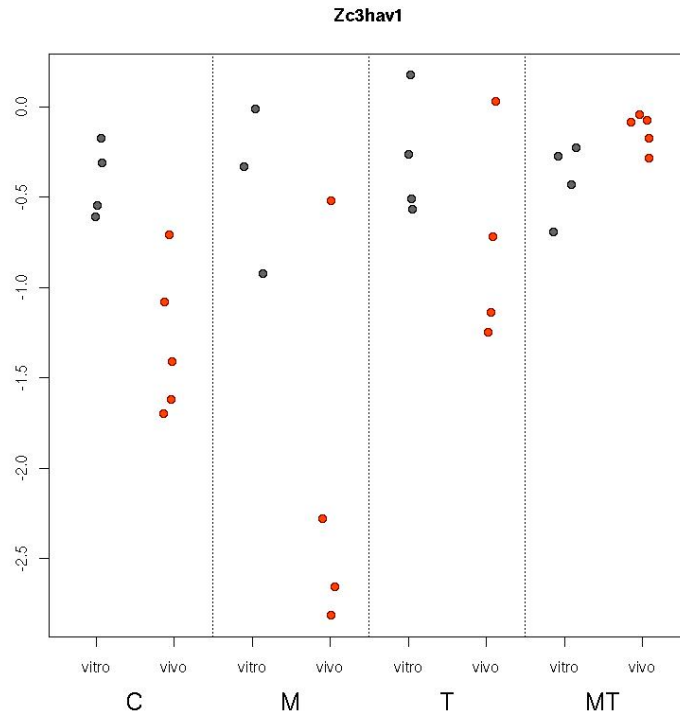


**Art5**



**Aph1c**





**Legenda:** Os gráficos mostram a distribuição das amostras tratadas *in vitro* (verde) e *in vivo* (vermelho) para cada grupo de tratamento de acordo com as suas razões de intensidade em relação ao RNA de referência.

**Figura 2** - Gráficos de dispersão (“scatter-plots”) dos genes que apresentaram-se diferencialmente expressos com “fold” maior ou igual a 1,5, e que sofreram variação de expressão apenas *in vivo*.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)