

PRISCILA FRAGA PENTEADO MENDES

IDENTIFICAÇÃO, POR ANTICORPO MONOCLONAL, DE PROTEÍNA DE
230 KDA RELACIONADA COM MALIGNIDADE
EM MELANOMA MURINO

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo - Escola Paulista de Medicina para
obtenção do título de Doutor em Ciências da
Saúde.

Orientador: Prof. Dr. José Daniel Lopes

São Paulo

2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Mendes, Priscila Fraga Penteadó

Identificação, por anticórpó monoclonal, de proteína de 230 kDa relacionada com malignidade em melanoma murino. / Priscila Fraga Penteadó Mendes.- São Paulo, 2006.

xix, 83.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.

Título em inglês: Identification of 230 kDa protein related with malignancy in murine melanoma by monoclonal antibody.

1. Melanoma. 2. Anticórpó Monoclonal. 3. Células B16. 4. Malignidade.

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

Chefe de Departamento: Prof. Dr. Sergio Schenkman
Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. José Daniel Lopes

PRISCILA FRAGA PENTEADO MENDES

**IDENTIFICAÇÃO, POR ANTICORPO MONOCLONAL, DE PROTEÍNA DE 230 kDa
RELACIONADA COM MALIGNIDADE EM MELANOMA MURINO**

Presidente da Banca: Prof. Dr. José Daniel Lopes

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Marzagão Barbuto

Prof. Dr. Francisco Juarez Ramalho Pinto

Prof^a Dr^a Maria Mitzi Brentani

Prof. Dr. Maurício Mota de Avelar Alchorne

Aprovada em: ____/____/____

Este trabalho foi desenvolvido na Disciplina de Imunologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, com auxílios financeiros concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*Dedico este trabalho aos meus
queridos pais Silvio e Lou Penteado,
às minhas irmãs Juliana e Caroline ...*

*...e ao André: esposo, melhor amigo
e inspiração...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. José Daniel Lopes por sua preciosa orientação, apoio e ensinamentos que não serão esquecidos.

Às Profs. Dras. Miriam Galvonas Jasiulionis e Célia Regina Whitaker Carneiro, sempre solícitas. Aos Profs. Drs. Mário Mariano, Zulma Fernandes Peixinho, Ieda Maria Longo Maugéri e Joel Machado Jr pelas valiosas contribuições.

Aos Profs. Drs. Luiz Rodolpho Travassos, Elaine Guadalupe Rodrigues, Zoilo Pires de Camargo, Clara Lúcia Barbieri Mestriner e Renato Arruda Mortara pelas generosas contribuições a este trabalho.

À funcionária-amiga Creusa Rosa por sua amizade, dedicação e apoio fundamental de bancada. Aos funcionários da Disciplina de Imunologia: Aparecido Mendes, Ivone Mozat, Zélia Pereira, Gisélia Lopes, Creusa Marina, Eraldina do Nascimento e Geová dos Santos. À Mércia, secretária da pós-graduação do departamento, pelo auxílio constante.

Às amigas com quem tive oportunidade de trabalhar e que há algum tempo já trilham seu próprio caminho: Ana Cristina Campos, Renata Ananias e, em especial à minha querida amiga Carolina Hager pela feliz convivência, incentivos e cumplicidade.

À amiga que muito admiro Patrícia Xander, “irmã” de bancada, com quem compartilhei bons e maus resultados durante cinco anos. Agradeço por sua amizade e por ter me ensinado tanto com seu entusiasmo e solicitude.

Aos amigos Ronni Brito, Érika Kioshima, Beatriz De Lorenzo, Fabiana Aliperti, Luciano Feitosa, Elizabeth Perez, Ana Paula Suenaga, Carla Squaiella, Juliana Mussalem, Ana Flávia Vigna e Wagner Batista. Aos companheiros de laboratório: Fernanda Staquicini, Luiz Cláudio Godoy, Daniela Grosso, Juliana Maricato, Adriana Konno, Fabiana Konno, Ellen Mari, Aline Morgado, Tarcísio Tortelli Jr., Claudia Zuliani, Érika Salvato e Karina Caruano.

Aos colegas da disciplina de Imunologia: Ludmilla Chinen, Luciana, Thalita Abrahão, Mariângela Corrêa, Fernanda Molognoni, Tatiana Ricca, Ricardo Russo, Mauro Fantini, Ana Flávia Popi, André Bacchi, Carolina L’abbate, Amanda Gonçalves. Aos colegas do Departamento: Isabel Garcia, Thaísa Paschoalin, Andrei Dobroff, Cristiane Amaral, Carlos Fedeli e Silvia Marques.

Aos estagiários do laboratório que tive o privilégio de acompanhar: Ana Toscano, Guilherme Kyiohara, Marília Menezes e Bruno Vivanco por participarem comigo de cada conquista.

Agradeço aos amigos de São Paulo e Campinas que sempre me apoiaram com suas orações, palavras e atitudes.

Aos meus familiares, que apesar da distância geográfica, estão sempre perto do coração. Obrigada pela torcida! Em especial agradeço à Nice Torrezan, quem me inspirou a percorrer o caminho da Biologia.

Às minhas queridas irmãs Juju e Carol (melhores amigas) e aos meus cunhados que são como irmãos, Diogo e Thiago.

Aos meus pais maravilhosos Silvio e Lou Penteado pelo amor, apoio, compreensão e carinho incondicionais.

Aos meus sogros Gitta Bergsten e René Mendes e filhos: Christian, Paulo, Mariana, Ester, Wagner e Adriele pelo apoio e carinho.

Ao meu querido André em quem sempre encontro amor, incentivo, companheirismo e compreensão.

Ao meu Deus Fiel, como não poderia deixar de ser, entrego-Lhe meu amor e sincera gratidão por tudo quanto aprendi durante mais esta etapa da vida. Soli Deo Gloria!

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	V
AGRADECIMENTOS	VIII
LISTA DE ESQUEMAS	XIII
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
LISTA DE TABELAS	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XVII
RESUMO.....	XX
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 Materiais.....	16
3.1.1 Soluções Básicas.....	16
3.1.2 Soluções para ELISA <i>cell</i>	16
3.1.3 Soluções para SDS-PAGE.....	16
3.1.4 Soluções para Coloração por <i>Comassie Blue</i>	16
3.1.5 Soluções para <i>Immunoblotting</i>	17
3.1.6 Soluções para purificação de Fibronectina	17
3.1.7 Solução para precipitação de anticorpos	17
3.1.8 Soluções para cultura de células	17
3.1.9 Reagentes.....	18
3.1.10 Animais	18
3.1.11 Linhagens de Células.....	19
3.2 Métodos	20
3.2.1 Cultivo de Células	20
3.2.2 Congelamento e Descongelamento de Células	21
3.2.3 Imunização de Camundongos anti-melanoma murino B16.....	21
3.2.4 ELISA <i>cell</i>	22
3.2.5 Preparo de Extrato Celular.....	23
3.2.6 Dosagem protéica pelo micrométodo de Bradford	23
3.2.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE).....	23

3.2.8	Transferência de proteínas para membranas de nitrocelulose (<i>Immunoblotting</i>)	25
3.2.9	<i>Feeder Layer</i> de Macrófagos	25
3.2.10	Fusão Celular e Clonagem dos Hibridomas.....	26
3.2.11	Isotipagem.....	26
3.2.12	Precipitação de Anticorpos Monoclonais	26
3.2.13	Citometria de Fluxo (FACS)	27
3.2.14	Imunofluorescência e Microscopia Confocal.....	27
3.2.15	Purificação de Fibronectina de Plasma Humano	28
3.2.16	Ensaio de Inibição de Proliferação <i>in vitro</i>	28
3.2.17	Ensaio de Inibição da Adesão às Proteínas da matriz-extracelular <i>in vitro</i>	28
3.2.18	Ensaio de Inibição da formação de esferóides em agarose.....	29
3.2.19	Ensaio de Citotoxicidade mediada por complemento <i>in vitro</i>	29
3.2.20	Ensaio de inibição da migração <i>in vitro</i>	29
3.2.21	Ensaio de inibição da invasão <i>in vitro</i>	30
3.2.22	Ensaio de Inibição do Crescimento tumoral <i>in vivo</i>	30
3.2.23	Ensaio de Inibição de metástases em modelo experimental	31
3.2.24	Análises Estatísticas	32
4	RESULTADOS	33
4.1	Imunização de camundongos e produção de anticorpos monoclonais contra células B16	33
4.2	A molécula reconhecida pelo anticorpo monoclonal G12F2 é expressa na superfície de células de melanoma murino B16	35
4.3	G12F2 não apresentou reatividade com fibronectina em <i>Immunoblotting</i>	35
4.4	MAB G12F2 reagiu apenas contra células tumorigênicas	35
4.5	A molécula de M_r 230,000 é mais expressa por variante de maior potencial metastático derivada da linhagem B16	42
4.6	MAB G12F2 inibiu proliferação de células B16 <i>in vitro</i>	44
4.7	MAB não inibe adesão de células B16 às proteínas da matriz-extracelular <i>in vitro</i>	47
4.8	MAB G12F2 não inibe a formação de esferóides em agarose	47
4.9	MAB G12F2 retardou crescimento subcutâneo de células B16 em camundongos singênicos.....	50

4.10	MAb G12F2 promoveu atividade citolítica mediada por complemento contra células B16 <i>in vitro</i>	50
4.11	MAb G12F2 inibiu migração e invasão de células B16 <i>in vitro</i>	53
4.12	MAb G12F2 inibiu o desenvolvimento de metástases pulmonares por células B16 em modelo experimental	53
4.13	G12F2 reconheceu antígeno de diferente peso molecular em células de melanoma humano e em outras linhagens de tumores humanos.....	56
4.14	G12F2 inibiu proliferação de células de melanoma humano Mel85 <i>in vitro</i>	56
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÃO.....	68
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
	APÊNDICE	

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: protocolo para ensaio de inibição do crescimento tumoral por células B16 <i>in vivo</i>	31
Esquema 2: protocolo para ensaio de inibição da formação de metástases pulmonares por células B16	32

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1A:** Resposta anticórpica dos animais imunizados com células B16 pela via subcutânea ou pela via intraperitoneal, avaliada por ELISA *cell*.....34
- Figura 1B:** Resposta anticórpica desenvolvida por animais imunizados com células B16 pela via intraperitoneal, comparada por ELISA *cell*.....34
- Figura 2A:** Reatividade do mAb G12F2 contra extrato total de células B16, avaliada por *Immunoblotting*37
- Figura 2B:** Reatividade do mAb G12F2 contra células de melanoma murino, avaliada por citometria de fluxo 37
- Figura 3A:** Imagens obtidas por Microscopia confocal revelando antígeno de membrana reconhecido por G12F2.....38
- Figura 3B:** Imunofluorescência demonstrando reconhecimento de antígeno expresso na membrana de células B16 por mAb G12F238
- Figura 4:** MAb reconhece molécula de alto peso molecular, 230 kDa, diferente de fibronectina 39
- Figura 5:** MAb reconhece molécula de M_r 230,000 no extrato total de células malignas, mas não no extrato total de células normais40
- Figura 6A:** MAb G12F2 reconhece molécula de M_r 230,000 no extrato total de células de linhagens tumorigênicas derivadas de melanócitos melan-a41
- Figura 6B:** Reatividade do mAb contra células tumorigênicas derivadas de melanócitos melan-a, avaliada por citometria de fluxo 41

Figura 7: Reatividade do mAb G12F2 contra variantes mais e menos metastáticas de células B16, avaliada por <i>Immunoblotting</i>	43
Figura 8: Titulação por ELISA da ascite G12F2 e ascite controle precipitadas com sulfato de amônio.....	45
Figura 9A: MAb G12F2 inibe proliferação de células B16 <i>in vitro</i>	46
Figura 9B: MAb G12F2 inibe proliferação de células B16 <i>in vitro</i>	46
Figura 10: MAb G12F2 não inibe adesão de células B16 às proteínas de matriz-extracelular <i>in vitro</i>	48
Figura 11: MAb G12F2 não inibe formação de esferóides em gel por células de melanoma murino B16	49
Figura 12: MAb inibe o desenvolvimento do nódulo tumoral <i>in vivo</i>	51
Figura 13: MAb G12F2 promove atividade citolítica mediada por complemento <i>in vitro</i>	52
Figura 14A: MAb G12F2 inibe a migração de células B16 <i>in vitro</i>	54
Figura 14B: MAb inibe a invasão em Matrigel por células B16	54
Figura 15A: MAb G12F2 inibe a formação de metástases pulmonares <i>in vivo</i>	55
Figura 15B: MAb G12F2 inibe a formação de metástases pulmonares <i>in vivo</i>	55
Figura 16: MAb G12F2 reconhece molécula de M_r 67,000 em melanoma humano e M_r 75,000 em carcinomas humanos.....	57
Figura 17: MAb G12F2 inibe proliferação de células de melanoma humano <i>in vitro</i>	58

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Relação de marcadores moleculares empregados para diagnóstico de melanoma humano 12
- Tabela 2:** Relação de linhagens celulares, respectivos meios de cultura e solução de descolamento empregado na manutenção das linhagens em cultura 20
- Tabela 3:** Composição dos SDS-PAGE, de separação e empacotamento, para análise de amostras protéicas em condições redutoras24

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACS/ TMS1	<i>target of methylation-induced silencing</i>
AEBSF	<i>4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride</i>
Akt/ PKB	proteína cinase B
ALCAM	molécula de adesão celular de leucócito ativado
APAF-1	fator ativador de plaquetas do tipo-1
APC	célula apresentadora de antígeno
ATF-1	<i>(activating transcription factor)-1</i>
bFGF	fator de crescimento basal de fibroblasto
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDK2	ciclina-2 dependente de cinase
c-kit/CD117	cinase de células progenitoras
DAB	diaminobenzidina
DAPI	<i>4', 6'-diamidine-2-pheyilindole</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxiribonucléico
EDTA	ácido etileno diaminoacético
ELISA	<i>Enzyme linked Immunosorbent assay</i>
EGF	fator de crescimento epidermal
EGFR	receptor para fator de crescimento epidermal
EMMPRIN	indutor extracelular de metaloprotease de matriz
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FAP	proteína ativadora de fibroblasto
FAS/CD95	receptor para apoptose
FASL	proteína transmembrânica ligante ao FAS
FITC	isotiocinato de fluoresceína
GD	<i>disialoganglioside</i>
GM	<i>monosialoganglioside</i>
gp	glicoproteína
gp100/HMB45	proteína melanossomal
h-CD/ CNh1	<i>caldesmon-h/ calponin-h</i>
HEPES	ácido N-2-hidroxietilpiperazina e-N-Etano-sulfônico

HLA	antígeno leucocitário humano
ICAM	molécula de adesão intercelular
IL	interleucina
ILK	cinase tipo integrina
Ig	imunoglobulina
i.p.	intraperitoneal
kDa	quilo Dalton
Ki67/MIB-1	marcador de proliferação celular
MAGE	gene associado ao melanoma
MAb	anticorpo monoclonal
MART-1/ Melan-a	antígeno associado ao melanoma reconhecido por célula T
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
MICA	cadeia alfa relacionada ao MHC classe I
MICB	cadeia beta relacionada ao MHC classe I
MC1R	receptor-1 para melanocortina
MMP	metaloprotease de matriz
MITF	fator de transcrição associado à microftalmia
MTAP	fosforilase metiltioadenosina
MT1-MMP	metaloprotease de matriz de membrana tipo -1
MUM-1	fator-1 do mieloma múltiplo
OPD	<i>o-phenylenediamine</i>
PAI	inibidor do ativador de plasminogênio
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular
PE	ficoeritrina
PMA	<i>phorbol myristate acetate</i>
PMSF	<i>phenylmethylsulfonylfluoride</i>
PPM	padrão de peso molecular
PTEN	supressor tumoral localizado no cromossomo 10
q.s.p.	quantidade suficiente para
RNA	ácido ribonucléico
s.c.	subcutâneo
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>

SKI	inibidor de cinase esfingosina
t-PA	ativador de plasminogênio tipo tecidual
TRP	proteína relacionada à tirosinase
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
VCAM-1	molécula de adesão celular vascular
u-PA	ativador de plasminogênio tipo uroquinase
u-PAR	receptor do ativador de plasminogênio tipo uroquinase

RESUMO

Melanomas se destacam entre os tumores sólidos por apresentar alto potencial de malignidade e incidência crescente, especialmente entre indivíduos jovens. Identificação de marcadores moleculares em melanomas é de enorme interesse para uso clínico e para estudos relacionados ao seu desenvolvimento. A linhagem de melanoma murino B16 tem sido amplamente empregada visando melhor compreensão do processo metastático. **Objetivo:** identificar moléculas na superfície de células B16, empregando anticorpos monoclonais, que apresentem função biológica importante para essas células, bem como investigar expressão de moléculas reconhecidas pelos mesmos mAbs em melanoma humano. **Métodos:** camundongos C57Bl/6 foram imunizados com células B16 irradiadas para produção de híbridos produtores de mAb. **Resultados:** após fusão foi obtido mAb da classe IgM, designado G12F2, que reconheceu uma única banda de aproximadamente 230 kDa em extrato total de células B16. A molécula era expressa na superfície celular e não por células não tumorigênicas, como fibroblastos ou melanócitos melan-a. Células não tumorigênicas, derivadas de melan-a, também não a expressaram ao passo que células tumorigênicas, de mesma origem, expressaram-na em grande quantidade. Variante menos metastática da linhagem B16 expressou menor quantidade desta molécula quando comparado à variante mais metastática. A neutralização da molécula de 230 kDa com mAb G12F2 inibiu proliferação, migração e invasão por células B16 *in vitro*. Também nestas condições, G12F2 promoveu atividade citolítica contra células B16, mediada por complemento. Por outro lado, adição *in vitro* de mAb G12F2 em nada alterou adesão das células B16 à fibronectina e laminina, ou adesão célula-célula. *In vivo*, o tratamento com mAb G12F2 inibiu crescimento do nódulo tumoral e formação de metástases pulmonares. Quando testado contra extrato de tumores de origem humana, como carcinoma e melanoma, mAb G12F2 reconheceu banda de 75 e 67 kDa, respectivamente. Por fim, foi demonstrado que mAb inibiu proliferação de células de melanoma humano *in vitro*. **Conclusões:** a molécula de 230 KDa parece ter importância durante crescimento do melanoma murino; identificação de molécula homóloga em melanoma humano fornecerá subsídios para diagnóstico e protocolos visando imunoterapia.

1 INTRODUÇÃO

Melanomas correspondem às neoplasias potencialmente letais cuja incidência tem aumentado nas últimas décadas; somente nos EUA, um em cada 75 indivíduos caucasianos desenvolve a doença (Balch, Reintgen *et al.* 1997; Sauter & Herlyn 1998; Komenaka, Hoerig *et al.* 2004; Tharhini, Agarwala *et al.* 2006). Em contraste com outros tipos de câncer, afeta populações relativamente jovens, apresentando alto potencial para metastatização e baixa resposta aos métodos terapêuticos convencionais, como quimioterapia e radioterapia (Li & Herlyn 2000). Em 90% dos casos, é diagnosticado em estágio inicial tornando possível a cura por intervenção cirúrgica (Kim, Dessureault *et al.* 2002). Entretanto, há pobre prognóstico para pacientes com melanoma em estágio mais avançado caracterizado por envolvimento de linfonodos regionais e ocorrência de metástases distantes. Nestes casos, a taxa de sobrevida média é de respectivamente, 24 e 06 meses (Kim, Dessureault *et al.* 2002).

O primeiro registro da doença é creditado a Hipócrates (460 a.c), que descreveu sobre tumores negros disseminados. Séculos mais tarde, paleopatologistas encontraram metástases ósseas difusas e massas melanóticas circulares na pele de múmias peruanas do século IV a.c. Contudo, apenas em 1806, René Laennec, da Faculdade de Medicina de Paris, descreveu e caracterizou 'la melanose' (Chudnovsky, Khavari *et al.* 2005).

Tumorigênese e modelo de progressão em melanomas

Melanomas humanos correspondem ao primeiro modelo empregado em estudos experimentais, uma vez que apresentam fácil adaptação à cultura de células e respondem muito fracamente aos tratamentos convencionais com quimioterapia e radioterapia (Houghton 2001). Originam-se de células pigmentadas, denominadas melanócitos, presentes na camada basal da pele e, em outras superfícies epiteliais como nos olhos e ouvido interno (Herlyn, Berking, Satyamoorthy 2000; Houghton 2001; Chudnovsky, Khavari *et al.* 2005). São originários da crista neural, migrando para a pele, mucosa ectodérmica, úvea e meninges durante a embriogênese.

Na pele, melanócitos normais permanecem sob controle de queratinócitos através de contato célula-célula mediado por E-caderina, molécula cuja expressão é diminuída em nevo e mais ainda em melanomas. A perda da expressão de E-caderina é compensada pela expressão de N-caderina, constituindo importante passo na

transformação de melanócitos em melanoma. Após escape do controle exercido por queratinócitos, melanócitos transformados deixam a epiderme estabelecendo comunicação com fibroblastos, células endoteliais e outros componentes estromais da derme. Estes, por sua vez, liberam fatores de crescimento e produzem proteínas da matriz-extracelular, que promovem crescimento e aumento da invasividade em melanócitos transformados (Bogeriender & Herlyn 2002). Em resumo, o desenvolvimento tumoral depende de uma série de eventos complexos influenciados coletivamente tanto por fatores intrínsecos à célula transformada quanto por fatores do microambiente tais como fatores de crescimento e citocinas (Smalley & Herlyn 2003).

O melanoma cutâneo pode ser dividido em diversos subtipos conforme localização anatômica e o padrão de crescimento (Chudnovsky, Khavari *et al.* 2005). De acordo com sua origem, os melanomas podem ser classificados como cutâneo, ocular, de mucosa ou de meninge.

Quanto à progressão, caracteriza-se por etapas que diferem no curso clínico e características histopatológicas (Li & Herlyn 2000). A proliferação de melanócitos pode gerar nevo melanocítico benigno ou lesão pré-maligna designada nevo displásico, que em alguns casos é precursor da neoplasia. Durante processo de transformação maligna, células de melanoma passam por fase de crescimento radial (RGP) podendo ou não alcançar crescimento vertical (VGP). A fase de crescimento radial correspondente à fase inicial do melanoma primário, caracterizado pelo crescimento horizontal na epiderme. Ainda neste estágio, o melanoma é curável por excisão cirúrgica. Na fase de crescimento vertical, o melanoma encontra-se em estágio mais avançado e com repertório de moléculas de adesão alterado. Nesta fase, a derme é invadida e o tumor adquire capacidade para metastatizar, culminando no último estágio do desenvolvimento que é formação de metástases em sítios distantes do local de origem do tumor primário (Li & Herlyn 2002; MacGary, Heimberger *et al.* 2002; Chudnovsky, Khavari *et al.* 2005). Alternativamente, como em todos os modelos de progressão, melanócitos imaturos podem originar qualquer uma das fases tumorais propriamente ditas (Clark, Elder *et al.* 1984; Clark 1991).

Embora caracterizados pelo alto potencial de malignidade, nem todas as células do melanoma primário estarão aptas a concluir com sucesso as etapas necessárias até desenvolvimento de metástases. Segundo Fidler (1978), metástase é um processo seletivo que representa a sobrevivência não randômica de células tumorais. Assim,

pode-se concluir que metástases resultam do crescimento seletivo e não aleatório do tumor.

Respostas às questões concernentes ao processo metastático foram fornecidas por estudos realizados com melanoma murino B16, gerado espontaneamente em camundongos C57Bl/6 e isolado por Isaiah Fidler (1973). Em um de seus trabalhos, Fidler (1978) obteve variantes com diferentes potenciais de malignidade a partir da linhagem parental B16. Para tanto, células B16 foram injetadas endovenosamente em camundongos singênicos e após três semanas, as primeiras colônias formadas no pulmão foram dissecadas e adaptadas à cultura de células. A primeira variante selecionada *in vivo*, B16F1, foi re-injetada em novos animais e após três semanas outras colônias foram formadas no pulmão e novamente dissecadas para posterior cultivo. Assim, sucessivamente, dez variantes foram selecionadas *in vivo* com crescente potencial metastático, uma vez que células B16F10 apresentaram capacidade superior à linhagem parental para metastatização. O estudo mostrou claramente que células B16 são heterogêneas e que poucas células de potencial altamente maligno pré-existem na linhagem parental. Poste *et al.* (1982) estudaram variantes advindas da linhagem B16, encontrando grande diferença de invasividade. Confirmando estes dados, Johnson *et al.* (1987) encontraram grande variação no repertório de moléculas de membrana entre as variantes a partir de estudo realizado com anticorpos monoclonais. Constatada a heterogeneidade e instabilidade da linhagem parental, os autores concluíram que estas características adquiridas podem ser atribuídas principalmente à expressão epigenética de moléculas relacionadas especificamente ao comportamento mais metastático, e não necessariamente por mutações somáticas. Sautins *et al.* (1987) concluíram que células B16 correspondem a importante modelo para estudo do processo metastático em melanomas.

Eventos sequenciais contribuem para seleção de clones com crescente grau de malignidade (Chow & Greenberg 1980; Fidler & Radinsky 1990). Durante a progressão tumoral, pequena proporção de células transformadas sofre alteração quanto à morfologia, marcadores citogenéticos, cinética de crescimento, produtos celulares, receptores, capacidade de metastatização e por fim, menor sensibilidade aos agentes terapêuticos (Prehn 1970; Hakasson & Trope 1974; Heppner 1984). Embora amplamente estudado devido a sua importância clínica, a biologia do processo metastático permanece pouco esclarecida. Através de técnicas moleculares, em especial pela análise de padrões de expressão por *microarrays*, muitas moléculas e

genes têm sido identificados como fatores possivelmente relacionados aos mecanismos de metástase. Contudo, tais estudos não produziram informações conclusivas sobre como estas moléculas e genes estariam contribuindo para o processo (Chambers, Groom, MacDonald 2002).

A Patogênese e fatores genéticos/epigenéticos determinantes para o desenvolvimento do Melanoma

A etiologia de melanomas permanece pouco esclarecida, porquanto três fatores devem ser considerados: (i) indivíduos caucasianos apresentam risco dez vezes maior do que indivíduos negros para desenvolver melanoma, se expostos de forma intensa e intermitentemente ao sol; (ii) estudos epidemiológicos apontam para a participação da luz ultravioleta dos raios solares como fator desencadeador da doença; (iii) melanomas de origem genético-familiar correspondem a até 10% dos casos (Sauter & Herlyn 1998; Slominski, Wortsman *et al.* 2001). Em 1820, William Norris sugeriu influência da hereditariedade na patogenia de melanomas, baseado na descrição de uma família com vários membros que desenvolveram a neoplasia, muitos dos quais apresentando metástases (Chudnovsky, Khavari *et al.* 2005). A existência da síndrome familiar, conhecida como síndrome do melanoma ou do nevo atípico, foi descrita simultaneamente por Clark & Lynch (1978).

Além do tipo de pele e dos fatores genéticos e ambientais, a susceptibilidade ao melanoma pode ser determinada pela idade e sexo, bem como por fatores constitucionais como quantidade, tamanho e tipo das lesões pigmentadas na pele (Slominski, Wortsman *et al.* 2001).

Nos últimos vinte anos, o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular tem contribuído significativamente para o estudo genético e epigenético da carcinogênese. Sabe-se que intensa exposição à luz ultravioleta durante a infância, em especial do espectro *b*, implica em alto risco para desenvolvimento de melanoma uma vez que promove instabilidades no DNA por acúmulo de dímeros de timina e inativação dos mecanismos de reparo (Cifone & Fidler 1981; Sauter & Herlyn 1998; Rees 2004; Nestlé, Burg, Dummer 1999), inibição de anti-oxidantes (Fuchs, 1981; Sauter, 1998), supressão da resposta imune (Penn 1985; Sauter & Herlyn 1998) e indução da expressão de fatores de crescimento em melanócitos como fator de crescimento transformante (TGF- α) e outros de origem neural (Sauter & Herlyn 1998).

Melanomas se originam devido ao acúmulo de mutações em genes críticos para proliferação, diferenciação e morte celular. A progressão clínica e histológica durante as fases de desenvolvimento do melanoma parece corresponder ao acúmulo destas mutações genéticas, que podem ser anormalidades cromossômicas, mutações em oncogenes e genes supressores de tumor (Slominski, Wortsman *et al.* 2001). Análise cariotípica de nevos displásicos e melanomas demonstra mudanças não-randômicas nos cromossomos 1, 6, 7, 9 e 10 (Sauter & Herlyn 1998).

Grande parte do conhecimento adquirido sobre anormalidades cromossômicas e mutação em melanoma foi possível através do estudo da síndrome familiar do melanoma. Embora a síndrome ocorra com certa raridade, está associada à mutação, perda de heterozigose e deleção no *locus* p16 do cromossomo 9, importante gene supressor que controla o ciclo celular. Análise de pacientes com melanoma familiar provenientes da Austrália, onde a incidência da neoplasia é alta, apontam para mutação em outros genes associados ao p16, também localizados no cromossomo 9. Outros estudos reportam ainda mutações nos *loci* p14, p15 e p19, que codificam para outras proteínas envolvidas no controle do ciclo celular (Slomsky, Wortsman *et al.* 2001; Chudnovsky, Khavari *et al.* 2005).

Melanoma: relação com sistema imunológico e desenvolvimento de Imunoterapias

O conceito de imunovigilância, baseado na habilidade do sistema imune em distinguir entre o próprio e não próprio foi introduzido independentemente por Burnet e Thomas. Porém, tal conceito tornou-se bastante discutido para modelos experimentais em câncer, uma vez que a imunidade tumor-específica coexiste à progressão tumoral, constituindo-se no principal paradoxo da imunologia de tumores (Becker & Bröcker 1995; Klein & Klein 2005).

Evidências histológicas de células imunocompetentes infiltradas na região peritumoral, ocorrência esporádica de regressão espontânea e aumento da malignidade em pacientes imunossuprimidos comprovam a participação do sistema imune na tentativa de manutenção da homeostasia (Sikora 1982). Mais ainda, melanócitos transformados tendem a expressar antígenos em sua superfície que, sendo reconhecidos pelo sistema imune, geram resposta celular e humoral (Colnaghi, Menard *et al.* 1982; Herlyn, Menrad & Koprowski 1990; Clynes, Takechi *et al.* 1995).

Todavia, células tumorais respondem ao sistema imune desenvolvendo mecanismos de evasão que lhes confere resistência à imunovigilância.

Células de melanoma podem contribuir com a tolerância periférica através de perda ou falha na apresentação de seus antígenos associados, pela ausência de co-estímulo durante apresentação para células T ou ainda, ausência de expressão do antígeno leucocitário humano (HLA). Por outro lado, células de melanoma que não expressam HLA se tornam vulneráveis à destruição por células *natural killer* (NK); assim, não raro ocorre perda ou regulação negativa da expressão de MICA ou MICB, moléculas induzidas por estresse que se ligam ao receptor NKG2D em células NK (Komenaka, Hoerig & Kaufman 2004), evitando morte celular. Além dos mecanismos de evasão citados, vários outros têm sido alvos de estudo para desenvolvimento de novas estratégias visando aumento da resistência imunológica.

Em contraponto ao progresso na oncologia experimental, tratamentos para pacientes com melanoma continuam limitados. Portadores de melanoma metastático são tratados por quimioterapia, interleucinas (principalmente IL-2), ativação de linfócitos do infiltrado tumoral (TIL), transferência de linfócitos autólogos ativados e combinações bioquímicas (drogas quimioterápicas associadas com interleucinas ou interferons α e γ) que quando utilizados geram 20 a 30% de resposta clínica (Rosemberg, Yang *et al.* 1994; Rosemberg 1997).

Interleucina-2 foi utilizado como primeiro tratamento imunoterápico capaz de gerar resposta clínica efetiva em pacientes com melanoma metastático (Rosemberg 1984 e 2001). IL-2 promove proliferação, diferenciação e recrutamento de células T, B e NK, além de promover atividade citolítica de células T CD8⁺ e ativação de linfócitos T CD4⁺ (Lode 2000). Pode ser administrada sozinha ou combinada com células imunologicamente ativas por transferência adotiva na então chamada imunização passiva. Para a técnica são utilizadas basicamente dois tipos de células: linfócitos ativados *killer* (LAK) e linfócitos do infiltrado tumoral (Tahini, Agarwala *et al.* 2006).

A identificação de antígenos associados ao melanoma favorece desenvolvimento de vacinas contra alvos específicos do tumor (Hemmila & Chang 1999; Wagner, Hafner *et al.* 2005). Embora atualmente não haja nenhuma vacina capaz de promover destruição da célula tumoral ou garantir maior sobrevida aos pacientes, vários protocolos de vacinação estão sendo avaliados em modelos pré-clínicos (Lewis & Houghton 1995; Lewis 2004). Estratégias de vacinação contra câncer baseiam-se no princípio da imunização ativa em que o sistema imune do hospedeiro é

induzido a gerar mecanismos de defesa após estímulo. As primeiras vacinas contra câncer foram desenvolvidas a partir de células tumorais autólogas, irradiadas ou atenuadas, associadas ou não a imunomoduladores (Key & Hanna 1981; Halpern, Biozzi *et al.* 1966). Técnicas de clonagem e identificação de novos antígenos tumorais impulsionaram nova fase no desenvolvimento de vacinas com peptídeos naturais ou sintéticos.

Alguns antígenos utilizados em vacinas estimulam produção de anticorpos protetores. Neste grupo destacam-se os gangliosídeos GM₂ (Livingston, Wong *et al.* 1994; Chapman, Lonberg & Houghton 2000), expresso na superfície de melanomas e no soro de pacientes portadores da neoplasia e GD₃ (Pukel, Lloyd *et al.* 1982, Helling, Calves *et al.* 1993). Outras moléculas antigênicas são empregadas em vacina por induzirem resposta imune via linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, como acontece com MAGE-1, MAGE-3, MART-1, gp100, tirosinase e gp75. Embora a maioria destes protocolos tenha alcançado resultados positivos, existem controvérsias quanto à eficiência da vacinação com peptídeos, já que em muitos deles foram detectadas falhas quando quantidades exacerbadas de peptídeos eram administradas. Neste caso, peptídeos livres na circulação podem se ligar ao MHC classe I e serem apresentados aos linfócitos T na ausência de co-estímulo (Nestle, Burg & Dummer 1999).

Proteção anti-tumoral pode ser conferida por proteínas de choque térmico (HSP), tanto em modelo animal quanto em seres humanos. HSPs ativam linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺; induzem resposta imune inata por ativação de células NK e secreção de citocinas, além de promoverem maturação de células dendríticas. Atuam como *chaperones*, mediando transporte de peptídeos através da célula e sugere-se que o complexo formado por HSPs/antígenos de baixo peso molecular seja determinante para ativação do sistema imune contra células tumorais (Srivastava 2000; Srivastava & Amato 2001).

Não menos estudadas, vacinas empregando células dendríticas, carregando peptídeos antigênicos, também parecem conferir proteção contra melanoma em estudos experimentais. Células dendríticas, consideradas as principais apresentadoras profissionais de antígeno, têm importante participação na ativação de células T *naïve*. Protocolos com vacinas de células dendríticas carregando antígenos ou fusionadas com célula tumoral, passam por contínuo desenvolvimento, apresentando resultados promissores também em estudos clínicos. Por fim, protocolos de vacinação podem

abranger uso de RNA e DNA com ou sem vetores virais, expressando antígenos que ativam células T após apresentação por APCs.

Pacientes com alto risco de recorrência de melanoma são submetidos à terapia adjuvante com interferon $\alpha 2b$ (IFN- α), chegando a apresentar em média 3.8 anos sem recorrência da doença, comparada à média de 2.8 anos apresentado por pacientes não submetidos a qualquer tratamento (Kirkhood, Ibrahim *et al.* 2000). Embora aprovado para uso em pacientes com melanoma estágio III, pós-resssecção cirúrgica, existem controvérsias quanto às doses de IFN- α que devem ser administradas já que freqüentemente induzem efeitos tóxicos e apenas 25% dos pacientes tratados conseguem completar a terapia (Lens & Dawes 2002).

Apesar dos significativos avanços em diagnóstico, técnicas cirúrgicas e terapias adjuvantes, a disseminação do tumor primário levando à formação de metástases resistentes à quimioterapia convencional responde pela principal causa de mortes por câncer (Fidler 1978 e 2002). Alguns fatores contribuem para a falha do tratamento convencional, como por exemplo, a heterogeneidade biológica de células neoplásicas que compõem subpopulações com diferentes propriedades angiogênicas, invasivas e metastáticas, preexistentes dentro da neoplasia (Fidler 2002).

Anticorpos Monoclonais como ferramentas para imunoterapias de melanoma

A tecnologia de anticorpos monoclonais (mAbs) teve início em 1975, quando Köhler & Milstein desenvolveram híbridos de mieloma murino com esplenócitos de camundongos imunizados contra hemácias de carneiro e obtiveram anticorpos monoclonais específicos contra este antígeno. Mais tarde, em 1978, foram descritos os primeiros anticorpos monoclonais contra antígenos tumorais secretados por hibridoma (Koprowsky, Steplewski *et al.* 1978).

Vinte anos após o primeiro anticorpo monoclonal contra câncer, cerca de 70 antígenos expressos por células de melanoma humano já haviam sido definidos por anticorpos monoclonais (Herlyn, Menrad & Koprowski 1990). Anticorpos monoclonais possibilitam investigação quantitativa e qualitativa de antígenos expressos intracelularmente e na superfície de células neoplásicas. Anteriormente ao desenvolvimento de anticorpos monoclonais não era possível corretamente avaliar a complexidade antigênica da superfície de células neoplásicas humanas (Sikora 1982). Além da utilização experimental para caracterização de novos antígenos, anticorpos monoclonais têm sido amplamente empregados na clínica para diagnóstico e

imunoterapia contra vários tipos de tumores humanos, inclusive melanomas (Hellström, Garrigues *et al.* 1983; Kantor, Albino & Ferrone 1986; Trimpe & Zwilling 1986; Shih, Elder *et al.* 1994; Ohnmacht & Marincola 2000).

Anticorpos são macromoléculas de estrutura complexa com múltiplas funções. Podem agir tanto de maneira indireta, mediando resposta via sistema imune, quanto de maneira direta sobre proliferação celular se dirigidos contra moléculas de sinalização. Embora em alguns casos possam conferir efeito agonista, é desejável que se comportem como antagonistas para efeito potencialmente terapêutico. Anticorpos monoclonais antagonistas podem remover ou “desligar” seu antígeno-alvo resultando em efeito anti-proliferativo. Por conseguinte, a progressão do ciclo celular é bloqueada, mantendo células na fase G0/G1 podendo, subseqüentemente, entrar em apoptose (Eccles 2001).

Alguns anticorpos monoclonais antagonistas aumentam a ubiquitinação e degradação de seu alvo e outros não regulam negativamente a expressão de seu alvo, mas competem efetivamente com fatores de crescimento que se ligam e ativam o receptor. Outros efeitos biológicos diretos causados por mAbs estão relacionados à inibição de funções biológicas necessárias durante a progressão tumoral, tais como adesão, migração e invasão, estes últimos, diretamente relacionados e interdependentes (De Vita, Hellman & Rosemberg 1991). Assim, considerando os efeitos diretos dos mAbs, fica clara a multiplicidade de possíveis respostas determinadas pelas propriedades antigênicas do próprio anticorpo, e do contexto celular.

Durante triagem clínica, Vadhan-Raj *et al.* (1988) utilizaram anticorpo monoclonal murino R24, da subclasse IgG3, dirigido contra gangliosídeo GD₃ presente em células de melanoma humano e regressão da massa tumoral foi observada em parcela de pacientes tratados. Em todos eles, porém, foi detectado desenvolvimento de anticorpos anti-idiotípicos. Estes últimos neutralizam anticorpos originais impedindo sua ligação aos seus alvos o que diminui a eficácia do tratamento clínico. Em estudo semelhante, Nasi *et al.* (1997) obtiveram regressão de melanomas em apenas 10 casos no total de 103 pacientes tratados com anticorpo monoclonal R24.

Anticorpos monoclonais anti-GD₃, *in vitro*, são importantes mediadores de funções efectoras como citotoxicidade mediada por complemento e citotoxicidade celular dependente de anticorpo. Em metástase experimental, R24 impede fixação de células tumorais à superfície (Knuth 1986; Chapman, Lonberg & Houghton 1990; McCaffery,

Yao *et al.* 1995). Entretanto, para uso terapêutico, demonstrou maior eficácia quando conjugado a agentes citotóxicos como IL-2. Knuth (1986) destacou o emprego de anticorpos monoclonais específicos 2B2 dirigidos contra GD₃ como alternativa ao uso de R24. Segundo o autor, pequenos fragmentos de melanoma maligno humano heterotransplantados em camundongos *nude* regridem após várias administrações intravenosas daquele anticorpo. Além de GD₃, os gangliosídeos GM₂ e GD₂ também vêm sendo investigados. (Hellström, Brankovan & Hellström 1985; Nishinaka, Ravindranath, Irie 1996; Imai, Landen *et al.* 2005).

Melanócitos em geral, sejam eles normais ou neoplásicos, são dotados de organela citosólica específica denominada melanossoma. Estas organelas secretam várias glicoproteínas de potencial antigênico significativo, entre elas a molécula gp75 cuja expressão ocorre em meios intra e extracelulares. Também contra este antígeno existem anticorpos monoclonais específicos (TA99), usados para imunização passiva em modelo de metástase pulmonar por células B16F10. Neste caso, TA99 revelou grande eficiência na prevenção e erradicação de metástases recém estabelecidas (Chapman, Lonberg & Houghton 1990).

O uso de anticorpos monoclonais contra tumores humanos tem se mostrado promissor em estudos pré-clínicos. Contudo, algumas barreiras que dificultam o tratamento clínico com mAbs devem-se a modulação antigênica resultante de evasão tumoral, bloqueio por antígenos livres, *clearance* pelo sistema imune, reações alérgicas, baixo efeito citotóxico e heterogeneidade antigênica da célula tumoral (Herd 1987). Poucos mAbs têm tido sucesso efetivo como agentes terapêuticos quando administrados contra tumores metastáticos. Este fato tem base na dificuldade em administrar doses consecutivas de anticorpos monoclonais sem que haja maiores efeitos tóxicos ao paciente (Lode, Xiang *et al.* 2000). Transpondo estas dificuldades, bons resultados são alcançados com anticorpos parcial ou completamente humanizados. Técnicas de engenharia genética permitem fragmentação da molécula de anticorpo para que apenas a porção F_{ab} seja administrada, diminuindo efeitos colaterais (Tanner 2005). Atualmente, apenas dois anticorpos monoclonais têm aprovação para uso clínico em tratamento de neoplasias, que são, Rituxan (anti-CD20) contra linfoma não-Hodgkin's e Herceptin [anti- (c-*erbB*-2/HER-2)] contra câncer de mama metastático (Eccles 2000).

Marcadores Tumorais e anticorpos monoclonais no Imunodiagnóstico de melanomas

Muitos antígenos reconhecidos por anticorpos monoclonais têm sido relacionados com desenvolvimento e/ou progressão de melanoma, e, portanto, consideradas marcadores de diferenciação ou de progressão tumoral (Lehmann, Holzmann 1987; Houghton 1994). “Marcadores tumorais” e “antígenos tumorais” são termos atribuídos alternativamente às moléculas reconhecidas por anticorpos monoclonais que, por sua vez, são utilizados como ferramentas no esclarecimento das atividades biológicas e/ou clínicas de relevância apresentadas pelas moléculas que reconhecem. MAbs são empregados com sucesso no diagnóstico de muitas neoplasias, bem como permitem identificação precisa do estágio de desenvolvimento em que estas se encontram (de Wit, Ruitter *et al.*2004).

Moléculas que distinguem tumores da linhagem melanocítica de linhagens não melanocíticas são classificados como marcadores de diferenciação. Atualmente, alguns dos marcadores de diferenciação em melanoma empregados são as proteínas S100, gp100/HMB-45, tirosinase, MART-1/Melan-A e antígeno de alto peso molecular associado ao melanoma (HMW-MAA). Em imunohistoquímica, antígeno S100 apresenta boa sensibilidade, uma vez que é encontrado em quase todas as fases do desenvolvimento tumoral; contudo, apresenta baixa especificidade porque também é expresso por células não melanocíticas. Por sua vez, antígeno melanossomal gp100/HMB-45 é específico para células pigmentadas, mas pouco sensível. O mesmo ocorre para outros antígenos que correspondem às enzimas relacionadas à melanogênese ou produtos advindos da síntese de melanina e melanossoma, de forma que geralmente é utilizada combinação de S100 com pelo menos dois outros antígenos de diferenciação melanocítica. A enzima tirosinase representa potente marcador para melanoma, uma vez que a expressão do seu gene é restrita às células de origem melanocítica. Em melanomas é detectada grande quantidade de mRNA para esta proteína, o que favorece diagnóstico por técnicas de hibridização *in situ*.

Outras moléculas são consideradas marcadores de progressão em melanomas, uma vez que são expressas em apenas uma ou poucas fases durante desenvolvimento do tumor e distinguem lesões benignas de malignas. Estes marcadores são derivados predominantemente de melanócitos, embora alguns componentes do estroma também tenham representatividade neste grupo. Significativo número de marcadores de

progressão tem sido descritos e podem ser caracterizados de acordo com sua função biológica (Tabela 1).

Melanomas expressam antígenos intracelulares reconhecidos por linfócitos T citotóxicos, dos quais se destacam os da família MAGE (Van den Eynde, Peeters *et al.* 1995). A família MAGE compreende 12 genes conhecidos sendo que seis deles são expressos por tumores e não por células normais, exceto células da placenta e testículo (Lassam & Bickford 1992, Sauter & Herlyn 1998).

De maneira geral, o diagnóstico de lesões melanocíticas pode ser obtido através da análise minuciosa de cortes histológicos convencionais; entretanto, marcadores tumorais são de suma importância para diagnóstico de melanomas pobremente diferenciados ou que apresentam padrão histológico heterogêneo. Nestes casos, a partir da imuno-histoquímica pode ser confirmada a origem melanocítica e ainda o tipo da lesão proliferativa, se benigna ou maligna. Para prognóstico da doença, alguns critérios analisados conjuntamente, como espessura da lesão, ulceração e ainda, características histológicas tais como profundidade, taxa mitótica, presença de linfócitos infiltrados e vascularização, revelam o grau de agressividade das células tumorais no melanoma primário. Assim como para diagnóstico, resultados obtidos por imuno-histoquímica contribuem para prognóstico correto do melanoma. Em conseqüência, novos marcadores de diferenciação e progressão são sempre necessários à medida que exames imuno-histoquímicos permanecem sendo de grande utilidade para prognóstico e diagnóstico precoce de melanomas.

Tabela 1: Relação de marcadores de diferenciação e progressão em melanomas, classificados quando à função e expressão durante progressão da neoplasia (de Wit, Ruitter, *et al.* 2004).

Classificação	Marcador	Expressão durante progressão do melanoma	Referências
Marcadores de diferenciação melanocítica	Tirosinase		Orchard 2000
	gp100/ HMB45		Orchard 2002
	Mart-1/ Melan-A		Sundram, Harvell <i>et al.</i> 2003
	S100		Park, Min 2003
	HMW-MAA		Ziai, Imberti <i>et al.</i> 1987
	TRP-1		Meije, Mooi <i>et al.</i> 2000
	TRP-2		Virador, Matsunaga <i>et al.</i> 2001
	MITF		Dorvault, Weilbaecher <i>et al.</i> 2001
	MUM-1		Sundram, Harvell <i>et al.</i> 2003

Marcadores de progressão em melanoma	MC1R		Salazar-Onfray, Lopez <i>et al.</i> 2002
	VEGF	+	Simonetti, Lucarini <i>et al.</i> 2002
	VEGF-3	+ (vasos sanguíneos)	Clarijs, Schalkwijk, Hofmann <i>et al.</i> 2002
	bFGF	+	Ueda, Funasaka <i>et al.</i> 1994
	TGF- β	+	Moretti, Pinzi <i>et al.</i> 1999
	EGF/EGFR	+	De Wit, Moretti <i>et al.</i> 1992
	Osteonectina	+	Ledda, Bravo <i>et al.</i> 1997
	Receptor para transferrina	+	Soyer, Smolle <i>et al.</i> 1989
	c-kit	-	Ohashi, Funasaka <i>et al.</i> 1996
	PTEN	-	Tsao, Mihm <i>et al.</i> 2003
	Akt/PKB	+	Dhawan, Singh <i>et al.</i> 2002
	ATF-1	+	Bohm, Moellmann <i>et al.</i> 1995
	AP-2	-	Woenckhaus, Giebel <i>et al.</i> 2003
	Ki67/ MIB-1	+	Smolle, Soyer, Kerl 1989
	PCNA	+	Niemann, Argenyi 1993
	Ciclina A, B, D1/ D3, E	+	Tang, Li <i>et al.</i> 1999
	CDK2	+	Georgieva, Sinhá, Schadendorf 2001
	p16 ^{INK4a}	-	Reed, Loganzo <i>et al.</i> 1995
	p21 ^{WAF1}	+	Trotter, Tang, Tron 1997
	p27 ^{kip1}	-	Florenes, Maelandsmo <i>et al.</i> 1998
	p53	-	Korabiowska, Brinck, Hoening <i>et al.</i> 1995
	HDM2	+	Polsky, Bastain <i>et al.</i> 2001
	GADD	-	Korabiowska, Betke <i>et al.</i> 1997
	α/β -catenina	-	Zhang, Hersey 1999
	E-caderina	-	Tang, Eller <i>et al.</i> 1994
	N-caderina	+	Hsu, Wheelock <i>et al.</i> 1996
	Integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_3\beta_1$	+	Danen, Ten Berge <i>et al.</i> 1994
	ILK	+	Dai, Makretsov <i>et al.</i> 2003
	CD44s	-	Ranuncolo, Ladedda <i>et al.</i> 2002
	ICAM	+	Johnson 1999
Mel-CAM/ MUC18	+	Johnson 1999	
ALCAM	+	Van Kempen, van den Oord <i>et al.</i> 2000	
VCAM-1	-	Denton, Stretch <i>et al.</i> 1992	
L1 (CD171)	+	Fogel, Mechttersheimer <i>et al.</i> 2003	
CD63	-	Kondoh, Ueda <i>et al.</i> 1993	
Fascina	-	Goncharuk, Ross, Carlson 2002	

	MMP-2	+	Hofmann, Westphal <i>et al.</i> 2000
	MMP-9	+	Van der Oord, Paemen <i>et al.</i> 1997
	MT1-MMP	+	Hofmann, Westphal <i>et al.</i> 2000
	EMMPRIN	+	Van der Oord, Paemen <i>et al.</i> 1997
• Proteases e fatores relacionados	Sistema ativador do plasminogênio (u-PA, u-PAR, t-PA, PAI-1, PAI-2)	+	Delbaldo, Masouye <i>et al.</i> 1994
	Catepsina	+	Kageshita, Yoshii <i>et al.</i> 1995
	FAP	+	Huber, Kraut <i>et al.</i> 2003
	APAF-1	-	Paggi, Catricala <i>et al.</i> 2003
	Metalotioneína	+	Zelger, Hittmair <i>et al.</i> 1993
	ACS/TMS1	-	Guan, Sagara <i>et al.</i> 2003
	Esqueletrofina	-	Takeuchi, Heng <i>et al.</i> 2003
• Outras proteínas	MTAP	-	Behrmann, Wallner <i>et al.</i> 2003
	Versican	+	Touab, Villena <i>et al.</i> 2002
	h-CD/ CNh1	-	Koganehira, Takeoka <i>et al.</i> 2003
		(vasos sanguíneos)	
	SKI	+	Reed, Bales <i>et al.</i> 2001
	HLA classe I	-	Ruitter, Bergman <i>et al.</i> 1984
	HLA classe II	+	Van Duinen, Ruitter <i>et al.</i> 1988
	CD40	+	Van der Oord, Maes <i>et al.</i> 1996
• Imunorreguladores	CD26	+	Van der Oord 1998
		(RGP)	
	FAS/ FAS-ligante	+	Bullani, Wehrli <i>et al.</i> 2002
	FLIP	+	Bullani, Huard <i>et al.</i> 2001

2 OBJETIVOS

Investigando e caracterizando novos antígenos de membrana associados ao melanoma, abrem-se novas frentes de estudos referentes ao seu desenvolvimento. Ainda, podem vir a ser marcadores de diferenciação ou progressão tumoral para diagnóstico se expressos também por melanomas de origem humana. Muitos antígenos tumorais com importância clínica foram identificados através de anticorpos monoclonais. Portanto, são objetivos deste trabalho:

- Obtenção de anticorpos monoclonais para moléculas expressas na superfície de células B16;
- Caracterização das moléculas-alvo e definição como marcadores tumorais;
- Caracterização das funções celulares alteradas pelos anticorpos monoclonais *in vitro* e *in vivo*;
- Investigação da reatividade dos anticorpos monoclonais com células tumorais de origem humana.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Soluções Básicas

- PBS-leite desnatado: 5% de leite desnatado (p/v) em PBS para uso.
- PBS- Tween- leite desnatado: 0,025% de leite desnatado em pó (p/v); 0,25% de Tween-20 (v/v) em PBS para uso.
- PBS-Tween: 0,05% de Tween-20 em PBS para uso.

3.1.2 Soluções para ELISA *cell*

- Glutaraldeído: 0,5% de glutaraldeído (v/v) em PBS para uso.
- Glicina: glicina 0,1M em PBS para uso.
- Peróxido de Hidrogênio: 3% de Peróxido de Hidrogênio em PBS para uso.
- Tampão para OPD: Na₂PO₄ 0,4M; Ácido Cítrico 0,4M; Peróxido de Hidrogênio.
- Bloqueio da Revelação: Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) 4N em Água destilada.

3.1.3 Soluções para SDS-PAGE

- Acrilamida (estoque): 30% de acrilamida (p/v); 0,8% de bis-acrilamida (p/v) em Água destilada.
- Tampão *Lower* (para 200 ml): 36,4g de Tris-Base; 0,8g de SDS em Água destilada.
- Tampão *Upper* (para 50ml): 0,3g de tris-base; 0,2% de SDS em Água destilada.
- Tampão de Corrida (estoque): 3,03% de Tris-base; 14,4% de glicina e 1% de SDS em Água destilada.
- Tampão de Amostra (estoque): Tris-HCl 62 mM, pH 8.8, contendo 0,2% (p/v) de SDS, β-mercaptanol 50 mM, 0,005% (p/v) de azul de bromofenol e 10% (v/v) de glicerol.

3.1.4 Soluções para Coloração por *Coomassie Blue*

- Corante de azul de *Coomassie*: 0,2% de *Coomassie* R250 em 50% de metanol e 10% de ácido acético.

- Descorante forte para *Coomassie*: 50% de metanol, 10% de ácido acético e 40% de água destilada.

3.1.5 Soluções para *Immunoblotting*

- Tampão de transferência: Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e 20% de metanol.
- Corante de Ponceau: 0,5% (p/v) de Ponceau S em 5% de ácido acético.
- Tampão para DAB: 5,0 mg de DAB; 20µL de Peróxido de Hidrogênio em 7,5 ml de Tampão Tris- HCl (0,1M/ ph= 7,5).

3.1.6 Soluções para purificação de Fibronectina

- Tampão de transferência: Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e 20% de metanol.
- Tampão Tris-HCl 50mM: 7,88 g de Tris-HCl para 1000ml de Água Destilada.
- Tampão Tris-Uréia 4M: 240g de uréia para 1000ml de tampão Tris-HCl 50mM.

3.1.7 Solução para precipitação de anticorpos

- Sulfato de amônio 70%: 76% de sulfato de amônio (p/v) em água destilada.

3.1.8 Soluções para cultura de células

- Meio R-10%: meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino.
- Meio R-5%: meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino.
- Meio R-2%: meio RPMI 1640 suplementado com 2% de soro de camundongo, inativado à 56°C.
- Meio HAT: (hipoxantina, aminopterina e timidina): 1,0mL do meio HAT (100 vezes concentrado), 20% de SFB e 100 mL de RPMI 1640 (q.s.p).
- Meio HT-20 (hipoxantina e timidina): 2,0mL do meio HT (50 vezes concentrado), 20% de SFB.e 100mL de RPMI 1640 (q.s.p).
- Meio HT-10 (para 100 ml): 2,0mL do meio HT (50 vezes concentrado), 10% de SFB.em RPMI 1640 (q.s.p).
- Meio D-10%: meio D-10% suplementado com 10% de soro fetal bovino.
- Meio para Congelamento: 45% de RPMI 1640; 45% de soro fetal bovino e 10% de DMSO.
- PBS-EDTA 1,5 mM (para 1L): 10% de PBS para uso (estéril); 0,55g de EDTA em Água Milli-Q, q.s.p (ph=7,0).

- Tampão para lise de células (para 10 ml): 0,175g de Cloreto de Sódio; 0,121g de Tris-base; 200µl de NP-40 em Água Milli-Q (q.s.p).

3.1.9 Reagentes

- Reagentes foram obtidos de Merk (Darmstadt, Alemanha), Synth (São Paulo, SP, Brasil), Invitrogen (Carlsbad, USA), GibcoBRL (Grand Island, NY, USA), Sigma (St. Louis, MO, USA);
- Meios de Cultura: RPMI 1640 e DMEM (Sigma);
- Tripsina (Sigma);
- Coquetel de inibidores de protease (AEBSF 2 mM, EDTA 1 mM, Bestatina 130 µm, E-64 14 µm, Leupeptina 1 mM, Aprotinina 1 mM) e PMSF (Sigma);
- Suplementos para meio de cultura: Soro Fetal Bovino (CultiLab, Campinas, SP, Brasil); HAT e HT (Sigma); PMA (Sigma); geramicina (Schering, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); Ciprofloxacina (Hipolabor, Betim, MG, Brasil).
- Polietilenoglicol (Sigma);
- Kit para dosagem de anticorpos (BD, San Diego, CA, USA);
- Anticorpos: anti-Ig total de camundongo (conjugado à peroxidases) (Sigma); anti-IgM de camundongo (conjugado à peroxidase) (Zimed, San Francisco, CA, USA); anti-IgM de camundongo (conjugado à PE e FITC) (Sigma)
- Complemento de cobaia purificado (GibcoBRL);
- MTT (Sigma);
- Padrão de Peso Molecular (Bio Rad, Hercules, CA, USA)

3.1.10 Animais

Camundongos C57Bl/6 fêmeos, de 2 a 3 meses de idade, foram obtidos do Centro de Desenvolvimento de modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Camundongos BALB/C congenitamente atímicos (*nude*) fêmeos, de 2 a 3 meses de idade, foram obtidos do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual de São Paulo (USP). Água e ração foram oferecidos *ad libitum* aos animais e todos os procedimentos foram executados de acordo com normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Paulo.

3.1.11 Linhagens de Células

Linhagem de melanoma murino B16 foi gentilmente cedida pelo Prof. Ricardo R. Brentani do Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer- São Paulo. Sub-linhagens de B16, com maior e menor potencial metastático, foram obtidas em nosso laboratório (Staquicini *et al.* 2003). Linhagem de melanócitos melan-a, e linhagens derivadas a partir dela 3C, 4C e Tm5, foram gentilmente cedidas pela Prof^a. Miriam Galvonas Jasiulonis da Universidade Federal de São Paulo. Linhagem de melanoma humano Mel85 foi gentilmente cedida pelo Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo. Linhagem de carcinoma mamário MCF-7, carcinoma de cólon uterino CASKI e carcinoma de cólon de intestino LISP, foram gentilmente cedidas pela Prof^a. Célia Regina Whitaker Carneiro, da Universidade Federal de São Paulo.

3.2 Métodos

3.2.1 Cultivo de Células

Todas as culturas celulares foram mantidas em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C. Células em cultura foram protegidas da contaminação por mycoplasma sp. pela adição esporádica de Ciprofloxacina (1/400). Para realização dos repiques, tanto o meio de cultura quanto a solução de descolamento eram específicos para cada linhagem celular, conforme descrito na Tabela 2:

Tabela 2: Relação de linhagens celulares, respectivos meios de cultura e solução de descolamento empregado na manutenção das linhagens em cultura. (*) células p3.653 não são aderentes e portanto dispensam uso de solução para descolamento.

Linhagem Celular	Meio de Cultivo	Solução para descolamento
B16, sub-linhagens mais e menos metastáticas de B16, Mel85	RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino	PBS-EDTA 1,5 mM
Mieloma murino p3.653	RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino	-*
Melanócito murino melan-a, linhagens 3C, 4C derivadas de melan-a	RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino, acrescido de 0,1% de PMA	Tripsina 0,2%
Tm5 derivada de melan-a	RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino	Tripsina 0,2%
Carcinomas humanos: MCF-7 (mama), CASKI (cólon de útero), LISP (intestino)	DMEN suplementado com 10% de soro fetal bovino	Tripsina 0,2%

Os repiques foram realizados de acordo com o tempo necessário para formação de camada confluenta. Para tanto, o meio antigo foi descartado seguido de acréscimo da solução para descolamento das células, PBS-EDTA 1,5 mM ou tripsina 0,2%. No primeiro caso, as células foram incubadas com PBS-EDTA à 37°C por cinco minutos, após os quais foram soltas com leve agitação e centrifugadas por cinco minutos a 200xg em centrífuga refrigerada (4°C). O *pellet* de células formado foi ressuspensionado em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino para cultivo em garrafas de cultura. No segundo caso, a remoção do excesso de células foi feita pela adição de tripsina 0,2% seguida por incubação durante dois minutos, ao fim dos quais foi adicionado meio de cultura. Finalmente, uma parte das células foi descartada e meio novo adicionado àquelas que permanecessem aderidas ao fundo da garrafa.

O cultivo de células de mieloma murino p3.653, contudo, não demandou uso de solução de descolamento, uma vez que crescem sem aderência. Para repiques, as células foram soltas após leve agitação.

3.2.2 Congelamento e Descongelamento de Células

A cada cinco passagens em cultura, novas alíquotas de células foram preparadas para estoque a -72°C. Periodicamente, alíquotas de células eram cuidadosamente transferidas para nitrogênio líquido a -196°C.

Para congelamento, células foram descoladas da garrafa de cultura e centrifugadas a 200xg por 5 minutos 4°C. O *pellet* de células foi ressuspensionado em meio RPMI 1640, e o número de células totais determinado por contagem em Câmara de Neubauer. Cada alíquota foi preparada com 10⁶ células em 1,0 ml de meio para congelamento. O processo de congelamento foi realizado de forma breve, em gelo, evitando sofrimento das células. Igualmente breve, o descongelamento de alíquotas de células foi realizado em banho-maria a 37°C, transferindo-se imediatamente o conteúdo da alíquota para tubos cônicos contendo volume dez vezes maior de meio de cultura sem soro fetal bovino. Em seguida, as células foram centrifugadas a 200xg por cinco minutos e o *pellet* obtido ressuspensionado em meio de cultura apropriado.

3.2.3 Imunização de Camundongos anti-melanoma murino B16

Células de melanoma murino B16 foram obtidas a partir de cultura subconfluenta após curta exposição à PBS-EDTA 1,5 mM e lavadas duas vezes com PBS por centrifugação a 200xg, durante 5 minutos. Após contagem em Câmara de Neubauer,

foram submetidas à irradiação ionizante (γ) a 478 Gray (Gy), utilizando fonte de céscio (Cs^{137}) do aparelho Nordion Gammacell GC 3000S.

Camundongos do *background* C57Bl/6 foram separados em dois grupos ($n=5$); o primeiro imunizado pela via intraperitoneal, ao passo que o segundo grupo de animais recebeu imunizações pela via subcutânea. Independentemente do protocolo empregado, cada animal foi desafiado com 2×10^6 células B16 irradiadas, anteriormente cultivadas em meio suplementado com soro murino por pelo menos 24 hs antes de cada imunização. Para a primeira imunização, células de melanoma murino foram emulsificadas em Adjuvante de Freund Completo e em Adjuvante de Freund Incompleto nas imunizações seguintes. Dez dias após a primeira imunização, soro dos animais foi testado para a presença de anticorpos reativos contra células de melanoma murino e mais duas imunizações foram realizadas em intervalo de vinte dias.

3.2.4 ELISA cell

A titulação da atividade de anticorpos anti-melanoma murino B16 em soro policlonal, sobrenadante de células e fluido ascítico foi verificada por ELISA *cell*, descrito por Posner (1982). Células de melanoma murino B16, obtidas a partir de cultura subconfluente, foram utilizadas para sensibilização de placas de cultura com 96 poços. Em cada orifício foram adicionadas 2×10^4 células, ressuspendidas em 100 μl de meio de cultura RPMI 1640 sem soro fetal bovino, seguido de incubação durante 12hs para completa adesão das células à superfície da placa. Após adesão, o sobrenadante foi descartado e os orifícios da placa lavados com PBS estéril. A fixação das células à placa foi garantida pela incubação com glutaraldeído 0,5% (50 μl /poço), durante trinta minutos, a temperatura ambiente. A remoção de grupos aldeídos que poderiam interferir no resultado final foi realizada durante incubação das células com glicina 0,1M (100 μl /poço) por trinta minutos, a temperatura ambiente. A seguir, a placa foi lavada com PBS e submetida a 3-5 incubações de dez minutos cada, com peróxido de hidrogênio 3%, em etapa protegida da luz, para bloqueio da atividade de peroxidase endógena. A placa foi novamente lavada com PBS, incubada com solução de bloqueio PBS-leite desnatado a 5% durante uma hora a 37°C e, a seguir, realizou-se três lavagens com PBS-Tween-Molico (200 μl /poço), após as quais as células foram incubadas com 50 μl de anticorpo primário (sobrenadante de cultura, soro policlonal ou fluido ascítico) em PBS-leite desnatado 5% (50 μl /poço) durante uma hora a 37°C.

Após incubação, novas lavagens com PBS-Tween-leite desnatado antecederam incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (50 µl/poço) por mais uma hora a 37°, protegido da luz. Após última etapa de lavagem, a revelação foi feita com adição de 50µg de OPD (5,0 mg/ml) em tampão para OPD, e o bloqueio com o mesmo volume de H₂SO₄ 4N. Os resultados foram avaliados por leitura espectrofotométrica (EIA reader Titertek, Multiskan, MCC340) em comprimento de onda 492 nm.

3.2.5 Preparo de Extrato Celular

Células obtidas da cultura subconfluente foram centrifugadas, contadas e lavadas duas vezes com PBS estéril. Posteriormente, adicionou-se ao *pellet* 1,0ml do tampão de lise celular acrescido de inibidores de protease. A mistura resultante foi incubada a 4°C por trinta minutos, com períodos de agitação em *vortex*. Após incubação, o lisado celular foi centrifugado por 20 minutos a 10.000xg e 4°C para remoção de resíduos não-protéicos. O sobrenadante correspondente à fração enriquecida de proteínas foi recolhido e a concentração protéica determinada pelo micrométodo de Bradford (1976).

3.2.6 Dosagem protéica pelo micrométodo de Bradford

Extratos totais de células foram dosados pelo método desenvolvido por Bradford, baseado na determinação da concentração de proteínas a partir da adição do corante *Coomassie Blue* G-250 (CBB) à amostra diluída seriadamente. O corante reage com moléculas de proteína liberando absorvância lida em comprimento de onda na faixa de 570 nm em espectrofotômetro. A curva-padrão para dosagem da amostra foi feita com albumina de soro bovino estocada em concentração conhecida de 1mg/ml. Após dosagem, os extratos foram submetidos à eletroforese em gel SDS-PAGE para confirmação do resultado.

3.2.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida contendo SDS foi executada em equipamentos Mini-Protean II (Bio-Rad) e os procedimentos realizados conforme descrito por Laemmli (1976). Para análise das proteínas do estudo, foi preparado gel

de separação linear a 10% de acrilamida e gel de empacotamento a 3% de acrilamida, conforme descrito na tabela 3:

Tabela 3: Composição dos géis SDS-PAGE, de separação e empacotamento, para análise de amostras protéicas em condições redutoras.

Soluções de Estoque (mantidas a 4°C)	Gel de empacotamento (Volume final: 5,02 mL)	Gel de Separação (Volume final 14,8575 mL)
	3%	10%
Acrilamida 30%, bisacrilamida 0,8%	0,8 mL	5,0 mL
Tampão para gel de proteína (empacotamento) denaturante	1,25 mL	-
Tampão para gel de proteína (separação) denaturante	-	3,0 mL
Água bi-destilada	2,95 mL	6,8 mL
TEMED	5 µL	7,5 µL
Persulfato de amônio 10% (p/v)	15 µL	50 µL

Os géis foram mantidos entre duas placas de vidro, separadas por espaçadores de 0,75 mm de espessura, até completa polimerização. As amostras analisadas foram diluídas 1/5 em tampão de amostra e fervidas de 3 a 5 minutos. Para estudo de extratos celulares, 40µg de amostra foi aplicado em cada poço para visualização das bandas no gel quando corado, enquanto que 75 µg de amostra foi aplicado para posterior transferência para membrana de nitrocelulose. Seguido à aplicação das amostras, os eletrodos foram mergulhados em tampão de corrida para início do processo de eletroforese. Foi empregada voltagem constante de 170V durante aproximadamente uma hora. Ao término da corrida, o gel foi incubado por uma hora em corante *Coomassie Blue* para gel. Após este período, o excesso do corante foi removido pela incubação com descorante forte durante tempo necessário para visualização das bandas protéicas no gel, cuja conservação foi feita em água destilada.

3.2.8 Transferência de proteínas para membranas de nitrocelulose (*Immunoblotting*)

Proteínas em gel de poliacrilamida foram transferidas para membrana de nitrocelulose conforme descrito (Towbin *et al.*, 1979; Lopes & Alves, 1983), em equipamento Trans-Blot System (Bio-Rad). Após eletroforese os géis foram apostos sobre membranas de nitrocelulose (Bio-Rad), recobertos com papel-filtro e comprimidos por esponjas. Todos os materiais foram embebidos em tampão de transferência, encaixados em placas acrílicas perfuradas e mergulhados na câmara de eletroforese contendo o mesmo tampão. A transferência foi efetuada à voltagem constante de 100 V por noventa minutos. A seguir, as membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau S para localização das bandas protéicas e incubadas com PBS-leite desnatado durante uma hora, para bloqueio de sítios de ligação livres da membrana.

Para reação de *Immunoblotting*, as membranas foram lavadas com PBS-Tween, cinco vezes de cinco minutos, e incubadas por uma hora com anticorpo primário puro e em diferentes diluições (sobrenadante de cultura de células, soro policlonal ou fluido ascítico), sob constante agitação. Ao final da incubação com anticorpo primário, nova lavagem foi realizada para posterior incubação com anticorpo secundário (anti-IgM ou anti-Ig total de camundongo, conjugado à peroxidase), sob agitação e protegido da luz, durante uma hora, ao fim da qual as membranas foram novamente submetidas a lavagens. A revelação foi feita pela adição de solução filtrada de DAB em tampão Tris-HCl 0,1M, e o bloqueio da reação realizado com água destilada.

3.2.9 Feeder Layer de Macrófagos

Macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/C foram removidos em condições assépticas com 2,0 ml de RPMI 1640 gelado (sem soro fetal bovino) e transferidos para tubos cônicos de 15 ml, em banho de gelo. As preparações foram diluídas em meio completo e distribuídas em placas de 96 ou 24 orifícios (Corning Costar, Nova York, NY, USA) ou em garrafas de 25 cm². Garrafas e placas contendo *feeder layer* de macrófagos foram empregadas nos procedimentos de fusão celular, clonagem e cultivo de híbridos.

3.2.10 Fusão Celular e Clonagem dos Hibridomas

A produção de hibridomas foi realizada conforme previamente descrito por Lopes & Alves (1983). O baço do camundongo melhor responsivo contra células de melanoma murino foi macerado assepticamente até completa liberação dos esplenócitos, aos quais se acrescentou $2-3 \times 10^7$ células de mieloma murino p3.653. À mistura, adicionou-se polietilenoglicol por um minuto, tempo necessário para que houvesse fusão celular, seguido de várias lavagens com meio de cultura. As células foram ressuspendidas em meio HAT suplementado com 20% de soro fetal bovino e, distribuídas nos orifícios de placas de cultura de 96 poços, já contendo camada de macrófagos (*Feeder Layer*). Após uma semana, alguns clones já podiam ser vistos macroscopicamente, os quais foram inicialmente testados quanto à sua responsividade ao melanoma murino em ELISA *cell*. Se positivos, eram testados em ELISA contra albumina de soro bovino e se novamente positivos eram descartados, ficando apenas clones específicos contra antígenos de células B16. Este procedimento foi continuamente empregado conforme novos clones eram detectados na placa de fusão. Clones positivos para antígenos B16 e negativos para albumina de soro bovino, foram clonados pelo método de diluição limitante em microplacas de 96 orifícios (Corning Costar), contendo *feeder-layer* de macrófagos em meio HT suplementado com 20% de soro fetal bovino. Os poços contendo hibridomas aparentemente originários de célula única à visualização microscópica foram avaliados quanto à produtividade de anticorpos monoclonais anti-melanoma murino B16 tanto por ELISA *cell* quanto por *Immunoblotting*. Os clones positivos foram expandidos para frascos de cultura, e posteriormente congelados.

3.2.11 Isotipagem

Os anticorpos monoclonais presentes nos sobrenadantes dos hibridomas foram isotipados através de kit de isotipagem (BD) de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.12 Precipitação de Anticorpos Monoclonais

Camundongos da linhagem BALB/C, congenitamente atímicos (“nude”) foram sensibilizados com 500µl de óleo mineral pela via intraperitoneal e após 24hs, células de hibridoma (2×10^7) foram injetadas na cavidade peritoneal dos animais. Após uma semana, o líquido formado na cavidade peritoneal foi retirado, precipitado com sulfato de amônio 70%, e dialisado contra PBS com PMSF 1,0 mM durante 72 hs. Ascite

precipitada foi testada quanto à presença de anticorpos contra células B16 em *Immunoblotting* e a concentração de anticorpos avaliada por ELISA, conforme previamente descrito, usando como referência anticorpo do mesmo isotipo em concentração conhecida (Mukherjee *et al.* 1992).

3.2.13 Citometria de Fluxo (FACS)

Células B16 foram coletadas da cultura e a viabilidade determinada por azul de Trypan. Para cada amostra a ser analisada, 10^6 células foram lavadas com PBS e incubadas com 50 μ l de anticorpo primário (soro policlonal anti-B16, anticorpo monoclonal IgM anti-B16 ou anticorpo monoclonal irrelevante do mesmo isotipo) nas diluições 1/10 e 1/5, durante uma hora a 4°C. Ao término da primeira incubação, novas lavagens foram realizadas seguido por incubação com 50 μ l do anticorpo secundário (anti-IgM de camundongo conjugado à FITC ou PE) por mais uma hora, a 4°C e protegido da luz. Após novas lavagens com PBS, as células foram fixadas com 500 μ l de paraformaldeído por 30 minutos, lavadas e ressuspensas em PBS, para leitura em aparelho FACS. O controle do experimento foi feito com células marcadas apenas com anticorpo secundário.

3.2.14 Imunofluorescência e Microscopia Confocal

Células B16 (5×10^6 /ml) em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino foram cultivadas em placas de 24 poços recobertas com lamínulas estéreis. Após dois dias de cultura, o sobrenadante foi aspirado e as células aderidas nas lamínulas foram lavadas com PBS estéril, para posterior adição de metanol 100% durante 15 minutos. Após fixação, foram feitas novas lavagens com PBS e bloqueio com 500 μ l de PBS-leite desnatado 5% durante 30 minutos. A seguir, novas lavagens antecederam a adição de 100 μ l do anticorpo primário (ascite anti-B16 ou ascite controle) nas diluições 1/5, 1/8 e 1/10 em PBS-Molico 5%, incubado por uma hora a temperatura ambiente. As lamínulas foram, a seguir, lavadas exaustivamente com PBS para acréscimo de 100 μ l do anticorpo secundário (anti-IgM conjugado a fluoresceína FITC) junto ao DAPI 50 μ M, diluído 1/300 e 0,01% de saponina em PBS-Molico 5%, durante uma hora, em etapa protegida da luz. Por fim, as lamínulas foram submetidas a várias lavagens com PBS e aplicadas a lâminas montadas com VectaShield (Vector) para análise em microscópio de imunofluorescência ou para microscopia confocal.

3.2.15 Purificação de Fibronectina de Plasma Humano

Sangue total colhido com anti-coagulante foi centrifugado a 7000xg por dez minutos. Ao sobrenadante foi adicionado PMSF na concentração final de 1,0 mM, e diluído (v/v) em tampão Tris-HCl 50 mM (pH=7,4) contendo 0,01% de timerosal. A coluna, composta por IgG de coelho anti-fibronectina acoplada à sepharose CNBr 4B ativada (Pharmacia), foi lavada com tampão Tris-HCl 50 mM (2,0 ml/min) e o material aplicado em circuito fechado e aberto (0,7-0,9 ml/min) durante duas horas. A coluna foi novamente lavada e eluição realizada com tampão Tris-Uréia 4M (pH=7,4) a 2,0 ml/min. Frações de 2,0 ml do eluato foram coletadas por tubo e imediatamente dosado por *Comassie Blue* para a presença de proteína. O conteúdo dos tubos positivos foi dialisado contra PBS acrescido de PMSF 1,0 mM e a purificação analisada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 7,5% de acrilamida.

3.2.16 Ensaio de Inibição de Proliferação *in vitro*

Células B16 ou células de melanoma murino Mel85 foram coletadas após rápida exposição à PBS-EDTA 1,5 mM e contadas em Câmara de Neubauer com exclusão de células não viáveis por azul de Trypan. Para o ensaio, 2×10^3 células em 100µL de R-10% foram adicionadas em cada orifício de uma placa com 96 poços e incubadas durante 24hs, a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Ao final da incubação, anticorpo monoclonal IgM anti-B16 ou anticorpo controle IgM, nas diluições 1 e 5,0 µg/ml, foi adicionado em 100µl em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino. Cinco placas foram preparadas, correspondentes aos cinco dias em que o crescimento celular seria avaliado na presença ou não de anticorpo. Assim, a cada dia, 10µl de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromídeo] foi adicionado para 100µl de meio de cultura. As células foram incubadas com MTT por 2 hs, ao término das quais, o sobrenadante dos poços foi aspirado e neles foi adicionado 100 µl de isopropanol gelado para leitura a 570 nm em espectrofotômetro.

3.2.17 Ensaio de Inibição da Adesão às Proteínas da matriz-extracelular *in vitro*

Células de melanoma murino B16 (2×10^4) foram cultivadas em placas de 96 poços sensibilizadas com fibronectina e laminina (10 µg/ml), na presença de anticorpo monoclonal anti-B16 ou anticorpo controle em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino, durante duas horas a 37°C. Após este período, 10 µl de MTT [3-(4,5-

dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromídeo] foi adicionado aos orifícios da placa seguido por incubação de duas horas. Por fim, o sobrenadante dos poços foi aspirado e 100 µl de isopropanol gelado acrescentado para leitura a 570 nm em espectrofotômetro.

3.2.18 Ensaio de Inibição da formação de esferóides em agarose

A inibição da capacidade de formação de colônias por células B16 foi determinada através de plaqueamento em ágar simples de acordo com o protocolo desenvolvido por MacPherson & Montagnier (1963). Células B16 (10^4) em meio de cultura, suplementado com soro fetal bovino, foram cultivadas em placa de 24 poços recobertos por fina camada de agarose 1% em PBS. Às células em suspensão foi acrescentado anticorpo monoclonal anti-B16 ou anticorpo controle do mesmo isotipo, nas concentrações finais de 1,0 e 5,0 µg/ml. Após 24hs de incubação a 37°C em 5% de CO₂, foram avaliadas a formação de esferóides e a viabilidade das células após tratamento. Para avaliação da viabilidade, células em suspensão foram transferidas para orifícios sem agarose em meio de cultura suplementado com soro fetal bovino, durante 24hs. As imagens foram capturadas em microscópio invertido e fotografadas em formato digital.

3.2.19 Ensaio de Citotoxicidade mediada por complemento *in vitro*

Células da linhagem B16 (10^4 células/poço) foram cultivadas em placa de 96 poços durante 24hs a 37°C e 5% de CO₂. As células aderidas foram então incubadas em 100 µl de meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino contendo complemento de cobaia na diluição de 1/80 juntamente com anticorpo monoclonal anti-B16 ou anticorpo monoclonal irrelevante, nas concentrações de 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 µg/ml. Após 24hs, a viabilidade das células foi avaliada pela adição de MTT (5 mg/ml).

3.2.20 Ensaio de inibição da migração *in vitro*

Para ensaio de quimiotaxia foram utilizadas Câmaras de *Transwell*[®] (Corning costar corporation) com filtros de policarbonato de 12 mm de diâmetro e poros de 3 µm. Células B16 (2×10^5) foram removidas da cultura, pré-tratadas durante 30 minutos com anticorpo anti-B16 ou anticorpo controle (5,0 µg/ml) e ressuspendidas em 200 µl de meio de cultura RPMI 1640 sem soro fetal bovino. Estas células foram acondicionadas à porção superior da câmara, enquanto que à porção inferior da câmara foi

acrescentado 200 µl de meio de cultura enriquecido com 10% de soro fetal bovino. Após 24 horas, o número de células que migraram para a porção inferior da câmara, em direção ao soro fetal bovino, foi determinado por coloração das membranas com cristal violeta.

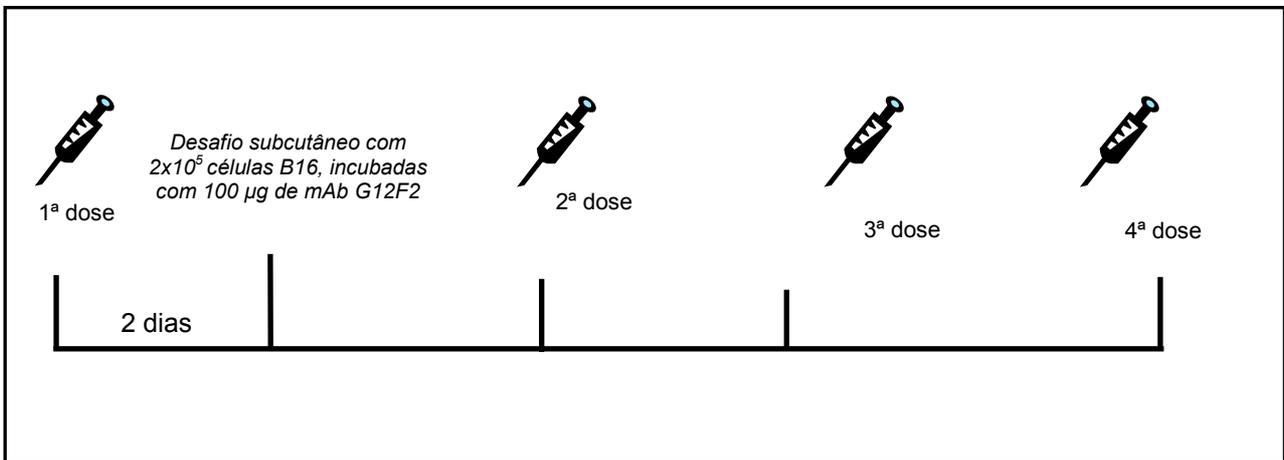
3.2.21 Ensaio de inibição da invasão *in vitro*

Com objetivo de verificar possível alteração no potencial invasivo de células tratadas com anticorpo monoclonal anti-B16, foi realizado ensaio de invasão em Matrigel (Becton Dickinson Labware). Semelhante ao ensaio de migração, foram utilizadas Câmaras de *Transwell*[®] (Corning Costar Corporation) com filtros de policarbonato de 12 mm de diâmetro e poros de 3 µm. Porém, especificamente para o ensaio de invasão, cada filtro foi recoberto, em gelo, com 56 µl de matrigel na diluição de 1/12 (50 µg/filtro), em PBS gelado. O gel foi polimerizado em estufa a 37°C, 5% de CO₂ por 30 minutos. Para o ensaio, células B16 subconfluentes foram removidas de garrafas de cultura com auxílio de solução PBS-EDTA 1,5 mM e lavadas duas vezes em RPMI 1640 por centrifugação a 200xg, 5 minutos a 4°C. A viabilidade das células foi determinada por azul de Trypan em contagem na Câmara de Neubauer e 2x10⁵ células em RPMI 1640 sem adição de soro fetal bovino foram adicionadas na porção superior do filtro recoberto com Matrigel. A seguir, 200 µl de meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino foi acrescentado apenas na porção inferior do filtro. Após 24 horas de incubação a 4°C e 5% de CO₂, as células que passaram pelo matrigel em direção ao soro fetal bovino na porção inferior do filtro foram coradas com azul de toluidina 1%.

3.2.22 Ensaio de Inibição do Crescimento tumoral *in vivo*

Para investigar se o tratamento de células B16 com anticorpo monoclonal IgM anti-B16 poderia afetar o desenvolvimento de tumores *in vivo*, células B16 em fase de crescimento exponencial foram coletadas da cultura por rápida exposição à PBS-EDTA 1,5mM, lavadas em PBS estéril e a viabilidade determinada por azul de trypan para contagem em Câmara de Neubauer. Células viáveis (2x10⁵) foram pré-incubadas durante 30 minutos, sob agitação, com 100 µg de anticorpo monoclonal anti-B16, anticorpo monoclonal irrelevante de mesmo isotipo ou PBS. Células tratadas foram injetadas no dorso superior de camundongos C57Bl/6, divididos em grupos de cinco animais, previamente tratados pela via endovenosa com uma dose de anticorpo

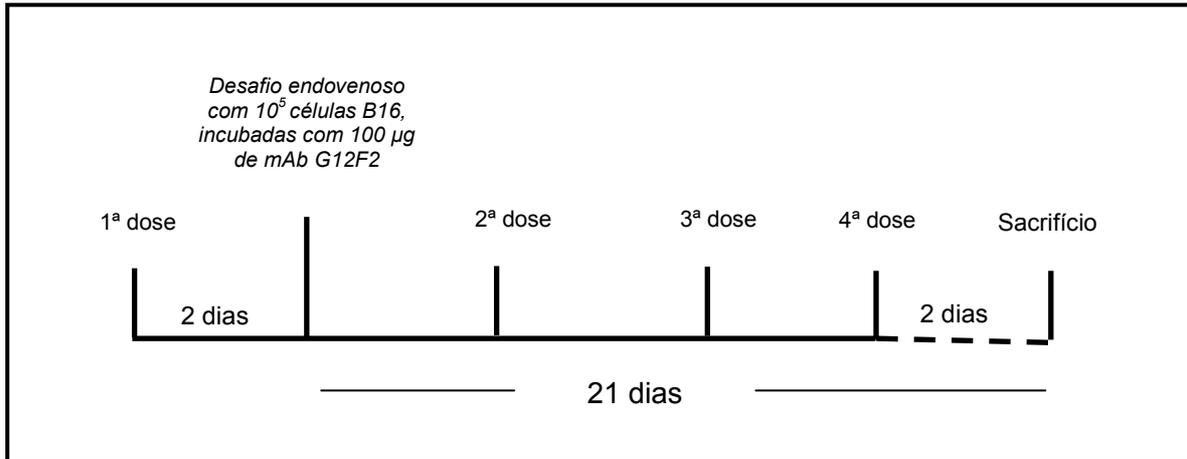
monoclonal anti-B16, anticorpo monoclonal irrelevante ou PBS. O tratamento dos animais foi repetido durante três vezes após o desafio com células B16 (Esquema 1). O desenvolvimento de nódulos tumorais subcutâneos foi acompanhado a cada dois dias e o volume determinado pela fórmula $Volume = (diâmetro\ menor)^2 \times (diâmetro\ maior) / 2$.



Esquema1: Protocolo empregado para ensaio de inibição do crescimento tumoral por células B16 em camundongos C57BL/6 ($n=5$). Controle negativo foi feito com PBS e IgM controle.

3.2.23 Ensaio de Inibição de metástases em modelo experimental

A capacidade do anticorpo monoclonal anti-B16 em inibir a formação de colônias metastáticas no pulmão em modelo experimental endovenoso, foi investigada em camundongos C57Bl/6 previamente tratados com uma dose de 100 µg de IgM anti-B16, IgM controle ou PBS. Os animais foram desafiados endovenosamente, com células B16 (10^5) viáveis, submetidas ao mesmo tratamento com anticorpos ou apenas com PBS durante 30 minutos. Uma semana após o desafio, os três grupos de cinco animais foram novamente tratados e assim sucessivamente até que se completasse 21 dias a partir do desafio com células B16. Após este período, os animais foram sacrificados e contado o número de colônias pulmonares (Esquema 2).



Esquema 2: Protocolo empregado para ensaio de inibição da formação de metástases pulmonares por células B16. Controle negativo foi realizado com PBS e IgM controle.

3.2.24 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste Tukey-Kramer utilizando o programa GraphPad 3.0, San Diego.

4 RESULTADOS

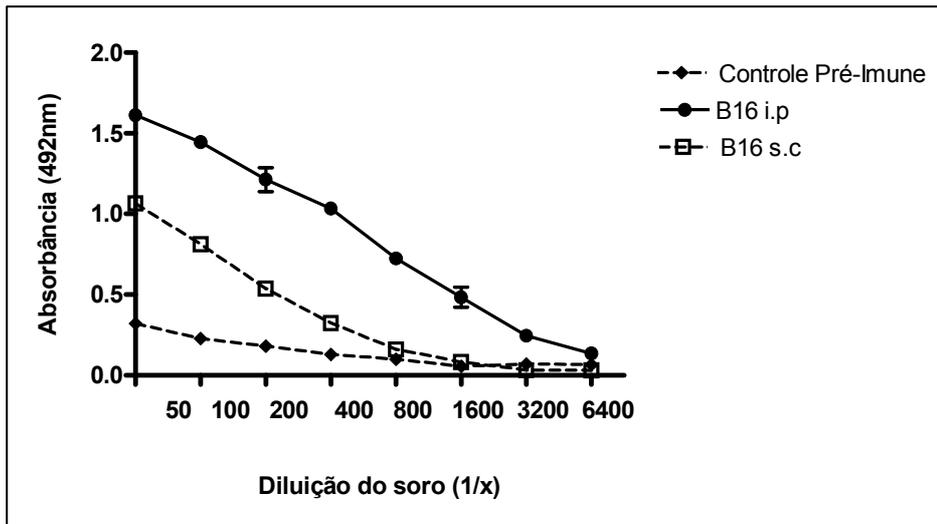
4.1 Imunização de camundongos e produção de anticorpos monoclonais contra células B16

Com intuito de induzir alto título de resposta humoral contra células B16 por camundongos singênicos, vários protocolos de imunização foram empregados sem, contudo, resultarem em resposta satisfatória. Apenas a imunização com células B16 irradiadas em Adjuvante de Freund, pela via subcutânea ou intraperitoneal, foi capaz de gerar alto título de resposta imune humoral conforme avaliado por ELISA *cell* (Figura 1A).

Após terceira imunização foi constatado que o grupo de animais imunizados pela via intraperitoneal apresentava melhor resposta contra células B16. Destes foi selecionado aquele com maior título de anticorpos, avaliado por ELISA *cell* e, 24 horas após ter recebido *booster* intraperitoneal com 2×10^7 células B16, teve o baço removido para fusão celular (Figura 1B). Após fusão, clonagem e expansão de hibridomas obtidos que se apresentavam positivos para antígenos B16 e negativos para albumina de soro bovino, foi selecionado clone da classe IgM de cadeia *kappa*.

O hibridoma obtido, designado G12F2, reconheceu uma banda de alto peso molecular, estimada em 230 kDa, quando testado em membranas de nitrocelulose sensibilizadas com extrato total de células B16 (Figura 2A). O resultado foi confirmado por citometria de fluxo, na qual G12F2 reconheceu 99% das células B16 contra 59% de reconhecimento pelo soro policlonal anti-B16 e 20% pela IgM irrelevante, utilizada como controle negativo (Figura 2B).

A



B

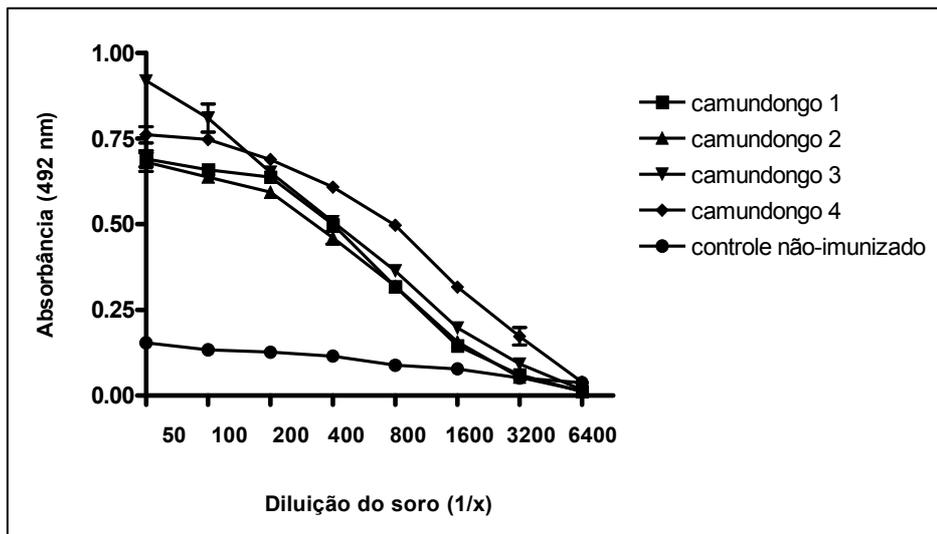


Figura 1. Resposta imune humoral desenvolvida por camundongos C57Bl/6 contra células B16. (A) Camundongos foram imunizados contra células B16 irradiadas e emulsificadas em Adjuvante de Freund, injetadas pela via subcutânea (□) ou pela via intraperitoneal (●). Após três imunizações, soro dos animais foi titulado por ELISA *cell* que mostrou maiores títulos em animais imunizados pela via intraperitoneal. (B) Resposta anticórpica dos animais imunizados pela via intraperitoneal foi comparada por ELISA *cell* para escolha do animal apresentando maior título de resposta. O camundongo 3 (▼) foi escolhido para realização de fusão celular.

4.2 A molécula reconhecida pelo anticorpo monoclonal G12F2 é expressa na superfície de células de melanoma murino B16

O resultado obtido por citometria de fluxo já sugeria que o antígeno reconhecido estaria localizado na superfície de células B16, uma vez que para este ensaio as células não foram permeabilizadas antes da incubação com anticorpo primário G12F2. A constatação de que a molécula de M_r 230,000 realmente está localizada na superfície celular foi feita por imunofluorescência e microscopia confocal (Figura 3). Nas imagens observou-se que a marcação com mAb G12F2 abrangeu toda a extensão da membrana celular (corada em verde), com algumas regiões mais definidas, caracterizando prolongamentos celulares. Por outro lado, Mab controle de mesmo isotipo foi negativo para marcação das células testadas.

4.3 G12F2 não apresentou reatividade com fibronectina em *Immunoblotting*

Tendo a confirmação de que o antígeno reconhecido pelo mAb G12F2 se tratava de uma molécula de superfície com alto peso molecular, foi investigado se poderia corresponder à fibronectina que na forma reduzida, apresenta-se em gel SDS-PAGE, como um heterodímero composto por duas cadeias de alto peso molecular; uma delas com aproximadamente 220 kDa, numa altura próxima à banda de M_r 230,000 reconhecida pelo mAb G12F2.

Resultados obtidos por *Immunoblotting* revelaram que o antígeno-alvo do mAb obtido não reagiu com fibronectina purificada, mas reconheceu a banda de M_r 230,000 no extrato total de células B16. Corroborando com este dado, foi visto que soro policlonal anti-fibronectina, utilizado como controle, reconheceu banda de diferente peso molecular do antígeno estudado, no extrato total de células B16 e se ligou fortemente à fibronectina purificada (Figura 4).

4.4 MAb G12F2 reagiu apenas contra células tumorigênicas

Investigou-se também se a expressão da molécula de M_r 230,000 era restrita às células tumorigênicas, como é o caso de células B16, ou se esta molécula seria expressa também por células não-tumorigênicas.

Conforme observado na Figura 5, células de linhagens murinas não-tumorigênicas como fibroblastos 3T3 e melanócitos melan-a não apresentaram expressão desta molécula em extrato celular total. Da mesma maneira, células não-tumorigênicas derivadas de melanócitos melan-a, após diferentes ciclos de desadesão

e adesão à agarose (3C e 4C), não expressam a molécula-alvo de G12F2 (Figura 6A), fato confirmado por citometria de fluxo (Figura 6B) ao passo que células tumorigênicas como Tm5 e B16 expressam a molécula, sendo que a primeira em menor quantidade do que a última, o que poderia estar relacionado a um fenótipo potencialmente mais maligno desenvolvido por células B16.

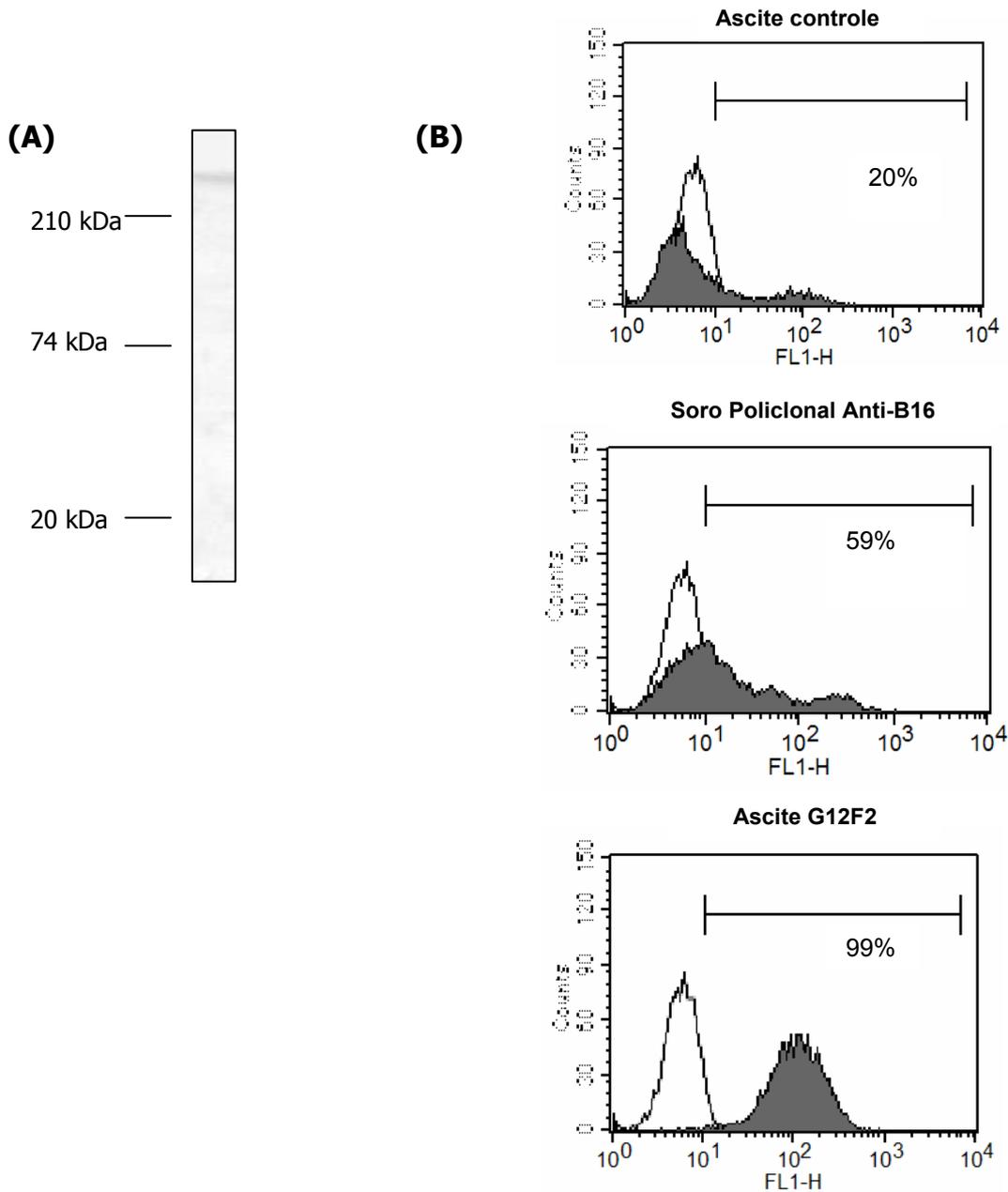


Figura 2. MAb G12F2 reconhece antígeno expresso por células B16. (A) A reatividade do MAb obtido foi avaliada por *Immunoblotting*. Extrato total de células B16 foi transferido para membrana de nitrocelulose e incubado com ascite G12F2 (1/100), revelando uma banda compacta de alto peso molecular, estimada em M_r 230,000. (B) Células B16 (10^6) foram incubadas com ascite G12F2, ascite controle ou soro policlonal anti-B16 (1/10). Ascite G12F2 reconheceu 99% das células B16, contra 20% de reconhecimento por ascite controle e 59% por soro policlonal.

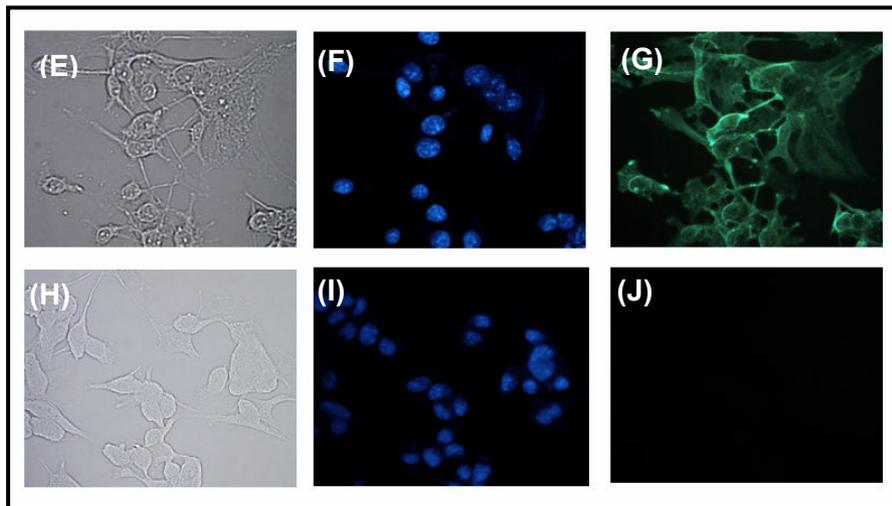
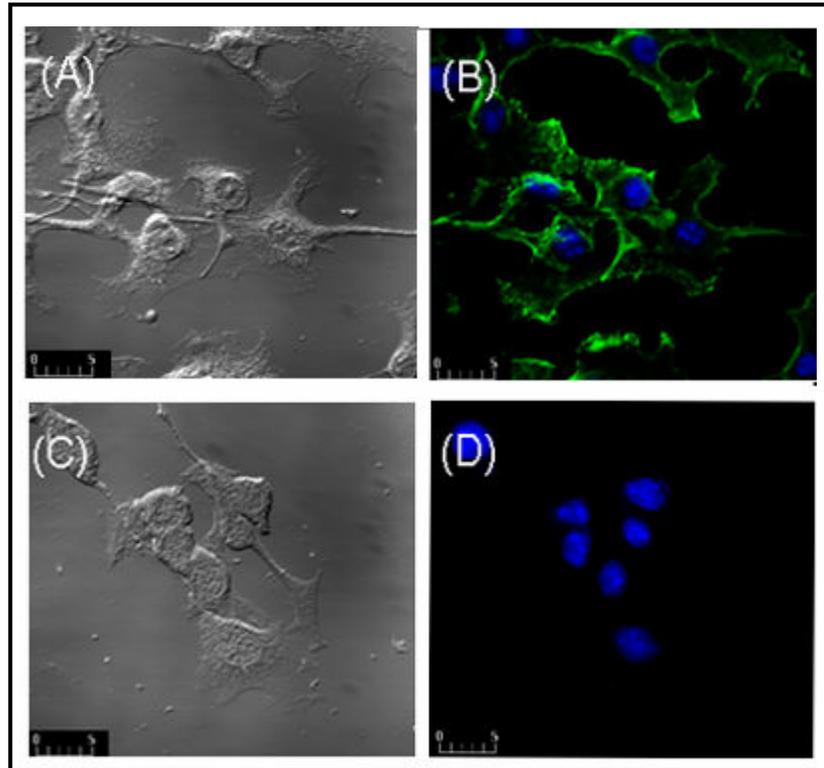


Figura 3. Antígeno reconhecido pelo mAb G12F2 está localizado na superfície de células B16. Células B16 foram cultivadas em lamínula e após completa adesão, foram fixadas com metanol gelado, bloqueadas com leite desnatado em PBS e incubadas com ascite G12F2 ou ascite controle. A marcação foi feita com adição de anticorpo secundário anti-IgM conjugado a fluoresceína e DAPI, para corar núcleo. (A, C, E, H) células B16 em imagem de contraste de fase; (D, I, J) células B16 incubadas com ascite controle foram positivas apenas para DAPI enquanto que células incubadas com ascite G12F2 foram marcadas fortemente em toda a membrana celular com fluoresceína (B, G). Aumento de 400x.

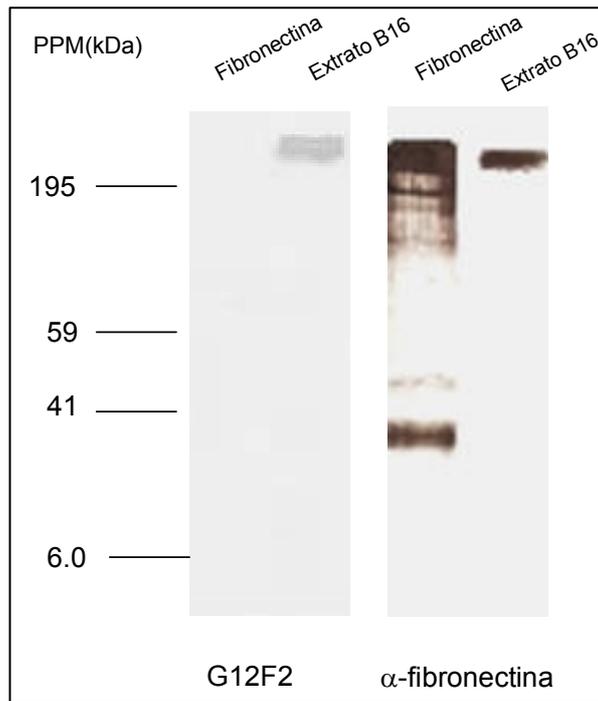


Figura 4. G12F2 reconhece molécula de alto peso molecular na superfície celular, diferente de fibronectina. Fibronectina humana purificada e extrato total de células B16 foram submetidos à eletroforese e transferidos para membrana de nitrocelulose na qual foram testados contra ascite G12F2 e soro policlonal anti-fibronectina. Conforme observado acima, ascite G12F2 reconheceu uma banda de alto peso molecular de aproximadamente 230 kDa em extrato total de células B16 e não se ligou à fibronectina purificada (membrana à esquerda) enquanto que soro policlonal anti-fibronectina reconheceu fibronectina purificada e uma banda de peso molecular diferente daquela reconhecida por G12F2 no extrato celular (membrana à direita).

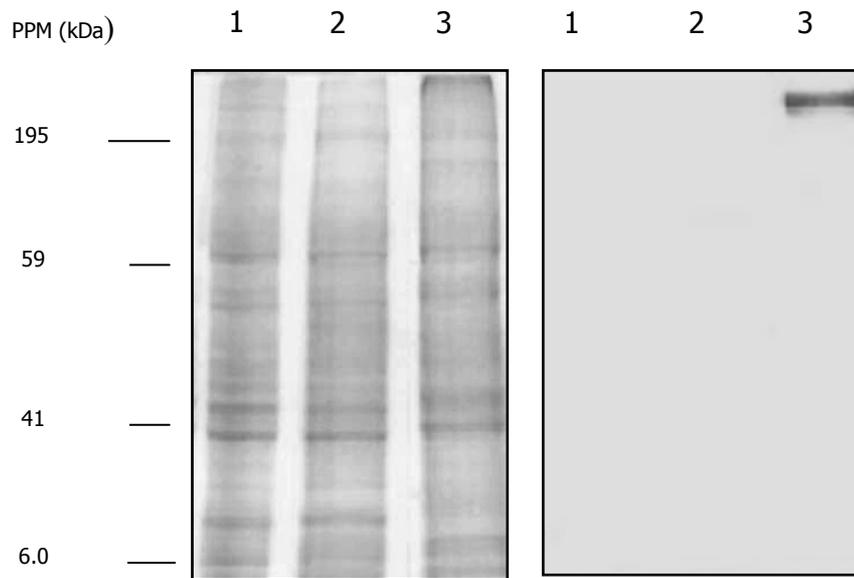


Figura 5. MAb G12F2 reconhece molécula de M_r 230,000 em células malignas, mas não em células normais. Linhagens de origem murina; melanócitos melan-a, fibroblastos 3T3, melanoma B16 foram obtidas da cultura de célula e processadas em extrato celular total. Os extratos foram submetidos à eletroforese e corados por *Coomassie Blue* (à esquerda) ou transferidos para membrana de nitrocelulose (à direita), na qual foram testados contra ascite G12F2. Células normais, fibroblastos 3T3 (1) e melanócitos melan-a (2) não apresentaram expressão da molécula reconhecida por G12F2, visualizada apenas no extrato de células B16 (3).

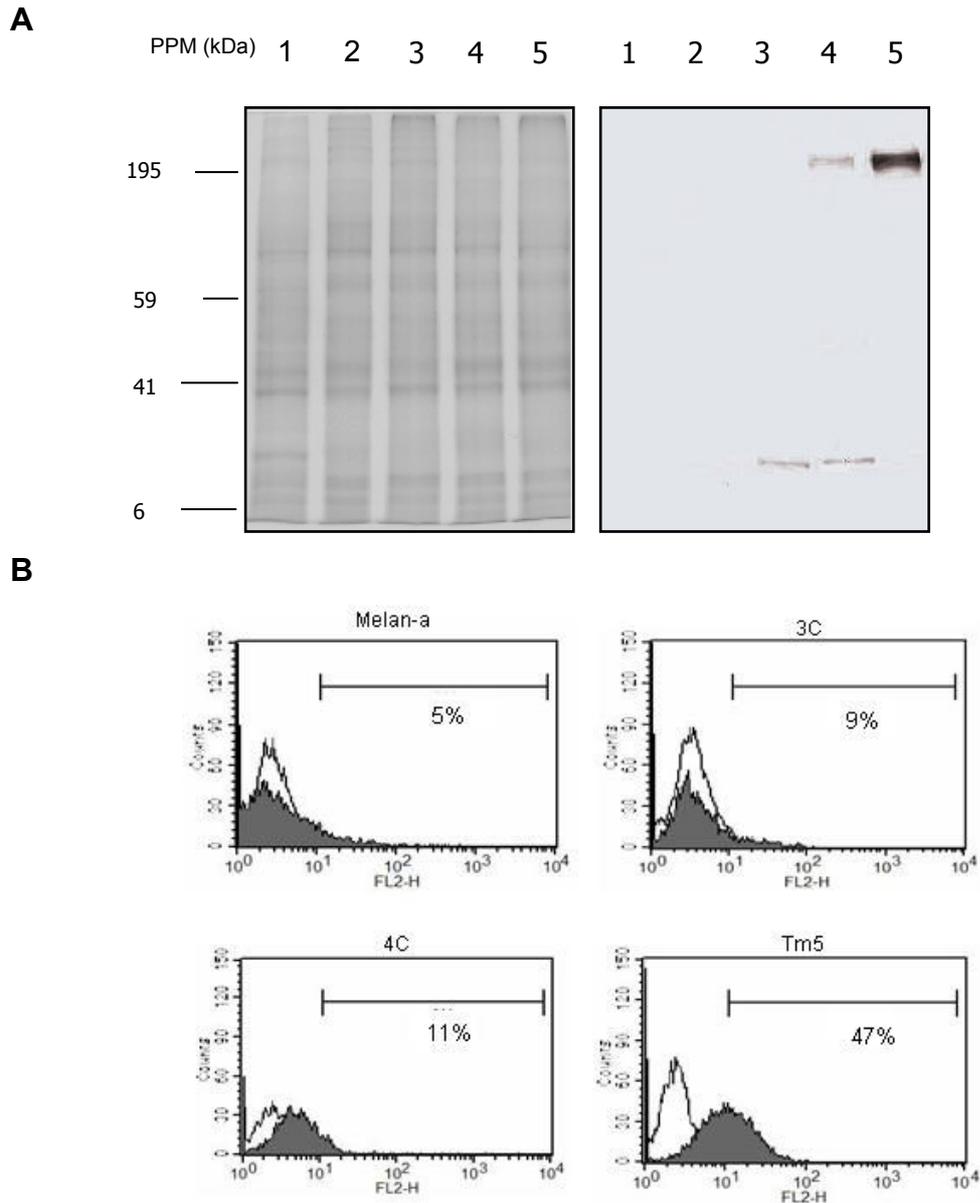


Figura 6. Análise da expressão da molécula de M_r 230,000 por linhagens tumorigênicas derivadas de células melan-a submetidas por ciclos de adesão e desadesão à agarose. (A) extrato total de células melan-a (1), 3C (2), 4C (3), Tm5 (4) e B16 (5) foram submetidos à eletroforese e corados por *Coomassie Blue* (à esquerda) ou transferidos para membrana de nitrocelulose (à direita) na qual foram testados contra ascite G12F2, que reconheceu a banda de aproximadamente 230 kDa apenas em Tm5. (B) Células das linhagens melan-a, 3C, 4C e Tm5 (10^6) foram obtidas da cultura de células e incubadas com ascite G12F2 para análise da expressão da molécula de M_r 230,000 por citometria de fluxo.

4.5 A molécula de M_r 230,000 é mais expressa por variante de maior potencial metastático derivada da linhagem B16

A expressão da molécula de M_r 230, 000 poderia não só estar relacionada ao fenótipo tumorigênico como também a um determinado potencial de malignidade. Assim, células com maior ou menor potencial de malignidade dentro de uma única linhagem, com diferente cinética de crescimento *in vitro* e *in vivo*, poderiam diferir quanto à expressão desta proteína.

Objetivando investigar a expressão da molécula estudada em células com diferentes potenciais metastáticos, foi utilizado extrato total das sub-linhagens derivadas da linhagem B16, com maior e menor potencial metastático, obtidas em nosso laboratório. Conforme observado na Figura 7, foi visto que a expressão do antígeno de M_r 230,000 é maior em células com maior potencial metastático do que em células com menor potencial metastático, sugerindo fortemente que a expressão desta molécula poderia representar um marcador de malignidade para modelo experimental de melanoma murino.

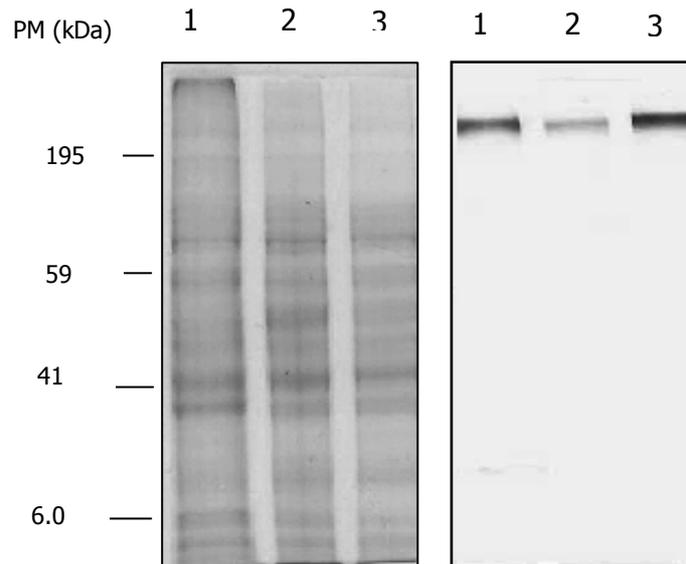


Figura 7. A molécula de M_r 230,000 é mais expressa por células com maior potencial metastático. Extratos celulares totais de variantes mais e menos metastáticas, obtidas a partir da linhagem B16, foram submetidos à eletroforese e corados por *Coomassie Blue* (à esquerda) ou transferidos para membrana de nitrocelulose (à direita). O ensaio revelou que células com maior potencial metastático (linha 3) apresentam a mesma ou maior quantidade da proteína de M_r 230,000 expressa por células B16 (linha 1), enquanto que células com menor potencial metastático expressam menor quantidade da proteína (linha 2).

4.6 MAb G12F2 inibiu proliferação de células B16 *in vitro*

Em etapa posterior foram investigadas atividades biológicas apresentadas por G12F2 contra células de melanoma murino, *in vitro* e *in vivo*. Para realização dos ensaios, ascite G12F2 e ascite irrelevante de mesmo isotipo, foram precipitadas com sulfato de amônio e titulados por ELISA, considerando como padrão outra IgM purificada de concentração conhecida (Figura 8).

Uma vez que a inibição da proliferação celular poderia ser um dos efeitos biológicos apresentados por mAb G12F2 contra células B16, foi realizado ensaio para averiguação da atividade anti-proliferativa do mAb *in vitro* e, como resultado, foi observado que na concentração de 5 µg/ml o efeito inibitório era mais significativo do que na concentração menor, 1 µg/ml. Nas mesmas concentrações, mAb controle de mesmo isotipo não alterou a cinética de crescimento celular conforme observado nas figuras 9A e 9B, mantendo o mesmo padrão apresentado por células B16 sem tratamento, com pico de crescimento celular no quarto dia em cultura, seguido de leve declínio no quinto dia. De acordo com nossos resultados, a adição de G12F2 retém atividade proliferativa de células B16, mas não apresenta ação citotóxica, uma vez que após o quinto dia, a tendência de crescimento celular foi retomada.

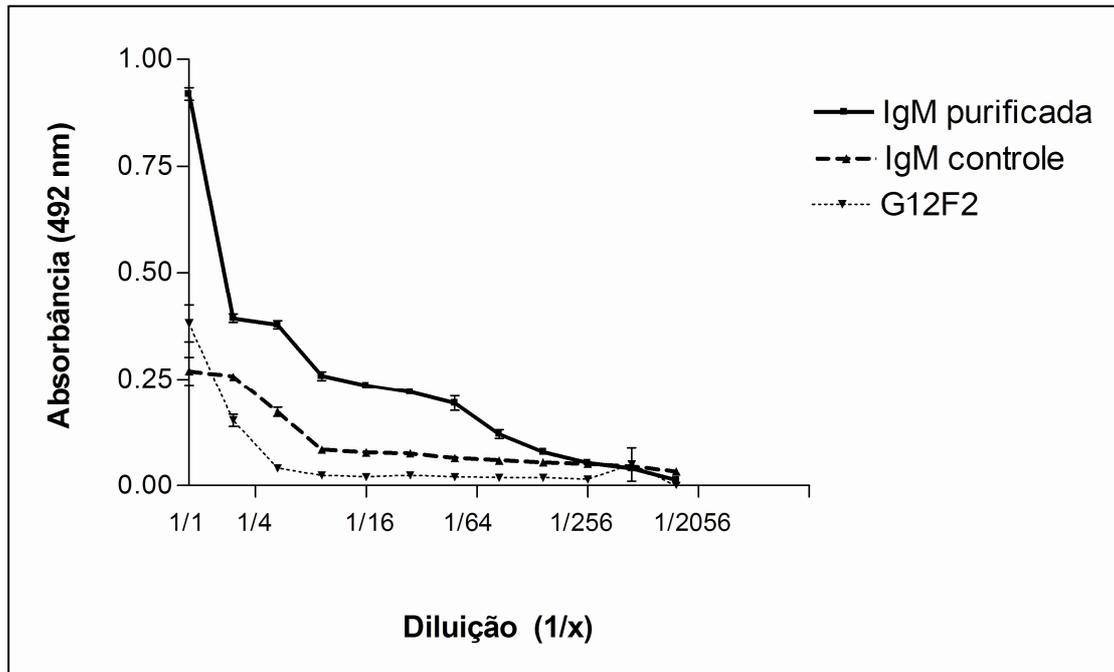


Figura 8. Titulação da ascite G12F2 e ascite controle precipitadas com sulfato de amônio 70%. Camundongos *nude* (*nu/nu*), previamente sensibilizados com óleo mineral, receberam injeção intraperitoneal com 2×10^7 células do hibridoma G12F2 ou de hibridoma controle produtor de mesmo isotipo. O fluido ascítico gerado na cavidade peritoneal foi recolhido e centrifugado para precipitação com sulfato de amônio 70%. Em seguida, o precipitado foi repetidamente dialisado contra PBS e adicionado PMSF em concentração final de 1 mM. Para titulação, IgM purificada, de concentração conhecida, foi diluída seriadamente e os valores de absorbância obtidos foram comparados aos valores de absorbância das amostras puras (ascites precipitadas) para determinação da concentração final.

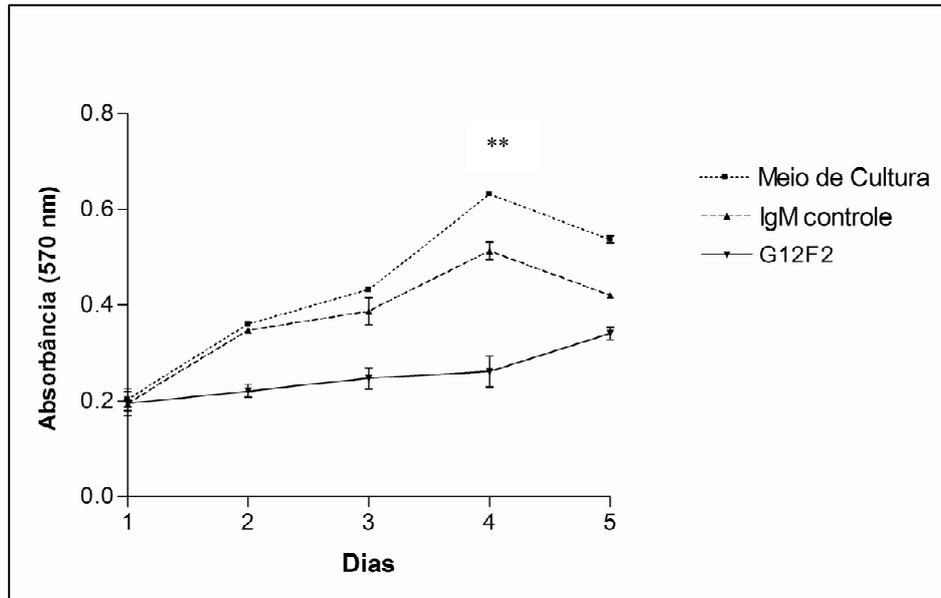
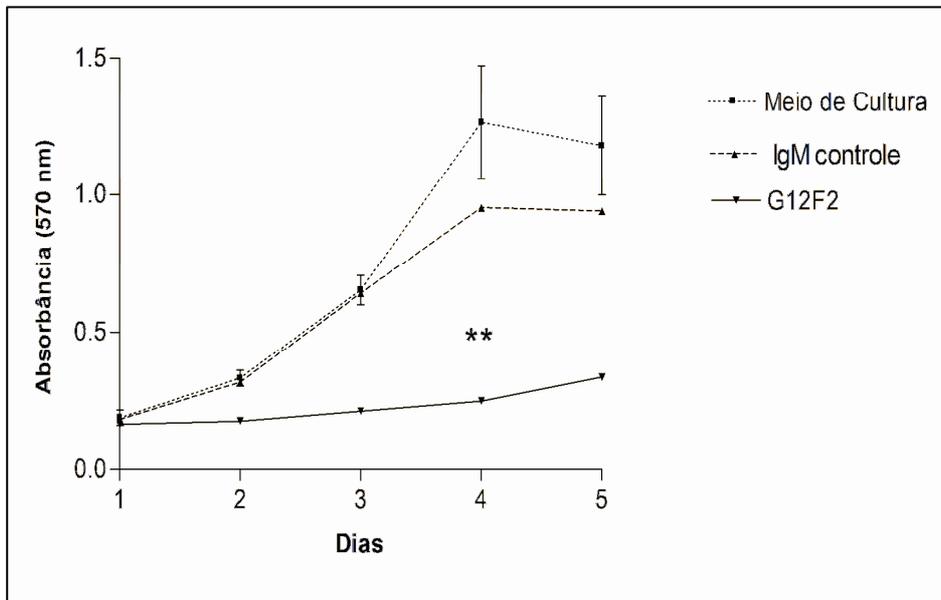
A**B**

Figura 9. G12F2 inibe proliferação de células de melanoma murino *in vitro*. Células B16 (2×10^3 células/ well) foram incubadas durante 24 horas e após total aderência, G12F2 ou IgM controle (1 e 5 $\mu\text{g/ml}$) foi adicionado para determinação da proliferação durante 5 dias. Diariamente MTT foi adicionado às triplicatas para avaliar a viabilidade celular. (A) Adição de G12F2 ou IgM controle à 1 $\mu\text{g/ml}$; (B) Adição de G12F2 ou IgM controle à 5 $\mu\text{g/ml}$. ** $p < 0.01$

4.7 MAb não inibe adesão de células B16 às proteínas da matriz-extracelular *in vitro*

Enquanto que a adição de G12F2 à cultura de células B16 resulta em efeito anti-proliferativo, foi demonstrado que o mesmo tratamento não altera a adesão de células B16 à fibronectina e laminina. Quando acrescentado em ambas as concentrações, 1 e 5 $\mu\text{g/ml}$, G12F2 não inibiu adesão das células às superfícies sensibilizadas com fibronectina ou laminina após duas horas de incubação (Figura 10).

4.8 MAb G12F2 não inibe a formação de esferóides em agarose

Células tumorais com alto potencial de malignidade se caracterizam pela habilidade em formar esferóides quando impedidas de adesão à superfície. Assim, foi investigado se a adição de G12F2 às células de melanoma B16, cultivadas em agarose, era capaz de inibir tal característica. De acordo com resultados obtidos, o acréscimo de G12F2 não alterou a formação de esferóides, observados após 24 horas de cultura (Figura 11A), nem prejudicou a viabilidade celular já que as mesmas células, quando novamente submetidas à adesão, continuaram viáveis embora em menor quantidade do que células que haviam sido cultivadas em agarose com anticorpo monoclonal irrelevante ou apenas com meio de cultura (Figura 11B).

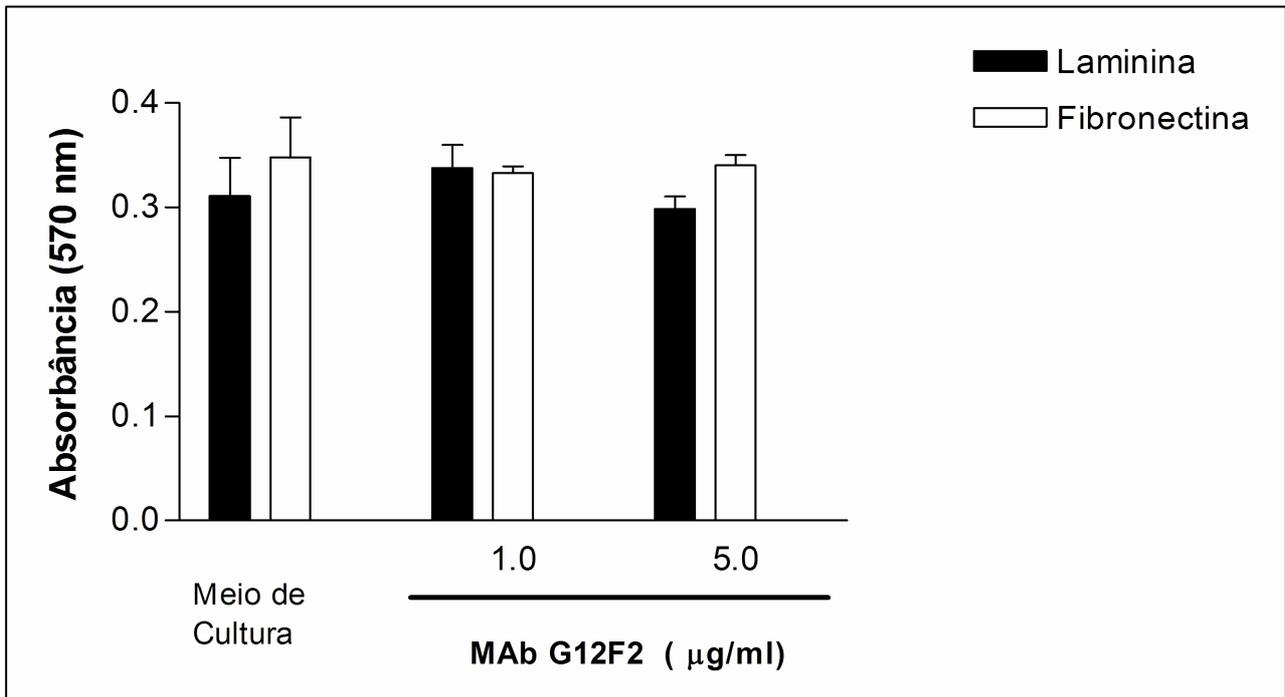


Figura 10. G12F2 não inibe adesão de células B16 às proteínas de matriz-extracelular *in vitro*. Células B16 foram cultivadas em placas de 96 poços previamente sensibilizadas com fibronectina ou laminina e incubadas durante 2 horas à 37°C. O número de células aderidas à placa ao final deste período foi determinado pela adição de MTT.

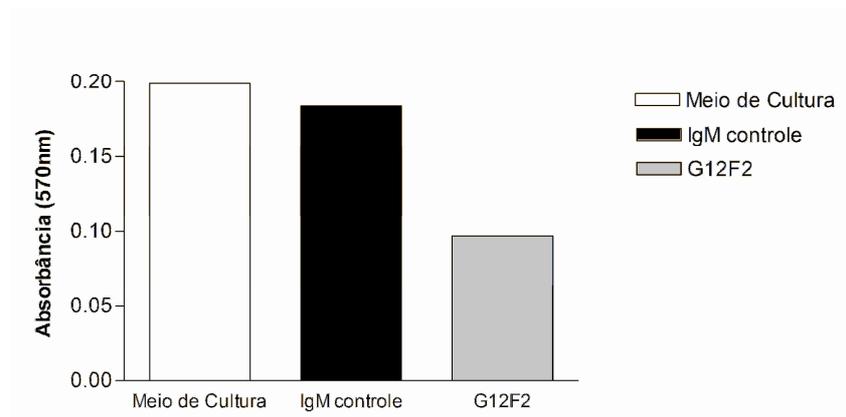
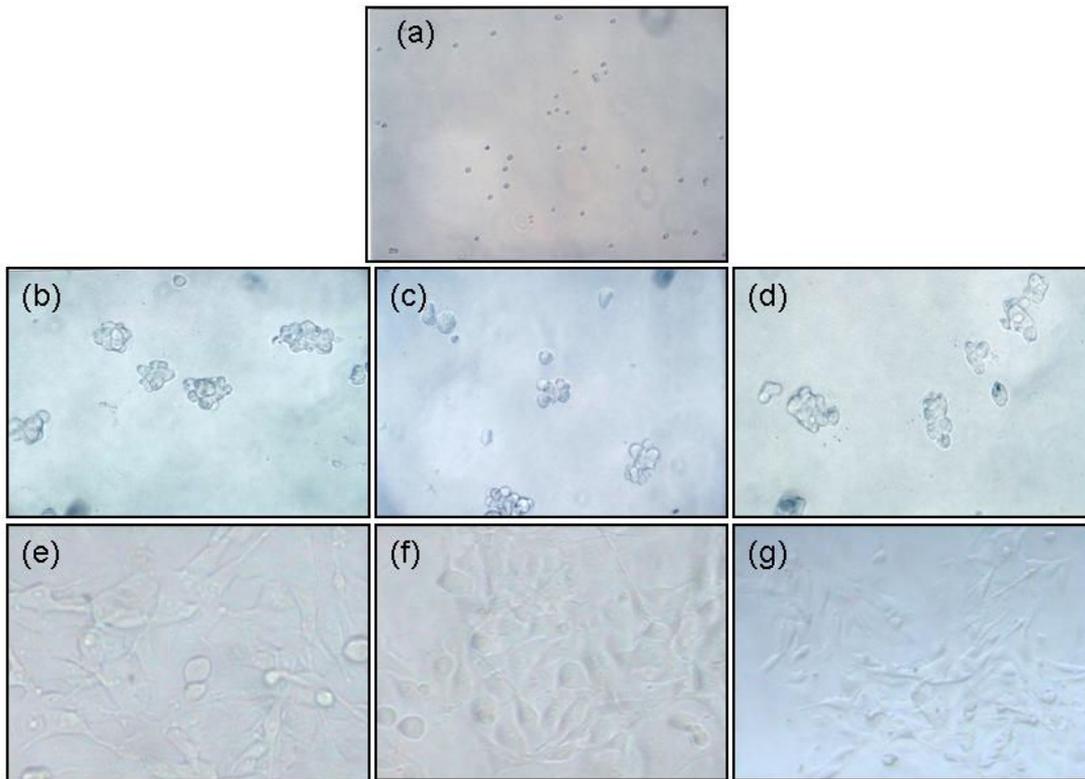


Figura 11. MAb G12F2 não inibe formação de esferóides por células de melanoma murino *in vitro*.

Células de melanoma murino B16, cuidadosamente homogeneizadas (a) foram cultivadas em placa de 12 poços contendo tênue camada de agarose 1% polimerizada. As células foram mantidas em RPMI suplementado de soro fetal bovino, na presença de G12F2 ou IgM controle, a 37°C durante 24 horas. Após este período, foi observada a formação de esferóides em células incubadas apenas com meio de cultura (b), IgM controle (c) e G12F2 (d). Os esferóides foram cuidadosamente transferidos para poços sem agarose durante 24 horas (e, f, g), ao fim das quais foi adicionado MTT para averiguação da viabilidade celular.

4.9 MAb G12F2 retardou crescimento subcutâneo de células B16 em camundongos singênicos

Corroborando com resultado obtido *in vitro*, de que G12F2 possui atividade anti-proliferativa contra células B16, foi demonstrado *in vivo* que o tratamento de camundongos C57Bl/6 com mAb G12F2 retardou o crescimento do nódulo tumoral subcutâneo (Figura 12). Animais tratados com anticorpo controle ou PBS apresentaram rápido crescimento do tumor subcutâneo, ao passo que animais tratados com anticorpo monoclonal anti-melanoma murino desenvolveram tumor de forma mais lenta. Contudo, ao término do tratamento, o grupo tratado com G12F2 apresentou drástico crescimento tumoral semelhante aos grupos do controle confirmando que o tratamento com mAb anti-melanoma foi responsável pelo controle do nódulo tumoral *in vivo*.

4.10 MAb G12F2 promoveu atividade citolítica mediada por complemento contra células B16 *in vitro*

Com objetivo de investigar a ação pela qual mAb G12F2 foi capaz de retardar crescimento do nódulo tumoral subcutâneo, células B16 foram cultivadas na presença de anticorpo monoclonal G12F2 e complemento, apenas complemento ou mAb. Conforme observado na Figura 13, apenas complemento resultou em pequena citotoxicidade contra células de melanoma murino. Entretanto, o acréscimo de mAb G12F2 promoveu aumento significativo na atividade citolítica do complemento.

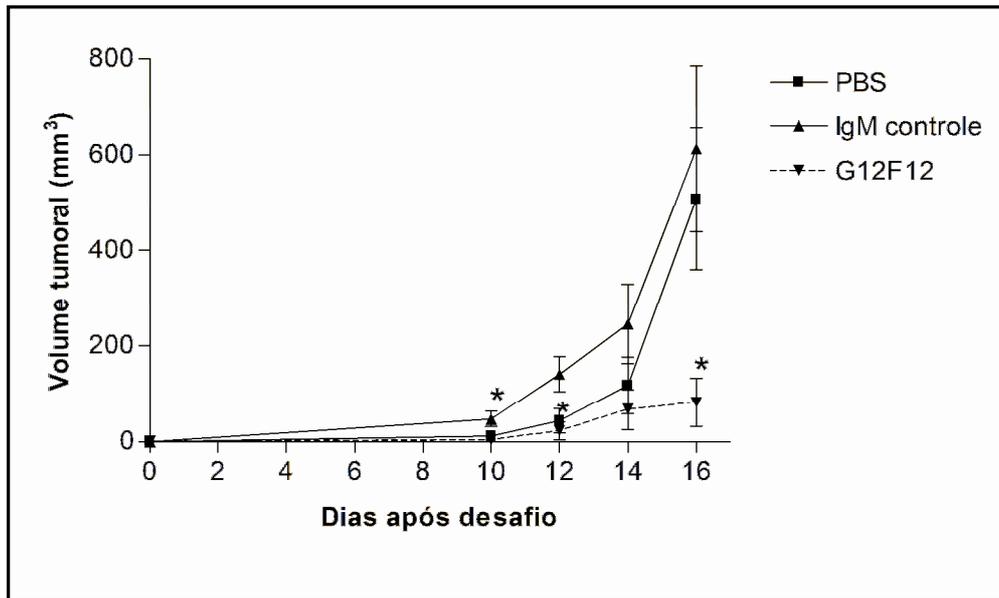


Figura 12. MAb G12F2 inibiu o desenvolvimento do nódulo tumoral *in vivo*. Camundongos C57Bl/6 ($n=5$), previamente imunizados pela via endovenosa com 100 μg de mAb G12F2 ou IgM controle, foram desafiados subcutaneamente com 10^5 células B16 em 100 μg G12F2, IgM controle ou PBS. Os animais foram tratados durante três semanas, após desafio, com mAb G12F2, IgM controle ou PBS. Crescimento do tumor subcutâneo foi medido com paquímetro a cada dois dias. * $p < 0.05$ versus controle com PBS and IgM irrelevante.

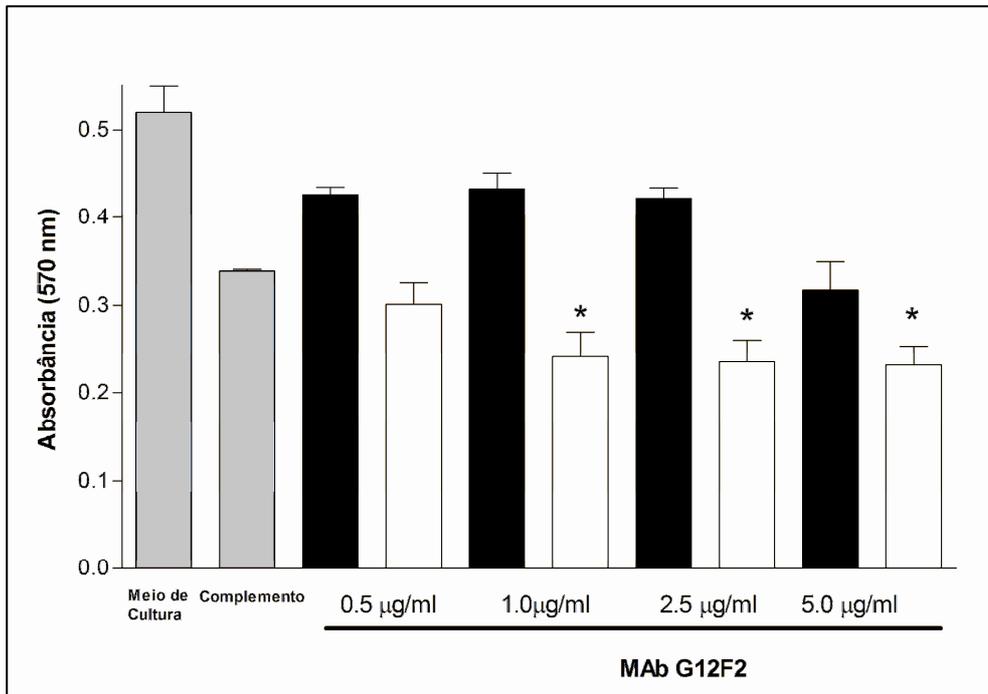


Figura 13. MAb G12F2 promoveu atividade citolítica mediada por complemento *in vitro*. Células B16 foram cultivadas durante 24 horas em placa de 96 poços e a seguir incubadas com meio de cultura contendo Mab G12F2 ou IgM controle em diferentes concentrações na ausência (■) ou na presença de complemento (□). Após 24 horas a viabilidade celular foi determinada por MTT, revelando que a adição de G12F2 nas concentrações de 1.0, 2.5 e 5 µg/ml foi capaz de aumentar atividade citolítica do complemento contra células de melanoma murino. * $p < 0.05$ versus apenas mAb G12F2 na mesma concentração.

4.11 MAb G12F2 inibiu migração e invasão de células B16 *in vitro*

A seguir foi verificado efeito da adição de G12F2 na atividade migratória e invasiva apresentado por células B16 *in vitro*. Células tratadas com G12F2 apresentaram decréscimo em ambas as atividades (Figura 14A e 14B) quando comparadas com células em meio de cultura sem tratamento ou àquelas tratadas com anticorpo controle.

4.12 MAb G12F2 inibiu o desenvolvimento de metástases pulmonares por células B16 em modelo experimental

A capacidade de inibição de metástases pulmonares foi estudada em modelo de metástase experimental em camundongos singênicos. O tratamento dos animais com G12F2 resultou em menor número de colônias metastáticas quando comparado aos grupos tratados com PBS ou mAb controle (Figura 15A). Animais tratados com G12F2 desenvolveram metástases de diâmetro bem menor do que dos outros dois grupos de animais (Figura 15B).

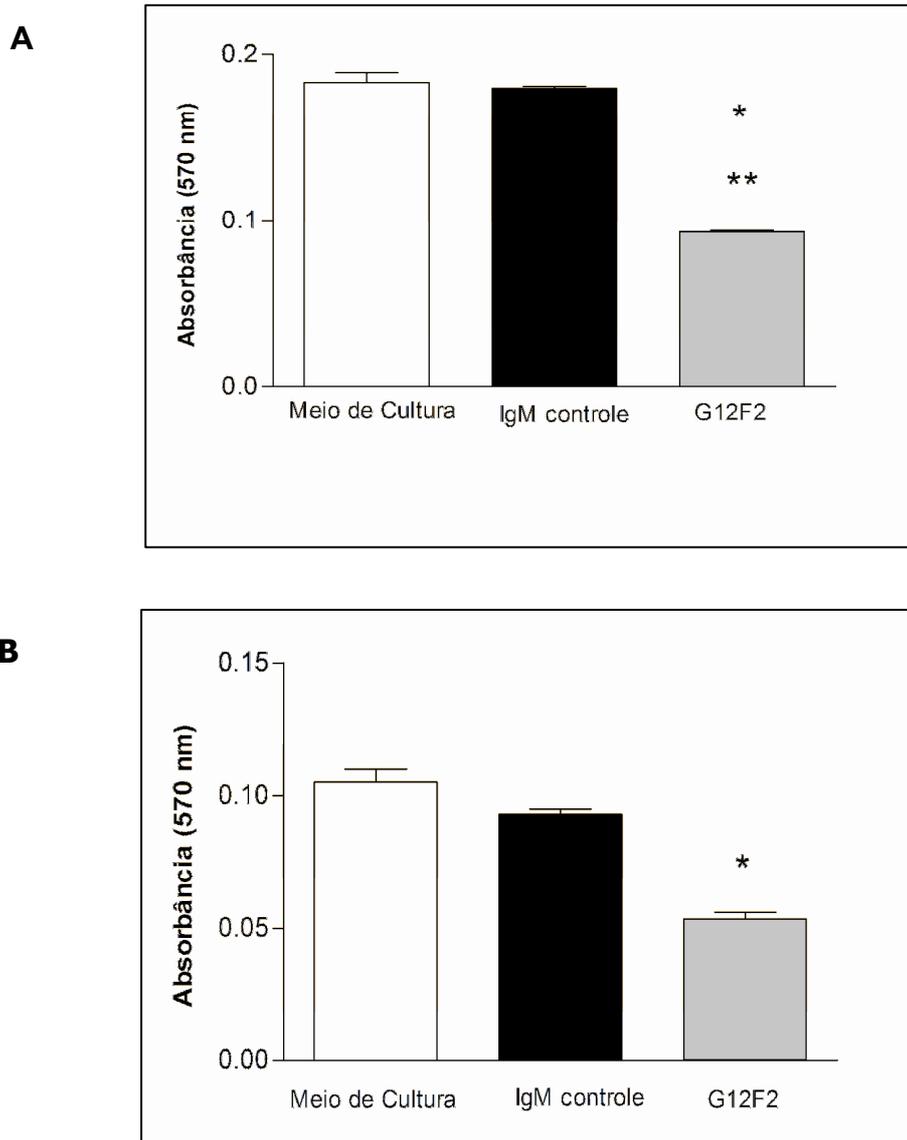


Figura 14. Inibição da migração e invasão de células B16 por G12F2 *in vitro*. (A) Melanoma murino B16 ressuspensionado em meio de cultura sem soro fetal bovino foi cultivado no compartimento superior de filtros Transwell e incubadas com G12F2 ou IgM controle (5 µg/ml) por 24 h à 37°C . Após incubação, os filtros foram removidos, fixados e corados com Azul de Toluidina para determinação da atividade migratória de células B16. * $p < 0.001$ e ** $p < 0.01$. (B) Células B16 ressuspensionadas em meio de cultura sem soro fetal bovino foram cultivadas na porção superior de filtros cobertos com camada de Matrigel. Após 24 horas de incubação à 37°C, células aderidas na porção inferior do filtro foram fixadas e coradas com Azul de Toluidina. Resultados foram obtidos após leitura em espectrofotômetro a 570 nm. * $p < 0.05$

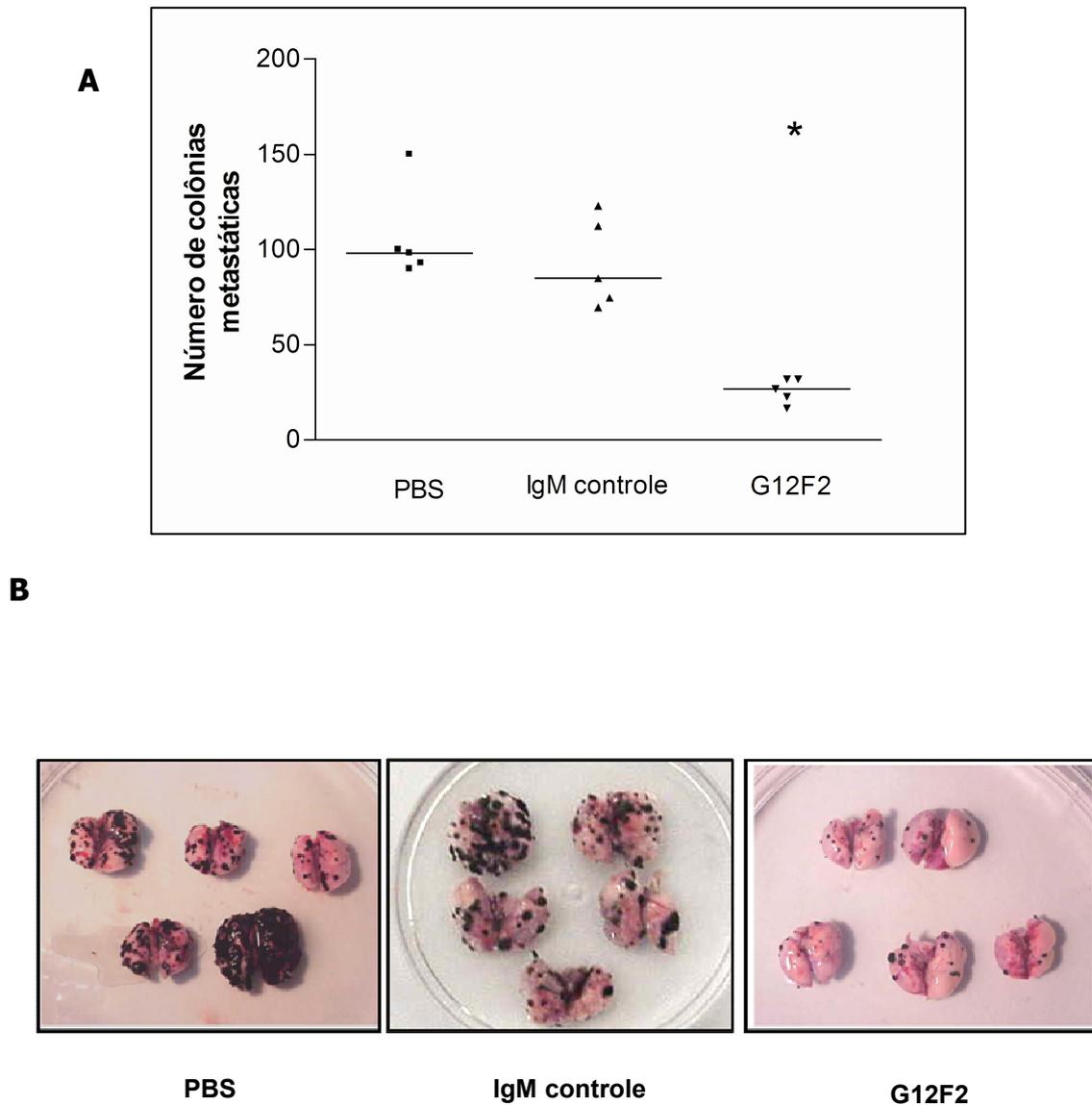


Figura 15. MAb G12F2 inibiu formação de metástases pulmonares por células B16. (A) Células B16 foram injetadas pela via endovenosa em camundongos C57BL/6 previamente tratados com 100 µg/ml de mAb G12F2 ou IgM controle, ou ainda PBS. Os animais foram tratados após desafio com G12F2 ou IgM controle (100 µg/ml) em três doses semanais. Vinte e um dias depois, foram sacrificados e o número de metástases determinado. $**p < 0.001$. (B) Pulmão dos animais tratados com G12F2 apresentaram número reduzido de colônias metastáticas e em menor diâmetro comparado aos animais tratados com IgM controle ou PBS.

4.13 G12F2 reconheceu antígeno de diferente peso molecular em células de melanoma humano e em outras linhagens de tumores humanos

A seguir, foi investigada possível ligação do mAb G12F2 quando testado contra extrato de células de origem humana. Em *Imunoblotting*, G12F2 reconheceu uma banda de peso molecular estimado em M_r 67,000 nos extratos dos tumores humanos no melanoma Mel85 e de M_r 75,000 em carcinomas de cólon uterino (CASKI) e cólon de intestino (LISP). O mesmo não foi observado para carcinoma mamário (MCF-7), contra qual G12F2 não demonstrou qualquer reatividade em *Imunoblotting* (Figura 16A e 16B).

4.14 G12F2 inibiu proliferação de células de melanoma humano Mel85 in vitro

Como a adição do mAb G12F2 às células B16 *in vitro* foi capaz de inibir atividade proliferativa destas células foi investigado se o mesmo aconteceria com células de melanoma humano. De acordo com a figura 17, o acréscimo do anticorpo monoclonal na concentração de 1,0 $\mu\text{g/ml}$ foi suficiente para deter proliferação destas células. Após o quarto dia em cultura, as células tratadas retomaram crescimento semelhante ao que foi observado com células de melanoma murino (Figura 17).

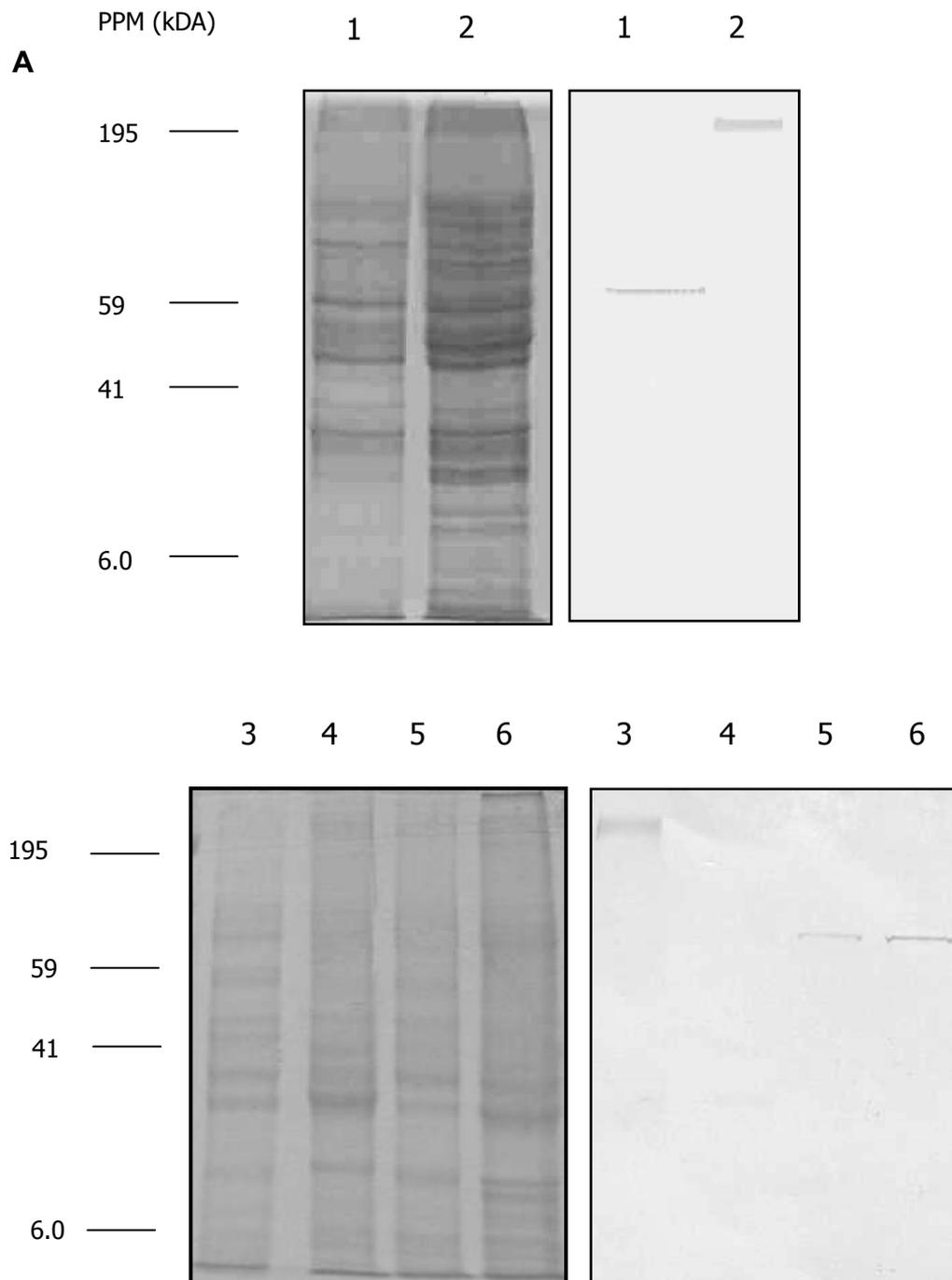


Figura 16. MAb G12F2 reconheceu molécula de M_r 67,000 em melanoma humano e M_r 75,000 em carcinoma de cólon de útero e de cólon de intestino humano. Extrato de células B16 (linhas 1 e 3) e de tumores de origem humana melanoma Mel85 (linha 2), carcinoma de mama MCF-7 (linha 4), carcinoma de cólon de intestino LISP (linha 5) e carcinoma de cólon de útero CASKI (linha 6) foram submetidos à eletroforese e corados por *Coomassie Blue* (à esquerda) ou transferidos para membrana de nitrocelulose (à direita). Incubação com ascite G12F2 (1/100) revelou uma banda correspondente à M_r 67,000 em melanoma humano e M_r 75,000 em carcinoma LISP e CASKI enquanto que nenhuma banda foi observada no extrato celular de carcinoma de mama MCF-7.

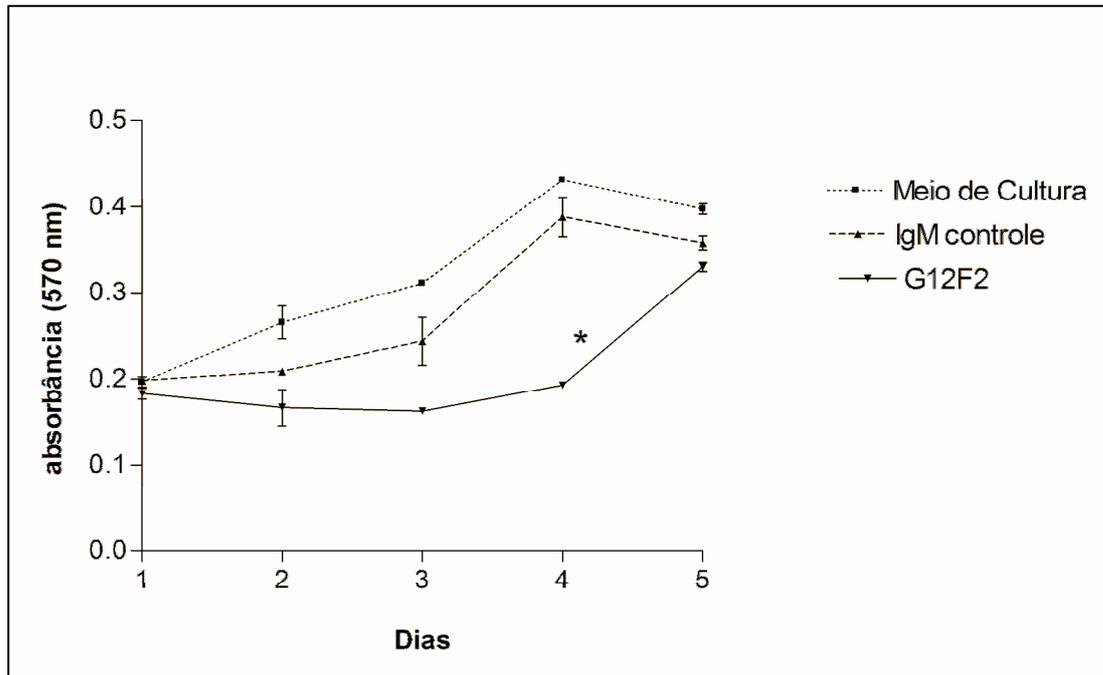


Figura 17. MAb inibiu proliferação de células de melanoma humano *in vitro*. Células de melanoma humano Mel85 foram cultivadas em placa de 96 poços e incubadas durante 24 horas a 37°C para completa adesão à superfície. Após este período, sobrenadante foi descartado e adicionado meio de cultura fresco, com mAb G12F2 ou IgM controle, na concentração de 1.0 µg/ml, para determinação da proliferação durante 5 dias. Diariamente MTT foi adicionado às triplicatas para avaliar a viabilidade celular. * $p < 0.05$

5 DISCUSSÃO

Apesar dos significativos avanços obtidos nos últimos anos em estudos experimentais e clínicos, a biologia dos melanomas permanece pouco esclarecida. Cada nova informação, portanto, representa importante passo para elucidação e tratamento da doença. Crescentes esforços são concentrados na identificação de moléculas tumorais importantes para diagnóstico e desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos para uso em tratamentos adjuvantes. Assim, a contribuição do presente trabalho à imunobiologia de melanomas consistiu na identificação de antígeno associado ao melanoma murino, não descrito na literatura, que eventualmente poderá vir a representar um novo marcador tumoral em melanomas humanos. Mais, a obtenção de anticorpo monoclonal contra esta nova molécula pode fornecer ferramentas para trabalhos visando desenvolvimento de imunoterapias contra melanomas.

Para que uma fusão celular seja bem sucedida, tanto a escolha do protocolo de imunização quanto da linhagem dos animais utilizados são fatores determinantes para obtenção de híbridos produtivos. Convencionalmente, a obtenção de resposta imune humoral contra moléculas de superfície celular é feita através da inoculação de grande número de células sem necessidade de adjuvantes (Trucco, Stocker, Caepellini 1978). Contudo, nosso protocolo ofereceu novos desafios. A imunização de camundongos C57BL/6 empregando células viáveis de melanoma murino B16 resultou em crescimento do tumor antes mesmo da detecção de título satisfatório de anticorpos no soro. Por outro lado, a baixa imunogenicidade destas células em camundongos singênicos fizeram que a inoculação subcutânea com células B16 em adjuvante de Freund não fosse capaz de promover altos títulos de resposta anticórpica.

Protocolos de imunização diretamente no órgão linfóide representam interessante alternativa para indução de altos títulos de resposta humoral (Goudie, Horne, Wilkinson 1966). Spitz *et col* (1984) descreveram protocolo de imunização primária diretamente no baço para quantidades limitadas de células ou antígeno solúvel. Em nosso caso, a introdução de células de melanoma murino por esta via também não produziu títulos satisfatórios de resposta imune humoral. Apenas a inoculação intraperitoneal ou subcutânea de células B16 irradiadas em adjuvante de Freund induziu alta resposta humoral, resultando em fusão celular bem sucedida (Figura 1 A).

Após fusão foi obtido anticorpo monoclonal da classe IgM de cadeia *Kappa* contra células de melanoma murino B16. Testado contra extrato celular total das mesmas, reconheceu uma única banda compacta de alto peso molecular (Figura 2A). Em citometria de fluxo, o mesmo anticorpo, designado G12F2, reconheceu 99% das células B16 contra 59% de reconhecimento pelo soro policlonal anti-B16 (controle positivo) e 20% de reconhecimento observado com anticorpo monoclonal IgM irrelevante usado como controle negativo (Figura 2B). Além de comprovar a especificidade do mAb, o resultado obtido por citometria de fluxo sugeriu que o antígeno de M_r 230,000 era expresso na superfície de células B16, depois confirmado mediante imagens captadas por Imunofluorescência e Microscopia Confocal. MAb G12F2 marcou fortemente a superfície celular, concentrando-se principalmente nas projeções de membrana tipo pseudópodos (Figura 3).

Antígenos tumorais expressos na superfície celular são considerados alvo preferencial para uso em diagnóstico e imunoterapia (Modak, Kramer *et al.* 2001). Além disso, correspondem às principais moléculas envolvidas nas interações da célula com fatores de crescimento, proteínas da matriz-extracelular ou células vizinhas, eventos necessários para proliferação e diferenciação celular (Dainiak 1991). Alterações na expressão de glicoproteínas da superfície celular podem contribuir para aquisição de fenótipo metastático (Sakiyama, Matsushita *et al.* 1988; Brooks, Lin *et al.* 1991).

Membranas celulares são ricas em fibronectina, glicoproteínas de adesão com alto peso molecular. Na matriz extracelular e membrana celular, a molécula de fibronectina é insolúvel formando heterodímeros ou multímeros de 200-280 kDa (Trefzer, Chen *et al.* 2006). Devido à alta concentração desta glicoproteína na membrana celular e ao peso molecular próximo à banda de M_r 230,000, revelada em *Immunoblotting*, tornou-se necessário afastar a possibilidade de que a molécula reconhecida pelo mAb G12F2 fosse fibronectina. Testado, o mAb não se ligou à fibronectina presente no extrato total de células B16 e nem à fibronectina purificada, dissipando qualquer dúvida de que fossem a mesma molécula (Figura 4).

Na literatura são descritos anticorpos monoclonais contra fibronectina, especialmente quando encontradas na superfície de melanomas. Trefzer *et al.* (2000) obtiveram anticorpo monoclonal SM5-1 com alta sensibilidade e especificidade contra espécimes de melanoma primário e metastáticos processados em parafina. O mesmo mAb não reagia contra melanócitos normais. Anos depois, o grupo identificou o

antígeno alvo do mAb SM5-1 como sendo uma variante de fibronectina, associando-a ao fenótipo metastático de melanomas (Trefzer, Chen *et al.* 2006).

Assim como a variante de fibronectina, a molécula de M_r 230,000 também está relacionada ao fenótipo maligno em células transformadas, fato sustentado pela evidência que células normais como fibroblastos e melanócitos murinos não expressaram esta proteína quando analisados por *Immunoblotting* (Figura 5). Mais ainda, células não tumorigênicas 3C e 4C, derivadas de melan-a, não a expressaram enquanto que células tumorigênicas da linhagem Tm5, de mesma origem (Oba-Shinjo, Correa *et al.* 2006), apresentaram-na em quantidades comparáveis às detectadas na linhagem B16 (Figura 6). Pela drástica diferença de expressão, a molécula de M_r 230,000 pode ser considerada marcador para distinção entre células normais e células malignas no modelo murino.

A progressão de melanomas é caracterizada tanto pela perda quanto pela aquisição de novos antígenos. A procura por antígenos que diferenciem lesões melanocíticas não é recente. Holzmann *et al.* (1987) empregaram um painel de mAbs para caracterizar múltiplos passos durante progressão tumoral em melanomas. A partir deste estudo, propuseram o conceito da progressão de melanomas humanos em cinco estágios definidos pelo padrão antigênico combinado às características histológicas da lesão.

Em nosso laboratório foi realizada seleção clonal *in vitro* a partir da linhagem B16, originando duas sub-linhagens mais e menos metastáticas. Em comparação às células menos metastáticas, a variante mais metastática foi mais positiva para atividade de endopeptidases, expressão de receptores para laminina tipo integrina e na quantidade de colônias pulmonares formadas em modelo de metástase experimental (Staquicini, Moreira *et al.* 2003). Conforme observado por *Immunoblotting*, extratos celulares das variantes mais e menos metastáticas também diferiram na expressão da molécula de M_r 230,000, que ocorreu proporcionalmente ao potencial de malignidade (Figura 7). Tais resultados sugerem correlação entre expressão da molécula de M_r 230,000 e fenótipo maligno. Contudo, não foi possível estabelecer relação direta entre esses eventos, uma vez que o último depende da ativação concomitante de diversas vias de sinalização, responsáveis por alterações do ciclo celular e carcinogênese (Yokota 2000). Por outro lado, a expressão ou não da molécula de M_r 230,000 representaria, respectivamente, prognóstico pior ou melhor da doença caso seja confirmado que em melanomas humanos exista também esta correlação.

Em seguida foram realizados estudos *in vitro* e *in vivo* objetivando conhecer funções desta molécula e sua importância biológica para células B16. Para tanto, diferentes protocolos para purificação do mAb G12F2 foram testados, incluindo cromatografia de gel filtração (Bouvet, Pires, Pillot 1984; Van Oss & Absalom 1984), sem que fosse obtida quantidade suficiente para uso experimental. É provável que a concentração do mAb fosse baixa no fluido ascítico, uma vez que por SDS-PAGE foram observadas bandas fracamente coradas correspondentes às frações de aproximadamente 77 e 25 kDa da molécula de IgM reduzida. Por fim, optou-se pela purificação parcial do fluido ascítico por precipitação com sulfato de amônio. A quantidade relativa de IgM na ascite precipitada foi estimada por ELISA, usando como referência IgM purificada de mesmo isotipo e concentração conhecida (Mukherjee & Chakraborty 1992). Desta maneira, obtivemos quantidade suficiente de mAb G12F2 para realização dos ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* (Figura 8).

A capacidade proliferativa de células malignas pode ser inibida pela neutralização, por mAb, de certas glicoproteínas de superfície. Foi observado que a adição de mAb G12F2 em cultura de células B16 alterou a cinética de crescimento celular, efeito acentuado pela concentração de 5µg/ml (Figura 9). Mesmo assim, a proliferação não foi totalmente abolida, apenas controlada. No quarto dia, as células B16 voltaram a proliferar, sugerindo que todo o mAb já havia sido consumido e que as células retomaram sua tendência inicial de crescimento.

A atividade anti-proliferativa do mAb G12F2 sugere que a proteína de M_r 230,000 tenha função no crescimento de células B16, podendo até corresponder a algum receptor transmembrânico para fator de crescimento celular. Vários receptores têm sido estudados, muitos deles intimamente relacionados com desenvolvimento e progressão tumoral, como por exemplo, receptor para fator de crescimento epidermal, receptor para fator de crescimento derivado de plaquetas, receptor para fator de crescimento do endotélio vascular e receptor para fator de crescimento de fibroblastos. Maloney *et al.* (2003) obtiveram mAb EM164 que se liga ao receptor para fator de crescimento tipo insulina I (IGF-IR), associado à transformação oncogênica, crescimento e sobrevivência em diversos tipos de neoplasias como sarcoma sinovial, carcinoma de mama, útero, ovário entre outros. Seus ligantes fisiológicos, IGF-I e IGF-II, são potentes mitógenos *in vitro*, estimulando crescimento tumoral de forma autócrina e parácrina. Também *in vitro*, mAb EM164 inibiu proliferação induzida por IGF-I e IGF-II em várias linhagens tumorais humanas, inclusive melanoma. O efeito antagonista de

EM164 foi estendido *in vivo*, inibindo desenvolvimento de xenotransplantes de células tumorais de pâncreas humano em camundongos SCID. Os autores sugerem que a ação bloqueadora do mAb EM164 sob IGF-IR bloqueia transdução de sinal para crescimento promovendo morte celular, já que a ativação deste receptor gera estímulos anti-apoptóticos em vários modelos experimentais.

Fernandes *et al.* (1999) obtiveram mAbs DMF10.62.3 e DMF10.62.4 contra células de linfoma murino de células T que, quando testados *in vitro*, demonstraram efeito anti-proliferativo porque induziam apoptose tanto em células de linfoma quanto em outros tipos de tumores humanos e murinos como melanomas e sarcomas. Posteriormente, Retter *et al.* (2005), identificaram o gangliosídeo GM₂ como antígeno alvo do mAb DMF10.62.4, muito embora o mecanismo pelo qual induzia apoptose não tenha sido esclarecido. You *et al.* (2004) obtiveram mAb indutor de apoptose em células de melanoma maligno humano, que agia bloqueando a via de sinalização iniciada por *Wnt-2*. Proteínas da família *Wnt* apresentam importante participação durante embriogênese e carcinogênese, uma vez que a via de sinalização *Wnt*/β-catenina responde pela sobrevivência em vários tipos de células. Tanto DMF10.62.4 quanto anti-*Wnt-2* demonstraram claramente promover morte celular quando testados *in vitro* e *in vivo*.

Em outros casos, o bloqueio da proliferação celular pode ser conseqüente à inibição da adesão das células após neutralização de moléculas de adesão por mAbs. Mills *et al.* (2002) observaram inibição do crescimento de células de melanoma humano quando adicionaram mAb ABX-MA1 à cultura, o qual reconhece a molécula MUC18 (Lehmann Riethmüller & Johnson 1989). MUC18, também conhecida como MCAM ou CD146, é uma molécula de adesão celular da superfamília das imunoglobulinas implicada em transdução de sinal quando aderida à fibronectina. Nesta condição ocorre fosforilação da quinase de adesão focal levando à ativação da via RAS (Guan & Shalloway 1992; Xie, Luca *et al.* 1997). Além da adesão ao substrato, MUC18 também está envolvida na adesão das células de melanoma às células endoteliais. Resultados obtidos em nosso laboratório, empregando técnica de *phage display*, demonstraram que esta mesma molécula medeia interação entre melanoma murino e células B-1. Após contato, células B16 apresentam aumento em seu comportamento metastático (Staquicini, submetido). Visto sua importância, MUC18 corresponde a um dos prováveis candidatos a mediador do crescimento e progressão tumoral (MacGary,

Heimberger *et al.* 2002). A neutralização de MUC18 *in vitro* pelo mAb ABX-MA1, culmina na inibição da proliferação de células de melanoma.

Outras moléculas de adesão, se bloqueadas com mAbs específicos, também podem interferir no crescimento de células tumorais *in vitro* e *in vivo*, como é o caso de moléculas de integrinas mutadas expressas na superfície celular de melanomas com alto potencial metastático (Boukerche, Baril *et al.* 2000). No nosso caso, MAb G12F2 não impediu a adesão de células B16 às proteínas de matriz-extracelular como fibronectina e laminina *in vitro* (Figura 10), sugerindo que a inibição da proliferação não teve relação com adesão heterotípica.

Também foi investigado se a molécula de M_r 230,000 poderia mediar interações homotípicas entre células de melanoma B16. Diferentemente de células normais, algumas células transformadas independem do substrato para crescimento (Plantefaber & Hynes 1989). Quando impedidas de adesão por cultivo em gel, crescem ancoradas entre si formando pequenos esferóides. Esse mecanismo é mediado por moléculas de adesão homotípicas e corresponde a um dos principais sustentáculos do processo metastático realizado por células de melanoma. A adição do mAb G12F2 em nada alterou a formação de esferóides por células B16 impedidas de adesão (Figura 11A). Contudo, estas células proliferaram menos do que células cultivadas sem mAb G12F2 ou na presença de mAb irrelevante. Ainda, a diminuição do crescimento não resultou de morte celular, conforme demonstrado pela adição de MTT às células após re-submetidas à adesão (Figura 11B), sugerindo que o bloqueio da molécula de M_r 230,000 não induziu apoptose em células B16.

Em geral, o bloqueio do crescimento *in vitro* por mAb pode ser reproduzível *in vivo*. Assim, camundongos C57Bl/6 foram desafiados com células B16 e tratados com mAb G12F2, IgM controle ou PBS para acompanhamento do crescimento do tumor subcutâneo. O crescimento do tumor em animais tratados com mAb G12F2 foi menor do que em animais tratados com mAb irrelevante ou PBS (Figura 12). Ao fim do tratamento com mAb G12F2 houve acelerada retomada de crescimento do nódulo, mostrando que a neutralização da molécula de M_r 230,000 conferiu proteção *in vivo*. MAbs inibem crescimento do tumor subcutâneo por diversas vias quando não o fazem diretamente pela indução de apoptose e pela inibição da adesão celular ao substrato ou célula-célula. Primeiro, podem recrutar fatores que interfiram no crescimento tumoral, como por exemplo, proteínas do sistema complemento, ativadas pela via clássica, com liberação de fatores pró-inflamatórios e formação de poros na membrana

celular culminando na destruição da célula alvo. Segundo, pela porção Fc, os mAbs ligam-se à superfície de células imunocompetentes, como macrófagos e neutrófilos, promovendo morte da célula tumoral dependente de anticorpo (ADCC). Qualquer um destes mecanismos poderia ser desencadeado pelo mAb G12F2, impedindo o estabelecimento de células B16 e crescimento do nódulo tumoral subcutâneo. Conforme mostrado, MAb G12F2 ativou proteínas do sistema complemento *in vitro*, culminando em morte de células B16 (Figura 13). O resultado sugere que esse mecanismo pode também ocorrer *in vivo*.

O processo de migração de células tumorais e formação de metástases em órgãos ou tecidos distantes consiste em uma série de passos sequenciais e relacionados. Assim, etapas subseqüentes, como migração através da via hematológica e linfática e invasão do estroma de órgãos-alvo para colonização secundária, constituem eventos amplamente estudados na busca de métodos eficazes que bloqueiem a formação de metástases (Gershenwald 2002; Fidler 2002). Células de melanoma murino B16 incubadas com mAb G12F2, perderam sua capacidade migratória e invasiva *in vitro* (Figura 14). O efeito pode ter sido gerado, por exemplo, pela neutralização de receptores para quimiocinas que sinalizam intracelularmente para alterações conformacionais, migração (quimiotaxia) e proliferação. O receptor CXCR4, amplamente expresso em células de câncer de próstata, pulmão, mama e melanoma, parece promover metástases em órgãos distantes (Muller, Homey *et al.* 2001; Murakami, Maki *et al.* 2002). A neutralização desta molécula, ou do seu ligante CXCL12, resulta na redução de metástases pulmonares (Cardones, Murakami, Hwang 2003). Assim como CXCR4, outros receptores para quimiocinas têm importante participação durante metástase de melanoma (Degli-Esposti, Davis-Smith *et al.* 1997; Fujisawa, Hayashi, Miller *et al.* 1999). Contudo, ainda precisa ser demonstrado se estes mecanismos foram responsáveis pela inibição da migração e invasão de células B16, promovida pelo mAb G12F2 *in vitro*.

A seguir foi investigado se a neutralização da molécula de M_r 230,000 era capaz de conter colonização pulmonar por células B16 injetadas pela veia da cauda. Análise do pulmão dos animais tratados com mAb G12F2 revelou número bem menor de metástases do que observado em animais tratados com mAb controle ou PBS (Figura 15A). Além disso, o diâmetro das metástases formadas foi menor pelo tratamento endovenoso com mAb G12F2 quando comparado ao observado nos grupos não tratados (Figura 15B). Da mesma forma, a inibição de metástases pulmonares pelo

tratamento com mAb G12F2 poderia corresponder à neutralização de algum receptor para quimiocina.

Devido à relevância destes achados para o modelo murino, foi investigado se a molécula de M_r 230,000 é também expressa em linhagens de origem humana. Extratos totais de melanoma, carcinoma de mama, útero e cólon foram analisados por *Immunoblotting* quanto à sua positividade ao mAb G12F2. Em nenhuma linhagem humana foi reconhecida a banda de aproximadamente 230 kDa. No extrato de melanoma humano, o mAb G12F2 reconheceu banda de aproximadamente 67 kDa enquanto que em carcinoma de mama e cólon foi detectada uma banda estimada em 75 kDa (Figura 16).

Há alguns anos, foi identificada e caracterizada molécula de 67 kDa em tumores humanos. Trata-se do receptor para laminina (67LR), também conhecido como receptor ligante para laminina (*laminin binding protein; LBP*), purificado e clonado por Wewer, *et al.* (1983) a partir de diferentes carcinomas e células de placenta humana. 67LR é super-expresso na superfície de grande parte dos tumores sólidos e possui forte correlação com potencial metastático, correspondendo a mau prognóstico (Kazmin, Hoyt *et al.* 2000; Moss, Taubner *et al.* 2006). Na superfície celular, a molécula 67LR é co-expressa e co-regulada com a integrina $\alpha 6\beta 4$, da qual é molécula acessória na ligação à laminina. Além de modular adesão celular à membrana basal, promove degradação da laminina por enzimas proteolíticas secretadas pela célula tumoral durante invasão e liberação de fragmentos de laminina envolvidos na motilidade da célula durante progressão tumoral (Ardini, Sporchia *et al.* 2002). Células de melanoma murino B16 também expressam receptor para laminina -1 de M_r 67,000, cuja expressão está relacionada ao nível de malignidade da célula. Engbring *et al.* (2002) identificaram outro sítio de ligação à laminina na superfície de células da sub-linhagem B16F10. O bloqueio deste outro receptor, de peso molecular entre M_r 150,000 e 200,000 em SDS-PAGE, foi realizado com peptídeo do domínio globular COOH-terminal da laminina $\alpha 1$ e inibiu o crescimento das células B16F10 em Matrigel.

Embora o antígeno reconhecido por mAb G12F2 em extrato de melanoma humano apresente peso molecular semelhante ao receptor para laminina (67 kDa) não foi esclarecido se a molécula reconhecida por G12F2 em melanoma humano é o receptor para laminina. MAb G12F2 poderia até reconhecer um domínio em 67LR, ou ainda, alguma proteína que co-migre na mesma altura de 67 kDa. Contudo, a

identificação do antígeno reconhecido em melanoma humano só será possível após a purificação e sequenciamento desta proteína.

O fato de mAb G12F2 ter sido capaz de inibir a proliferação de células de melanoma *in vitro* fornece evidência de que a proteína reconhecida em melanoma e carcinoma humano pode estar envolvida em mecanismos de proliferação celular assim como em células de melanoma murino. Células humanas, em contato com mAb G12F2, apresentaram mesmo perfil de crescimento *in vitro* que células de melanoma murino. Em ambos os casos, após o quarto dia em cultura voltaram a proliferar (Figura 17).

Analisados em conjunto, os resultados obtidos a partir deste estudo representam significativo passo no esclarecimento das características biológicas associadas à malignidade em células de melanoma murino e humano. A caracterização bioquímica e molecular da proteína de M_r 230,000 abrirá novas frentes de estudos sobre carcinogênese. O sequenciamento desta molécula permitirá a busca por seqüências homólogas em melanomas humanos que, por sua vez, poderiam se tornar marcadores de diferenciação e progressão da neoplasia. Na prática clínica, um dos usos mais importantes poderia ser para exame de linfonodo sentinela em pacientes portadores de melanoma (Claessens, Pierard *et al.* 2005; Esser 2006; Rutkowski, Nowecki *et al.* 2006). Além disso, poderá ser incluída em novas estratégias de imunoterapia, como por exemplo, em vacinas com peptídeos e células imunocompetentes previamente ativadas. Por fim, a neutralização desta molécula por anticorpo monoclonal poderá, eventualmente, corroborar no tratamento da doença em conjunto com outras terapias.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo foi identificada proteína de 230 kDa, ainda não descrita na literatura, expressa na superfície de células melanoma murino B16. Anticorpo monoclonal G12F2 contra este antígeno bloqueou atividades biológicas responsáveis pela proliferação, migração e invasão por células B16 e promoveu lise mediada por complemento *in vitro*. Além disso, inibiu crescimento tumoral e formação de metástases pulmonares em camundongos singênicos.

Por *Immunoblotting*, MAb G12F2 reconheceu banda de 67 kDa em extrato celular de melanoma e 75 kDa em extrato celular de carcinoma, ambos de origem humana. Inibiu ainda, proliferação de células de melanoma humano em cultura.

Melhor caracterização desta molécula de M_r 230,000 poderá contribuir para o esclarecimento de eventos relativos à carcinogênese, bem como no desenvolvimento de protocolos visando imunoterapias contra melanomas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDINI E, SPORCHIA B, POLLEGIONI L, MODUGNO M, GHIRELLI C, CASTIGLIONI F, TAGLIABUE E, MENARD S. Identification of a novel function for 67-kDa laminin receptor: increase in laminin degradation rate and release of motility fragments. *Cancer Res* 2002; 62 (5): 1321-5.
- BECKER JC AND BRÖCKER EB. Lymphocyte-melanoma interaction: role of surface molecules. *Rec Resul Cancer Res* 1995; 139: 205-14.
- BOGENRIEDER T AND HERLYN M. Cell-surface proteolysis, growth factor activation and intercellular communication in the progression of melanoma. *Critical Reviews in Oncology/ Hematology* 2002; 44: 1-15.
- BOHM M, MOELLMANN G, CHENG E, ALVAREZ-FRANCO M, WAGNER S, SASSONE-CORSI P, HALABAN R. Identification of p90RSK as the probable CREB-Ser133 kinase in human melanocytes. *Cell Growth Differ* 1995; 6: 291-302.
- BOUKERCHE H, BARIL P, TABONE E, BERARD F, SANHADJI K, BALME B, WOLF F, PERROT H, THOMAS L. A new M_r 55,000 surface protein implicated in melanoma progression: association with a metastatic phenotype. *Cancer Res* 2000; 60: 5848-56.
- BOUVET JP, PIRES R, PILLOT J. A modified gel filtration technique producing an unusual exclusion volume of IgM: a simple way of preparing monoclonal IgM. *J Immunol Methods* 1984; 66 (2): 299-305.
- BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54
- BROOKS PC, LIN JM, FRENCH DL, QUIGLEY JP. Subtractive immunization yields monoclonal antibodies that specifically inhibit metastasis. *J Cell Biol* 1993; 122: 1351-59.
- BULLANI RR, WEHRLI P, VIARD-LEVEUGLE I, RIMOLDI D, CEROTTINI JC, SAURAT JH, TSCHOPP J, FRENCH LE. Frequent down-regulation of Fas (CD95) expression and function in melanoma. *Melanoma Res* 2002; 12: 263-70.
- BULLANI RR, HUARD B, VIARD-LEVEUGLE I, BYERS HR, IRMLER M, SAURAT JH, TSCHOPP J, FRENCH LE. Selective expression of FLIP in malignant melanocytic skin lesions. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 360-4.
- CARDONES AR, MURAKAMI T, HWANG ST. CXCR4 enhances adhesion of B16 tumor cells to endothelial cells in vitro and in vivo via beta (1) integrin. *Cancer Res* 2003; 63 (20): 6751-7.
- CIFONE MA AND FIDLER IJ. Increasing metastatic potential is associated with increasing genetic instability of clones isolated from murine neoplasms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78 (11): 6949-52.

- CHAMBERS AF, GROOM AC, MACDONALD IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002; 2 (8):563-72.
- CHAPMAN PB, LONBERG M, HOUGHTON AN. Light chain variants of an IgG3 anti-monoclonal antibody and the relationship among avidity, effector functions, tumor targeting and antitumor activity. *Cancer Res* 1990; 50 (5): 1503.
- CHOW DA AND GREENBERG AH. The generation of tumor heterogeneity in vivo. *Int J Cancer* 1980; 25: 261-65.
- CHUDNOVSKY Y, KHAVARI P, ADAMS AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J. Clin Invest* 2005;115: 813-24.
- CLAESSENS NG, PIERARD E, PIERARD-FRANCHIMONT C, ARRESE JE, QUATRESOOZ P. Immunohistochemical detection of incipient melanoma micrometastases. Relationship with sentinel lymph node involvement. *Melanoma Res* 2005; 15 (2): 107-10.
- CLARIJUS R, SCALKWIJK L, HOFMANN UB, RUITER DJ, DE WAAL RM. Induction of vascular endothelial growth factor receptor-3 expression on tumor microvasculature as a new progression marker in human cutaneous melanoma. *Cancer Res* 2002; 62: 7059-65.
- CLARK WH JR, REIMER RR, GREENE M, AINSWORTH AM, MASTRANGELO MJ. Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions: The B-K mole syndrome. *Arch Dermatol* 1978; 114 (5): 732-8.
- CLARK WH. Tumour progression and the nature of cancer. *Br J Cancer* 1991; 64 (4): 631-44.
- CLARK WH JR, ELDER DE, GUERRY D 4TH, EPSTEIN MN, GREENE MH, VAN HORN M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 1984; 15 (12): 1147-65.
- CLYNES R; TAKECHI Y, MOROI Y, HOUGHTON A, RAVETCH JV. Fc receptors are required in passive and active immunity to melanoma. *Immunology*. 1998; 95 (2): 652-6.
- COLNAGHI MI, MENARD S, TAGLIABUE E, TORRE GD. Heterogeneity of the natural humoral anti-tumor immune response in mice as shown by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1982; 128: 2757-62.
- DAI DL, MAKRETSOV N, CAMPOS EI, HUANG C, ZHOU Y, HUNTSMAN D, MARTINKA M, LI G. Increased expression of integrin-linked kinase is correlated with melanoma progression and poor patient survival. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4409-14.
- DAINIYAK N. Surface membrane-associated regulation of cell assembly, differentiation and growth. *Blood* 1991; 78 (2): 264-76.
- DANEN EH, TEN BERGE PJ, VAN MUIJEN GN, VAN 'T HOF-GROOTENBOER AE, BROCKER EB, RUITER DJ. Emergence of alpha 5 beta 1 fibronectin- and alpha v beta 3 vitronectin-receptor expression in melanocytic tumour progression. *Histopathology* 1994; 24: 249-56.

- DE VITA VT, HELLMAN S, ROSEMBERG, SA. *Biologic Therapy of Cancer*. J. B. Lippincott Company; 1991, 311-33.
- DE WIT NJ, VAN MUIJENET GNP, RUITER DJ. Immunohistochemistry in melanocytic proliferative lesions. *Histopathol* 2004; 44: 517-41.
- DE WIT PE, MORETTI S, KOENDERS PG, WETERMAN MA, VAN MUIJEN GN, GIANOTTI B, RUITER DJ. Increasing epidermal growth factor receptor expression in human melanocytic tumor progression. *J Invest Dermatol* 1991; 99: 168-73.
- DEGLI-ESPOSTI MA, DAVIS-SMITH T, DIN WS, SMOLAK PJ, GOODWIN RG, SMITH CA. Activation of the lymphotoxin beta receptor by cross-linking induces chemokine production and growth arrest in A375 melanoma cells. *J Immunol* 1997; 15; 158 (4): 1756-62.
- DELBALDO C, MASOUYE I, SAURAT JH, VASSALLI JD, SAPPINO AP. Plasminogen activation in melanocytic neoplasia. *Cancer Res* 1994; 54: 4547-52.
- DENTON KJ, STRETCH JR, GATTER KC, HARRIS AL. A study of adhesion molecules as markers of progression in malignant melanoma. *J Pathol* 1992; 167: 187-91.
- DEVITA VT, HELLMAN S, ROSENBERG SA. *Cancer: Principles and practice of Oncology*". 5th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott.1982: 1935-93.
- DHAWAN P, SINGH AB, ELLIS DL, RICHMOND A. Constitutive activation of Akt/protein kinase B in melanoma leads to up-regulation of nuclear factor-kappa B and tumor progression. *Cancer Res* 2002; 62: 7335-42.
- DORVAULT CC, WEILBAECHER KN, YEE H, FISHER DE, CHIRIBOGA LA, XU Y, CHHIENG DC. Microphthalmia transcription factor: a sensitive and specific marker for malignant melanoma in cytologic specimens. *Cancer* 2001; 93: 337-43.
- ECCLES SA. Monoclonal antibodies targeting cancer: 'magic bullets' or just the trigger? *Breast Cancer Res* 2001; 3 (2): 86-90.
- ESSNER R. Sentinel lymph node biopsy and melanoma biology. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (7): 2320-5.
- FERNANDES DM, BAIRD AM, BERG LJ, ROCK KL. A monoclonal antibody reactive with a 40-kDa molecule on fetal thymocytes and tumor cells blocks proliferation and stimulates aggregation and apoptosis. *J Immunol* 1999; 163 (3): 1306-14.
- FIDLER IJ. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nature New Biology* 1973; 242: 148-9.
- FIDLER IJ. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 1978; 38 (9):2651-60.
- FIDLER IJ AND RADINSKY R. Genetic control of cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82 (3): 166-8.
- FIDLER IJ. Critical determinants of metastasis. *Seminars in Cancer Biology* 2002; 12, 89-96.

- FIDLER IJ. The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation* 2002; 70, 498-505.
- FLORENES VA, MAELANDSMO GM, KERBEL RS, SLINGERLAND JM, NESLAND JM, HOLM R. Protein expression of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 in malignant melanoma: inverse correlation with disease-free survival. *Am J Pathol* 1998; 153: 305-12.
- FOGEL M, MECHTERSHEIMER S, HUSZAR M, SMIRNOV A, ABU-DAHI A, TILGEN W, REICHRATH J, GEORG T, ALTEVOGT P, GUTWEIN P. 1 adhesion molecule (CD171) in development and progression of human malignant melanoma. *Cancer Lett* 2003; 189: 237-47.
- FUCHS J AND PACKER L. Ultraviolet irradiation and the skin antioxidant system. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 1990; 7 (4): 183.
- FUJISAWA N, HAYASHI S, MILLER EJ. A synthetic peptide inhibitor for alpha-chemokines inhibits the tumour growth and pulmonary metastasis of human melanoma cells in nude mice. *Melanoma Res* 1999; 9 (2): 105-14.
- GEORGIEVA J, SINHA P, SCHADENDORF D. Expression of cyclins and cyclin dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions. *J Clin Pathol* 2001; 54:229-35.
- GERSHENWALD JE AND FIDLER IJ. Cancer: Targeting lymphatic metastasis. *Science* 2002; 296 (5574): 1811-2.
- GONCHARUK VN, ROSS JS, CARLSON JA. Actin-binding protein fascin expression in skin neoplasia. *J Cutan Pathol* 2002; 29: 430-8.
- GOUDIE RB, HORNE CH, WILKINSON PC. A simple method for producing antibody specific to a single selected diffusible antigen. *Lancet* 1966; 2 (7475): 1224-6.
- GUAN JL AND SHALLOWAY D. Regulation of focal adhesion-associated protein tyrosine kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation. *Nature* 1992; 358 (6388): 690-2.
- GUAN X, SAGARA J, YOKOYAMA T, KOGANEHIRA Y, OGUCHI M, SAIDA T, TANIGUCHI S. ASC/TMS1, a caspase-1 activating adaptor, is downregulated by aberrant methylation in human melanoma. *Int J Cancer* 2003; 107: 202-8.
- HAKANSSON L AND TROPE C. On the presence within tumours of clones that differ in sensitivity to cytostatic drugs. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1974; 82: 35-40.
- HALPERN BN, BIOZZI G, STIFFEL C, MOUTON D. Inhibition of tumour growth by administration of killed *corynebacterium parvum*. *Nature* 1966; 212 (64): 853-4.
- HELLING F, CALVES M, SHANG Y, OETTGEN HF, LIVINGSTON PO. Construction of immunogenic GD3 conjugate vaccines. *Ann Acad Sci* 1993; 690: 396-7.

- HELLSTRÖM I, GARRIGUES HJ, CABASCO L, MOSELY GH, BROWN JP, HELLSTROM KE. Studies of a high molecular weight human melanoma-associated antigen. *J Immunol* 1983; 130, 1467-1472.
- HELLSTRÖM I, BRANKOVAN V, HELLSTROM KE. Strong antitumor activity of IgG3 antibodies to a human melanoma-associated gangliosides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 1499-1502.
- HEMMILA MR AND CHANG AE. Clinical implications of the new biology in the development of melanoma vaccines. *J Surg Oncol* 1999; 70: 263-74.
- HEPPNER GH. Tumor Heterogeneity. *Cancer Res* 1984; 44: 2259-65.
- HERD ZL. Suppression of B16 melanoma lung colonization by syngeneic monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1987; 47: 2696-703.
- HERLYN M, MENRAD A, KOPROWSKI H. Structure, function, and clinical significance of human tumor antigens. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82 (24): 1883-9.
- HERLYN M, BERKING C, SATYAMOORTHY K. Lessons from melanocyte development for understanding the biological events in naevus and melanoma formation. *Melanoma Res* 2000; 10: 1-10.
- HOFMANN UB, WESTPHAL JR, ZENDMAN AJ, BECKER JC, RUITER DJ, VAN MUIJEN GN. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression. *J Pathol* 2000; 191: 245-56.
- HOLZMANN BE, BRÖCKER B, LEHMANN JM, RUITER DJ, SORG C, RIETHMULLER G, JOHNSON JP. Tumor progression in human malignant melanoma: five stages defined by their antigenic phenotypes. *Int. J Cancer* 1987; 39: 466-71.
- HOUGHTON AN. Cancer antigens: immune recognition of self and altered self. *J Exp Med* 1994; 180, 1-4.
- HOUGHTON AN, GOLD JS, BLACHERE NE. Immunity against cancer: lessons from melanoma. *Cur Opin Immunol* 2001; 13: 134-140.
- HSU MY, WHEELLOCK MJ, JOHNSON KR, HERLYN M. Shifts in cadherin profiles between human melanocytes and melanomas. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1996; 1: 188-94.
- HUBER MA, KRAUT N, PARK JE, SCHUBERT RD, RETTIG WJ, PETER RU, GARIN-CHESA P. Fibroblast activation protein: differential expression and serine protease activity in reactive stromal fibroblasts of melanocytic skin tumors. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 182-8.
- IMAI M, LANDEN C, OHTA R, CHEUNG NK, TOMLINSON S. Complement-mediated mechanisms in anti-GD2 monoclonal antibody therapy of murine metastatic cancer. *Cancer Res* 2005; 65 (22):10562-8.

- JOHNSON CW, BARTH RF, ADAMS D, HOLMAN B, PRICE JE, SAUTINS I. Phenotypic diversity of murine B16 melanoma detected by anti-B16 monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1987; 47: 1111-7.
- JOHNSON JP. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 1999; 18: 345-7.
- KAGESHITA T, YOSHII A, KIMURA T, MARUO K, ONO T, HIMENO M, NISHIMURA Y. Biochemical and immunohistochemical analysis of cathepsins B, L and D in human melanocytic tumours. *Arch Dermatol Res* 1995; 287: 266-72.
- KANTOR RR, ALBINO AP, NG AK, FERRONE S. Biosynthesis and intracellular processing of four human melanoma-associated antigens. *Cancer Res* 1986; 46 (10): 5223-8.
- KAZMIN DA, HOYT TR, TAUBNER L, TEINTZE M, STARKEY JR. Phage display mapping for peptide 11 sensitive sequences binding to laminin-1. *J Mol Biol* 2000; 298 (3): 431-45.
- KEY ME AND HANNA JR MG. Mechanism of action of BCG-tumor cell vaccines in the generation of systemic tumor immunity. II. Influence of the local inflammatory response on immune reactivity. *J Natl Cancer Inst* 1981; 67(4):863-9.
- KIRKWOOD JM, IBRAHIM JG, SONDAK VK, RICHARDS J, FLAHERTY LE, ERNSTOFF MS, SMITH TJ, RAO U, STEELE M, BLUM RH. High- and low-dose interferon alfa-2b in high-risk melanoma: first analysis of intergroup trial E1690/S9111/C9190. *J Clin Oncol* 2000; 18 (12): 2444-58.
- KIM CJ, DESSUREAULT S, GABRILOVICH D, REINTGEN DS, SLINGLUFF CL JR. Immunotherapy for Melanoma. *Cancer Control* 2002; 9 (1): 22-30.
- KLEIN G AND KLEIN E. Surveillance against tumors--is it mainly immunological? *Immunol Lett* 2005; 100 (1): 29-33.
- KOGANEHIRA Y, TAKEOKA M, EHARA T, SASAKI K, MURATA H, SAIDA T, TANIGUCHI S. Reduced expression of actin-binding proteins, h-caldesmon and calponin h1, in the vascular smooth muscle inside melanoma lesions: an adverse prognostic factor for malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2003; 148: 971-80.
- KÖHLER G AND MILSTEIN C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumour lines by cell fusion. *Eur J Immunol* 1976; 6: 511-9.
- KOMENAKA I, HOERIG H, KAUFMAN HL. Immunotherapy for melanoma. *Clin Dermatol* 2004; 22: 251-65.
- KONDOH M, UEDA M, ICHIHASHI M, MISHIMA Y. Decreased expression of human melanoma-associated antigen ME491 along the progression of melanoma pre-canceroses to invasive and metastático melanomas. *Melanoma Res* 1993; 35: 317-23.
- KOPROWSKI H, STEPLEWSKI Z, HERLYN D, HERLYN M. Study of antibodies against human melanoma produced by somatic cell hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75 (7): 3405-9.

- KORABIOWSKA M, BRINK U, HOENIG JF, BARTKOWSKI SB, KELLNER S, MARX D, SCHAUER A. Significance of P-53 antigen in malignant melanomas and naevi of the head and neck area. *Anticancer Res* 1995; 15: 885-9.
- KORABIOWSKA M, BETKE H, KELLNER S, STACHURA J, SCHAUER A. Differential expression of growth, arrest, DNA damage genes and tumor suppressor gene p53 in naevi and malignant melanomas. *Anticancer Res* 1997; 17: 3697-700.
- KNUTH A. Response to monoclonal antibodies in melanoma specific or no-specific? *Eur J Clin Oncol* 1986; 22 (11): 1285-8.
- LASSAM N AND BICKFORD S. Loss of c-kit expression in cultured melanoma cells. *Oncogene* 1992; 7 (1): 51-6.
- LEDDA F, BRAVO AI, ADRIS S, BOVER L, MORDOH J, PODHAJECER OL. The expression of the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 210-4.
- LEHMANN JM, HOLZMANN B, EW BREITBART, P SCHMIEGELOW, G RIETHMULLER, JOHNSON JP. Discrimination between benign and malignant cells of melanocytic lineage by two novel antigens, a glycoprotein with a molecular weight of 113,000 and a protein with a molecular weight of 76,000. *Cancer Res* 1987; 47 (3): 841-5.
- LEHMANN JM, RIETHMÜLLER G, JOHNSON JP. MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc Nat Acad Sci USA* 1989; 6: 9891-95.
- LENS MB AND DAWES M. Interferon alfa therapy for malignant melanoma: a systematic review of randomized controlled trials. *J Clin Oncol* 2002; 20 (7): 1818- 25.
- LEWIS JJ AND HOUGHTON AN. Definition of tumor antigens suitable for vaccine construction. *Semin Cancer Biol* 1995; 6 (6):321-7.
- LEWIS JJ. Therapeutic cancer vaccines: using unique antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 5 (101) Suppl 2: 14653-6.
- LI G AND HERLYN M. Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol Med Today* 2000; 6: 163-9.
- LIVINGSTON PO, WONG GY., ADLURI S, TAO Y, PADAVAN M, PARENTE R, HANLON C, CALVES MJ, HELLING F, RITTER G, Improved survival in stage III melanoma patients with GM2 antibodies: a randomized trial of adjuvant vaccination with GM2 ganglioside. *J Clin Oncol* 1994; 12 (5): 1036-44.
- LYNCH HT, FRICHOT 3RD BC, FISHER J, SMITH JL JR, LYNCH JF. Spontaneous regression of metastatic malignant melanoma in 2 sibs with xeroderma pigmentosum. *Med Genet* 1978; 15 (5): 357-62.

- LODE HN, XIANG R, PERTL U, FORSTER E, SCHOENBERGER SP, GILLIES SD, REISFELD RA. Melanoma immunotherapy by targeted IL-2 depends on CD4 (+) T-cell help mediated by CD40/ CD40L interaction. *J Clin Invest* 2000; 105 (11): 1623-30.
- LOPES JD, AND ALVES MJM. Production of monoclonal antibodies by somatic cells hybridization. In C. M. Moreal (ed.), *Genes and parasites. A laboratory manual*. Rio de Janeiro, Brazil. 1983. p. 386-398.
- MAC PHERSON I AND MONTAGNIER L. Agar Suspension Culture for the selective Assay of Cells Transformed by Polyoma Virus. *Virology* 1969; 23: 291-294.
- MALONEY EK, MCLAUGHLIN JL., DAGDIGIAN NE, GARRETT LM, CONNORS KM, ZHOU XM, BLATTLER WA, CHITTENDEN T, SINGH R. An anti-insulin-like growth factor I receptor antibody that is a potent inhibitor of cancer cell proliferation. *Cancer Res* 2003; **63** (16): 5073-83.
- MCCAFFERY M, YAO TJ, WILLIAMS L, LIVINGSTON PO, HOUGHTON AN, CHAPMAN PB. Immunization of melanoma patients with BEC2 anti-idiotypic monoclonal antibody that mimics GD3 ganglioside enhanced immunogenicity when combined with adjuvant. *Clin Cancer Res* 1995; 2 (4): 2251.
- MCGARY EC, HEIMBERGER A, MILLS L, WEBER K, THOMAS GW, SHTIVELBAND M, LEV DC, BAR-ELI M. A fully human antimelanoma cellular adhesion molecule/MUC18 antibody inhibits spontaneous pulmonary metastasis of osteosarcoma cells *in vivo*. *Clin Cancer Res* 2003; 15: 6560-66.
- MEIJE CB, MOOI WJ, LE POOLE IC, VAN MUIJEN GN, DAS PK. Micro-anatomy related antigen expression in melanocytic lesions. *J Pathol* 2000; 190: 572-8.
- MILLS L, TELLEZ C, SUYUN HUANG, CHERYL BAKER, MARYA MCCARTY, LARRY GREEN, JEAN M. GUDAS, X. FENG AND MENASHE BAR-ELI. Fully human antibody to MCAM/MUC18 inhibits tumor growth and metastasis of human melanoma. *Cancer Res* 2002; 62: 5106-14.
- MODAK S, KRAMER K, GULTEKIN SH, GUO HF, CHEUNG NV. Monoclonal antibody 8H9 targets a novel cell surface antigen expressed by a wide spectrum of human solid tumors. *Cancer Res* 2001; 61 (10): 4048-54.
- MORETTI S, PINZI C, SPALLANZANI A, BERTI E, CHIARUGI A, MAZZOLI S, FABIANI M, VALLECCHI C, HERLYN M. Immunohistochemical evidence of cytokine networks during progression of human melanocytic lesions. *Int J Cancer* 1999; 20: 160-8.
- MOSS BL, TAUBNER L, SAMPLE YK, KAZMIN DA, COPIE V, STARKEY JR. Tumor shedding of laminin binding protein modulates angiostatin production *in vitro* and interferes with plasmin-derived inhibition of angiogenesis in aortic ring cultures. *Int J Cancer* 2006; 118 (10): 2421-32.

- MUKHERJEE J, SCHARFF MD, CASADEVALL A. Protective murine monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 1992 Nov; 60 (11): 4534-41.
- MUKHERJI B AND CHAKRABORTY NG. Immunobiology and Immunotherapy of melanoma. *Cur Opin Oncol* 1995; 7 (2): 175-84.
- MULLER A, HOMEY B, SOTO H, GE N, CATRON D, BUCHANAN ME, MCCLANAHAN T, MURPHY E, YUAN W, WAGNER SN, BARRERA JL, MOHAR A, VERASTEGUI E, ZLOTNIK A. A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410 (6824): 50-6.
- MURAKAMI T, MAKI W, CARDONES AR, FANG H, TUN KYI A, NESTLE FO, HWANG ST. Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. *Cancer Res* 2002; 62 (24): 7328-34.
- NASI ML, MEYERS M, LIVINGSTON PO, HOUGHTON AN, CHAPMAN PB. Anti-melanoma effects of R24, a monoclonal antibody against GD3 ganglioside. *Melanoma Res*. 1997; Suppl 2; S155-62.
- NESTLE FO, BURG G, DUMMER R. New perspectives on immunobiology and immunotherapy of melanoma. *Immunol Today* 1999; 20 (1): 5-7.
- NIEMANN TH. AND ARGENYI ZB. Immunohistochemical study of Spitz nevi and malignant melanoma with use of antibody to proliferating cell nuclear antigen. *Am J Dermatopathol* 1993; 15: 441-5.
- NISHINAKA Y, RAVINDRANATH MH, IRIE RF. Development of a human monoclonal antibody to ganglioside GM2 with potential for cancer treatment. *Cancer Res* 1996; 56: 5666-71.
- OBA-SHINJO SM, CORREA M, RICCA TI, MOLOGNONI F, PINHAL MA, NEVES IA, MARIE SK, SAMPAIO LO, NADER HB, CHAMMAS R, JASIULIONIS MG. Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. *Neoplasia* 2006; 8 (3): 231-41.
- OHASHI A, FUNASAKA Y, UEDA M, ICHIHASHI M. c-Kit receptor expresión in cutaneous malignant melanoma and benign melanotic naevi. *Melanoma Res*_1996; 6: 25-30.
- OHMACHT GA AND MARINCOLA FM. Heterogeneity in expression of human leukocyte antigens and melanoma-associated antigens in advanced melanoma. *J Cell Phys* 2000; 182 (3): 332-8.
- ORCHARD GE. Comparasion of immunohistochemical labelling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB 45 with NKIC3 and S100 protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma. *Histochem J* 2000; 32: 475-81.
- ORCHARD GE. Evaluation of melanocytic neoplasms: application of a pan-melanoma antibody cocktail. *Br J Biomed Sci* 2002; 59: 196-202.

- PAGGI MG, CATRICALA C, C. AMANTEA, A. PICARDO, M. NATALI, P. G. BALDI, F. BALDI, A. SP-22 analysis of APAF-1 expression in human cutaneous melanoma progression. *Pigment Cell Res* 2003; 16: 589.
- PARK HR AND MIN SK. Expression of S100A2 and S100B proteins in epithelial tumors of the skin. *J Cutan Pathol* 2003; 30: 373-8.
- PENN I. Ultraviolet light and skin cancer. *Immunol Today* 1990; 6: 206- 7.
- PLANTEFABER L AND HYNES RO. Changes in integrins receptors on oncogenically transformed cells. *Cell* 1989; 56: 281-290.
- POLSKY D, MELZER K, HAZAN C, PANAGEAS KS, BUSAM K, DROBNJAK M, KAMINO H, SPIRA JG, KOPF AW, HOUGHTON A, CORDON-CARDO C, OSMAN I.. HDM2 protein overexpression, but not gene amplification, is related to tumorigenesis of cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94 (23): 1803-6
- POSNER MR, ANTONIOU D, GRIFFIN J, SCHLOSSMAN SF, LAZARUS H. An enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of monoclonal antibodies to cell surface antigens on viable cells. *J Immunol Methods* 1982; 48, 21-23.
- PREHN RT. Analysis of antigenic heterogeneity within individual 3-methyl-cholanthrene-induced mouse sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 1970; 45: 1039-45.
- POSTE G, DOLL J, BROWN AE, TZENG J, ZEIDMAN I. Comparison of the metastatic properties of B16 melanoma clones isolated from cultured cell lines, subcutaneous tumors, and individual lung metastases. *Cancer Res* 1982; 42: 2770-78.
- PUKEL CS, LLOYD KO, TRAVASSOS LR, DIPPOLD WG, OETTGEN HF, OLD LJ. GD3, a proeminent ganglioside of human melanoma- detection and characterization by mouse monoclonal antibody. *J Exp Med* 1982; 155: 1133-47.
- RANUNCOLO SM, LADEDA V, GOROSTIDY S, MORANDI A, VARELA M, LASTIRI J, LORIA D, DEL AGUILA R, JOFFE EB, PALLOTTA G, PURICELLI L. Expression of CD44s and CD44 splice variants in human melanoma. *Oncol Report* 2002; 9: 51-6.
- REED JA, LOGANZO JRF, SHEA CR, WALKER GJ, FLORES JF, GLENDENING JM, BOGDANY JK, SHIEL MJ, HALUSKA FG, FOUNTAIN JW. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res* 1995; 55: 2713-18.
- REED JA, BALES E, XU W, OKAN NA, BANDYOPADHYAY D, MEDRANO EE. Cytoplasmatic localization of the oncogênica protein Ski in human cutaneous melanoma in vivo: functional implications for transforming growth factor beta signaling. *Cancer Res* 2001; 61:8074-8.
- REES JL. The genetics of sun sensitivity in humans. *Am J Hum Genet* 2004; 75 (5): 739-51.
- RETTNER MW, JOHNSON JC, PECKHAM DW, BANNINK JE, BANGUR CS, DRESSER K, CAI F, FOY TM, FANGER NA, FANGER GR, WODA B, ROCK KL. Characterization of a

- proapoptotic antiganglioside GM2 monoclonal antibody and evaluation of its therapeutic effect on melanoma and small cell lung carcinoma xenografts. *Cancer Res* 2005; 65: 6425-34.
- ROSENBERG SA. Immunotherapy of cancer by systemic administration of lymphoid cells plus interleukin-2 *J Biol Res Mod* 1984; 3 (5):501-11.
- ROSEMBERG SA, YANG JC, WHITE DE, STEINBERG SM. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cancer using high- dose bolus interleukin 2. *JAMA* 1994; 271: 907-13.
- ROSENBERG SA. Keynote address: perspectives on the use of interleukin-2 in cancer treatment. *Cancer J Sci Am* 1997; 3: S2- 6.
- ROSEMBERG SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 2001; 411: 380-384.
- RUITER DJ, BERGMAN W, WELVAART K, SCHEFFER E, VAN VLOTEN WA, RUSSO C, FERRONE S. Immunohistochemical analysis of malignant melanomas and nevocellular nevi with monoclonal antibodies to distinct monomorphic determinants of HLA antigens. *Cancer Res* 1984; 44: 3930-5.
- RUTKOWSKI P, NOWECKI ZI, ZURAWSKI Z, DZIEWIRSKI W, NASIEROWSKA-GUTTMEJER A, SWITAJ T, RUKA W. In transit/local recurrences in melanoma patients after sentinel node biopsy and therapeutic lymph node dissection. *Eur J Cancer* 2006; 42(2):159-64.
- SALAZAR-ONFRAY F, LOPEZ M, LUNDQVIST A, AGUIRRE A, ESCOBAR A, SERRANO A, KORENBLIT C, PETERSSON M, CHHAJLANI V, LARSSON O, KIESSLING R. Tissue distribution and differential expresión of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker. *Br J Cancer* 2002; 87: 414-22.
- SATYAMOORTHY K AND HERLYN M. Cellular and molecular biology of human melanoma. *Cancer Biol Ther* 2002; 1: 14.
- SAKIYAMA H, MATSUSHITA E, KUWABARA I, NOZUE M, TAKAHASHI T, TANIGUCHI M. Characterization of a melanoma antigen with a mouse-specific epitope recognized by a monoclonal antibody with antimetastatic ability. *Cancer Res* 1988; 48: 7173-78.
- SAUTER ER AND HERLYN M. Molecular biology of human melanoma development and progression. *Mol Carcinogenesis* 1998; 23: 132-43.
- SHIH I-M, ELDER DE, SPEICHER D, JOHNSON JP, HERLYN M. Isolation and functional characterization of the A32 melanoma-associated antigen. *Cancer Res* 1994; 54: 2514-20.
- SIKORA K. Monoclonal antibodies in oncology. *J Clin Pathol* 1982; 35: 369-75.
- SIMONETTI O, LUCARINI G, BRANCORSINI D, NITA P, BERNARDINI ML, BIAGINI G, OFFIDANI A. Immunohistochemical expresión of vascular endotelial growth factor,

- matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in cutaneous melanocytic lesions. *Cancer* 2002; 95: 1963-70.
- SLOMINSKI A, WORTSMAN J, CARLSON AJ, MATSUOKA LY, BALCH CM, MIHM MC. Malignant melanoma. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125 (10): 1295-306.
- SMALLEY KS M AND HERLYN M. The great escape: another way for melanoma to leave physiological control? *J Invest Dermatol* 2003; 121 (4): 802-12.
- SMOLLE J, SOYER HP, KERL H. Proliferative activity of cutaneous melanocytic tumors defined by Ki-67 monoclonal antibody. A quantitative immunohistochemical study. *Am J Dermatopathol* 1989; 11: 301-7.
- SOYER HP, SMOLLE J, SMOLLE-JUETTNER FM, KERL H. Proliferation antigens in cutaneous melanocytic tumors- an immunohistochemical study comparing the transferrin receptor and the Ki67 antigen. *Dermatologica* 1989; 179: 3-9.
- SPITZ M, SPITZ L, THORPE R, EUGUI E. Intrasplenic primary immunization for the production of monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 1984; 70:39-43.
- SRIVASTAVA PK. Immunotherapy of human cancer: lessons from mice. *Nat Immunol* 2000; 1 (5): 363-6.
- SRIVASTAVA PK. AND AMATO RJ. Heat shock proteins: the 'Swiss Army Knife' vaccines against cancers and infectious agents. *Vaccine* 2001; 19 (17-19): 2590-7.
- STAQUICINI FI, MOREIRA CR, NASCIMENTO FD, TERSARIOL IL, NADER HB, DIETRICH CP, LOPES JD. Enzyme and integrin: expression by high and low metastatic melanoma cell lines. *Melanoma Res* 2003; 13: 11-8.]
- STAQUICINI FI, ALIPERTI F, MARIANO M, LOPES JD. B-1 lymphocytes modulate malignancy of murine melanoma through a specific interaction mediated by MUC18. (*Trabalho Submetido*)
- SUNDRAM U, HARVELL J.D, ROUSE RV, NATKUNAM Y. Expression of the B-cell proliferation marker MUM1 by melanocytic lesions and comparison with S100, gp100 (HMB45), and melan-A. *Mod Pathol* 2003; 16: 802-10.
- TAKEUCHI T, HENG HH, YE CJ, LIANG SB, IWATA J, SONOBE H, OHTSUKI Y. Down-regulation of a novel actin-binding molecule, skeletrophin, in malignant melanoma. *Am J Pathol* 2003; 163: 1395-1404.
- TANG L, LI G, TRON VA, TROTTER MJ, HO VC. Expression of cell cycle regulators in human cutaneous malignant melanoma. *Melanoma Res* 1999; 9: 148-54.
- TANG A, ELLER MS, HARA M, YAAR M, HIROHASHI S, GILCHREST BA. E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes *in vitro*. *J Cell Sci* 1994; 107: 983-92.
- TANNER JE. Designing antibodies for oncology. *Cancer Metast Rev* 2005; 24 (4): 585-98.

- TARHINI A AND AGARWALA SS. Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease. *Dermatol Ther* 2006; 19: 19-25.
- TOUAB M, VILLENA J, BARRANCO C, ARUMI-URIA M, BASSOLS A. Versican is differentially expressed in human melanoma and may play a role in tumor development. *Am J Pathol* 2002; 160: 549-57.
- TREFZER U, RIETZ N, CHEN Y, AUDRING H, HERBERTH G, SIEGEL P, REINKE S, KONIGER P, WU S, MA J, LIU Y, WANG H, STERRY W, GUO Y. SM5-1: a new monoclonal antibody which is highly sensitive and specific for melanocytic lesions. *Arch Dermatol Res* 2000; 292 (12): 583-9.
- TREFZER U, CHEN Y, HERBERTH G, HOFMANN MA, KIECKER F, GUO Y, STERRY W. The monoclonal antibody SM5-1 recognizes a fibronectin variant which is widely expressed in melanoma. *BMC Cancer* 2006; 6: 1-12.
- TRIMPE KL. AND ZWILLING SB. Modulation of B16 melanoma antigen expression by lymphokines and dimethyl sulfoxide. *Cancer Res* 1986; 46 (10): 4953-9.
- TROTTER MJ, TANG L, TRON VA. Overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (WAF1/CIP1) in human cutaneous malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 1997; 24: 265-71.
- TRUCCO MM, STOCKER JW, CAEPELLINI R. Monoclonal antibodies against human lymphocyte antigens. *Nature* 1978; 273 (5664): 666-8.
- TSAO H, MIHM JR MC, SHEEHAN C. PTEN expression in normal skin, acquired melanocytic nevi, and cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49: 865-72.
- UEDA M, FUNASAKA Y, ICHIHASHI M, MISHIMA Y. Stable and strong expresión of Basic fibroblast growth factor in naevus cell contrasts with aberrant expresión in melanoma. *Br J Dermatol* 1994; 130: 320-4.
- VADHAN-RAJ S, CORDÓN-CARDO C, CARSWELL E, MINTZER D, DANTIS L, DUTEAU C, TEMPLETON MA, OETTGEN HF, OLD LJ, HOUGHTON AN. Phase I trial of a mouse monoclonal antibody against GD3 ganglioside in patients with melanoma induction of inflammatory response at tumor sites. *J Clin Oncol* 1988; 42: 1636-48.
- VAN DEN EYNDE B, PEETERS O, DE BACKER O, GAUGLER B, LUCAS S AND BOON T. A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med* 1995; 182 (3): 689-98.
- VAN DEN OORD JL, PAEMEN L, OPDENAKKER G, DE WOLF-PEETERS C. Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin. *Am J Pathol* 1997; 151: 665-70.
- VAN DEN OORD JJ, MAES A, STAS M, NUYTS J, BATTOCCHIO S, KASRAN A, GARMYN M, DE WEVER I, DE WOLF-PEETERS C. CD40 is a prognostic marker in primary cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol* 1996; 149: 1953-61.

- VAN DEN OORD JJ. Expression of CD26/dipeptidyl-peptidase IV in benign and malignant pigment-cell lesions of the skin. *Br J Dermatol* 1998; 138: 615-21.
- VAN KEMPER LC, VAN DEN OORD JJ, VAN MUIJEN GN, WEIDLE UH, BLOEMERS HP, SWART GW. Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin. *Am J Pathol* 2000; 156:769-74.
- VAN OSS CJ AND ABSALOM DR. Methods of immunoglobulin isolation and characterization. In: Molecular Immunology- A text book. Zonhar Atassi ed. New York, 1984, pa. 141-5.
- VIRADOR V, MATSUNAGA N, MATSUNAGA J, VALENCIA J, OLDHAM RJ, KAMEYAMA K, PECK GL, FERRANS VJ, VIEIRA WD, ABDEL-MALEK ZA, HEARING VJ. Production of melanocyte-specific antibodies to human melanosomal proteins: expression patterns in normal human skin and in cutaneous pigmented lesions. *Pigment Cell Res* 2001; 14: 289-97.
- XIE S, LUCA M, HUANG S, GUTMAN M, REICH R, JOHNSON JP, BAR-ELI M. Expression of a MCAM/MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 1997; 57: 2295- 2303.
- ZELGER B, HITTMAIR A, SCHIR M, OFNER C, OFNER D, FRITSCH PO, BOCKER W, JASANI B, SCHMID KW. Immunohistochemically demonstrated metallothionein expression in malignant melanoma. *Histopathology* 1993; 23: 257-63.
- ZHANG XD AND HERSEY P. Expression of catenins and p120cas in melanocytic nevi and cutaneous melanoma: deficient alphacatenin expression is associated with melanoma progression. *Pathology* 1999; 31: 239-46.
- ZIAI MR, IMBERTI L, NICOTRA MR, BADARACCO G, SEGATTO O, NATALI PG, FERRONE S. Analysis with monoclonal antibodies of the molecular weight melanoma associated antigen. *Cancer Res* 1987; 47: 2474-80.
- WAGNER S, HAFNER C, ALLWARDT D, JASINSKA J, FERRONE, ZIELINSKI CC, SCHEINER O, WIEDERMANN U, PEHAMBERGER H, BREITENEDER H. Vaccination with a human molecular weight melanoma- associated antigen mimotope induces a humoral response inhibiting melanoma cell growth in vitro. *J Immunol* 2005; 174: 976-82.
- WEWER UM, LIOTTA LA, JAYE M, RICCA GA, DROHAN WN, CLAYSMITH AP, RAO CN, WIRTH P, COLIGAN JE, ALBRECHTSEN R. Altered levels of laminin receptor mRNA in various human carcinoma cells that have different abilities to bind laminin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83 (19): 7137-41.
- WOENCKHAUS C, GIEBEL J, FAILING K, FENIC I, DITTBERNER T, POETSCH M. Expression of AP-2alpha, c-kit, and cleaved caspase-6 and 3 in naevi and malignant melanomas of the skin. A possible role for caspases in melanoma progression? *J Pathol* 2003; 201: 278-87.
- YOKOTA J. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* 2000; 21 (3): 497-503.

YOU L, HE B, UEMATSU K, MAZIERES J, FUJII N, MIKAMI I, REGUART N, MCINTOSH JK, KASHANI-SABET M, MCCORMICK F, JABLONS DM. An anti-Wnt-2 monoclonal antibody induces apoptosis in malignant melanoma cells and inhibits tumor growth. *Cancer Res* 2004; 64 (15): 5385-9.

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](#)