MARA DE SOUZA JUNQUEIRA

**Caracterização das vias de transformação maligna de
uma nova linhagem estabelecida de melanoma
murino**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de concentração: Oncologia
Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

São Paulo
2006

A Deus,

*“ Que nos deu o dom da vida,
nos presenteou com a liberdade,
nos abençoou com a inteligência,
nos deu a graça de lutarmos,
para a conquista de nossas realizações”...*

(Rui Barbosa)

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Eunice e Antonio,
por tudo que me ensinaram,
pelo exemplo de força e dedicação
e por todo amor*

AGRADECIMIENTOS

Em especial a minha mãe, meu pai, minha irmã e minha tia Creuza que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, pelo amor e carinho....AMO VOCÊS;

Ao meu orientador, Roger Chammas pela orientação, oportunidade de participar deste grupo, pela paciência e por ter confiado e acreditado em mim.....etc.....;

A Dra Maria Mitzi Brentani, pela oportunidade de trabalhar no LIM24;

A Sueli Nonogaki, Helio Corrêa, Maria Cecília Marcondes, Paulo Joazeiro, Dra Miriam Soto, Marlene Cotini, Anamaria Camargo e Elia Caldini, pela colaboração na realização deste trabalho;

A Ivanete, Cristina, Jair e Willame pela constante disposição em ajudar;

Ao meu novo amiguinho do Lab. Guilherme, pelas conversas, risadas e a companhia no laboratório nos finais de semana;

A Rosimeire Roela, pela amizade, paciência e incentivo;

A Simone Maistro, pela amizade e disposição em me ajudar sempre – OBRIGADA...;

A Flávia Mangone, pela grande ajuda na formatação deste trabalho e amizade.....OBRIGADA;

Aos meus colegas do grupo de adesão: Andréia, Luciana, Patricia, Mônica e Verônica;

A minha amiga Glaice, que sempre me apoio, me aconselhou e acima de tudo pela sua amizade;

A Ana Paula, pelas conversas, risadas, baladas e amizade. Sinto Saudades!!!!!!

A Maria José (Marypop), pelo carinho, amizade e toda ajuda.....e um pouquinho mais....OBRIGADA;

A Fabiana Melo, pelo apoio nos momentos difíceis, por toda ajuda e pela sincera amizade.....OBRIGADA.....você irá fazer muita falta no Lab.....;

Aos meus colegas do Laboratório de Oncologia Experimental, Cíntia Milani, Ticiane Benvenuti, Rosângela Portilho, Suzana Honda, Renata Sobral, Terezinha Morato Almeida, Lílian Barbeta, Patrícia Rozenchan, Shigueko Troyano, Maria Lúcia Katayama, Cristina Meireles, Fátima Pasini, Karen Brunialti, Paula Cravaenzola, Iran e Simone Costa, que de uma forma ou de outra, participaram na realização deste trabalho;

A Capes – Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	vi
SUMÁRIO	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xv
SUMMARY	xviii
1 – INTRODUÇÃO	1
CULTURA DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DE CAMUNDONGOS	4
RETROVÍRUS E TRANSFORMAÇÃO CELULAR	6
MELANOMA	11
GENES ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DO MELANOMA	14
METILAÇÃO DO DNA E CÂNCER	18
2 – OBJETIVO GERAL	22
3 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 ANIMAIS	24
4.1.1 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS EMBRIONÁRIAS	24
4.1.2 CULTURA DE CÉLULAS	25
4.2 CLONAGEM	26
4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	27
4.4 TUMORIGENICIDADE <i>IN VIVO</i>	28
4.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA	29
4.6 MÉTODO CITO-/HISTOQUÍMICO DE FONTANA MASSON	31
4.7 CITOMETRIA DE FLUXO	32
4.8 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	32
4.8.1 TRATAMENTO DO RNA TOTAL COM <i>Dnase</i>	34
4.8.2 TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)	35
4.8.3 REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE – PCR	35

4.9 NORTHERN BLOT	36
4.9.1 ELETROFORESE E TRANSFERÊNCIA DO RNA TOTAL PARA MEMBRANA DE NYLON	36
4.9.2 OBTENÇÃO DA SONTA	38
4.9.3 SÍNTESE DA SONTA	39
4.9.4 HIBRIDIZAÇÃO DA MEMBRANA	40
4.10 EXTRAÇÃO DE DNA	41
4.10.1 PCR PARA SEQUENCIAMENTO	41
4.10.2 SEQUENCIAMENTO	42
4.11 TRATAMENTO DE Mgal3 COM INIBIDOR DE METILAÇÃO DO DNA 5'-Aza-2'-DEOXCITIDINA	43
4.12 EXTRATOS PROTÉICOS	44
4.12.1 DOSAGEM PROTÉICA	44
4.12.2 WESTERN BLOTTING	45
5 – RESULTADOS	48
5.1 APARECIMENTO DE FOCO DE TRANSFORMAÇÃO EM CULTIVO DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS E ESTABELECIMENTO DA LINHAGEM Mgal3	48
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM Mgal3	49
5.2.1 PRODUÇÃO DE PIGMENTO	49
5.2.2 ORIGEM MELANOCÍTICA DE Mgal3	51
5.2.3 A PRESENÇA DE PARTÍCULAS VIRAIS NA LINHAGEM mgal3	54
5.2.4 Mgal3 É TUMORIGÊNICA E METASTÁTICA	57
5.2.5 ANÁLISE DOS GENES <i>TP53</i> E <i>CDKN2a</i>	59
6 – DISCUSSÃO	65
7 – CONCLUSÕES	75
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXO I	
APÊNDICE	

LISTA DE ABREVIATURAS

APS	Persulfato de sódio
BSA	Albumina bovina do soro
CDK	Quinase dependente de ciclina
cDNA	DNA complementar
cpm	Contagens por minutos
ctl	Controle
DAB	3,3-tetrahidrocloro diaminobenzidina
Denhardt's	Ficoll 400 0,05g/mL; polivinilpirolidona 0,05g/mL; albumina bovina do soro 0,05g/mL
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	"Dulbecco's Modified Eagle Medium"
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Dnase	Desoxirribonuclease
dNTP's	Desoxirribonucléotídeos
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
FITC	Isocianato de fluoresceína
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
MAA	Antígeno associado a melanoma
MAPK	Proteína quinase ativada por mitôgeno
MeIARV	Retrovírus associado a melanoma
MOPS	Ácido 3-N-morfolino propanesulfônico
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto
POPOP	1,4-bis [2-(5-feniloxazolil)] benzeno
PPO	2,5-difeniloxazol
PVDF	<i>Hydrophobic Polyvinylidene difluoride</i>
RNA	Ácido riboxinucléico
Rnase	Ribonuclease

Rnasin	Inibidor de RNA
Rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio de cultura do Roswell Park Memorial Institute
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SSC	NaCl 3M; Citrato de sódio 0,3M pH7,0
SSPE	NaCl 0,75M; NaH ₂ PO ₄ 0,05M; EDTA 4mM pH 7,4
TBE	Tampão tris-ácido bórico- EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetrametiletenodiamina
UV	Luz ultravioleta

RESUMO

Junqueira, MS. Caracterização das vias de transformação maligna de uma nova linhagem estabelecida de melanoma murino. São Paulo [Dissertação]. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 130p

Ao longo dos processos de immortalização e transformação maligna, as células adquirem inúmeras alterações genéticas, que são causadas por fatores endógenos e exógenos como agentes biológicos e a geração de espécies reativas de oxigênio. Neste trabalho, uma linhagem celular “espontaneamente” transformada foi clonada a partir de explantes de embriões de camundongos C57bl/6. Esta linhagem mostrou-se produtora de pigmento escuro; a análise citoquímica e ultraestrutural permitiu caracterizar a linhagem como tendo origem melanocítica. A linhagem, denominada Mgal3, mostrou-se tumorigênica quando implantada no tecido subcutâneo de animais singenéticos, apresentando capacidade de disseminação linfática, dando origem a metástases em linfonodos, o que permitiu caracterizá-la como uma linhagem de melanoma murino. O processo de transformação deste melanoma caracterizou-se pela expressão de genes retrovirais endógenos, com expressão do antígeno associado a melanoma (MAA), reconhecido pelo anticorpo monoclonal MM2-9B6; ausência de mutações nos exons 5 a 8 do gene supressor de tumor *TP53*; e, silenciamento do gene *CDKN2a*, que codifica duas proteínas que atuam em redes de supressão de tumores, p16^{INK4a} e p19^{ARF}. A perda de expressão de pelo menos um destes produtos gênicos parece associada a mecanismos epigenéticos, uma vez que o tratamento de Mgal3 com o inibidor de DNA metiltransferase 5'-Aza-2'-deoxicitidina, restaurou a transcrição de pelo menos um dos transcritos do gene *CDKN2a*. Da mesma forma, observamos que o gene *LGALS3*, que codifica a lectina animal galectina-3 também é silenciado nesta linhagem,

mostrando que esta molécula não está associada à manutenção desta célula transformada em condições de cultivo.

Descritores: 1. Camundongos Endogâmicos C57BL 2. Melanoma 3. Retrovírus Endógenos 4. Proteína P16 5. Proteína P14ARF

SUMMARY

Junqueira, MS. Establishment and characterization of the malignant transformation pathways of a novel murine melanoma cell line. São Paulo [Dissertation]. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 130p

A novel murine melanoma cell line named Mgal3 was generated from embryo explants. This cell line gave rise to metastatic tumors when injected subcutaneously in C57bl/6 mice. Tumor histogenesis was determined at the cytochemical (Fontana Masson staining), immunohistochemical (staining with anti-HMB45 and anti-S100) and ultrastructural levels. Mgal3 produces high amounts of retroviral C particles and was recognized by the mAb MM2-9B6, which reacts with a melanoma associated antigen derived from the envelope of the ecotropic retrovirus MelArv. No mutations were found in *TP53* exons 5-8, however loss of *CDKN2a* expression was observed. Treatment of Mgal3 with the demethylating agent azadeoxycytidine indicated that at least one of the genes encoded at the *CDKN2a* locus was silenced by promoter hypermethylation. Furthermore, this cell line did not express the animal lectin, galectin-3. The galectin-3 gene promoter seemed to be hypermethylated, since treatment of Mgal3 with azadeoxycytidine led to the de novo expression of the lectin.

Descriptors: 1. Inbred C57BL mice 2. Melanoma 3. Endogenous Retroviruses 4. Protein p16 5. p14ARF protein

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença genética, caracterizada pelo acúmulo de mutações, que conferem às células vantagens seletivas quanto à proliferação e sua manutenção em tecidos do hospedeiro. Para a geração de um câncer, a célula passa por uma série de alterações, um longo processo composto por múltiplas fases, operacionalmente denominado de transformação maligna. Estudos de carcinogênese permitiram a divisão deste processo em pelo menos três etapas distintas: iniciação, promoção e progressão tumoral. Durante a iniciação e promoção, ocorrem as primeiras alterações genéticas, que levam uma célula normal à imortalização e à subversão dos elementos controladores do ciclo celular. Acúmulo de mutações em células imortalizadas são acompanhadas pela aquisição de características invasivas e capacidade de colonização tecidual à distância (gerando as metástases). Hanahan e Weinberg sistematizaram as principais características das células cancerosas, agrupando-as em seis categorias funcionalmente distintas, como descrito a seguir. Diferentes vias moleculares contribuem para aquisição de cada uma das características enumeradas, não havendo necessariamente uma ordem para sua aquisição quando se estudam os diferentes tipos de câncer: (1) auto-suficiência a fatores de crescimento; (2) insensibilidade a fatores inibitórios de proliferação; (3) evasão da apoptose; (4) potencial replicativo infinito; (5) angiogênese e (6) invasão tecidual e metástase (figura 1) ¹. É ao longo da progressão tumoral, que as células tumorais, freqüentemente de origem monoclonal, passam a apresentar variabilidade genotípica, o que leva à heterogeneidade da massa

tumoral (variabilidade fenotípica), adquirindo um comportamento mais agressivo, muitas vezes, invadindo tecidos adjacentes e formando metástases à distância ².

Figura 1. Mecanismos que levam à transformação maligna. Todos os tipos de câncer devem adquirir as mesmas seis capacidades como mostrado em **(A)** que irão acontecer mecanística e cronologicamente diferente **(B)**. A ordem em que estas características são adquiridas parece variar entre os diferentes tipos e subtipos de câncer. Traduzido de Douglas Hanahan et al. Cell. 100:57-70 (2000)

As alterações acumuladas nas células tumorais são essencialmente de duas classes: (1) alterações físicas do DNA, que incluem mutações pontuais e uma variedade de alterações cromossômicas (deleções, inversões, duplicações, amplificações e translocações); e, (2) alterações epigenéticas, relacionadas a modificações que interferem com o controle transcricional de diversos genes ^{3,4}. A fixação destas alterações na população de células tumorais está associada a vantagens seletivas de células alteradas sobre a população de células de um tecido. Assim, freqüentemente se refere ao câncer como um processo microevolutivo, no qual há ativação de genes que contribuem para o desenvolvimento do tumor (oncogenes) e inativação de genes que suprimem o aparecimento de tumores (genes supressores de tumor). Esta simplificação tem sido útil para a criação e teste de modelos celulares e animais de tumorigênese.

Vários fatores endógenos e exógenos contribuem para a carcinogênese. Agentes biológicos, como vírus; físicos, como radiação ionizante e ultra-violeta; e, químicos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e espécies reativas de oxigênio podem atuar causando lesões diretamente no DNA, levando ao processo de iniciação ^{5,6}. A persistente exposição das células iniciadas a hormônios ou citocinas, presentes por exemplo em um microambiente pró-inflamatório, pode levar à promoção, levando ao estabelecimento de tumores ⁴.

A identificação inicial de genes associados ao desenvolvimento de tumores só foi possível com o advento de duas abordagens técnicas: (1) estabelecimento de culturas de células embrionárias de camundongos; (2)

transformação destas células com material genético vindo de tumores humanos, num primeiro momento; seguido de transfecção de genes candidatos a oncogenes ou genes supressores de tumor ⁷. Destes estudos, foi possível identificar mais de uma centena de genes potencialmente envolvidos diretamente no processo de tumorigênese. Mais recentemente, com a possibilidade de geração de animais geneticamente modificados, a participação de genes candidatos no desenvolvimento de tumores tem sido recapitulada em diversos ensaios, incluindo aqueles que exploram o cultivo de células embrionárias.

CULTURA DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DE CAMUNDONGOS

O desenvolvimento de meios de crescimento seletivos, e a identificação de fatores de crescimento específicos para uma variedade de tipos celulares, têm possibilitado a propagação e diferenciação de células *ex vivo*. A maior parte dos tecidos podem ser submetidos a culturas primárias, e eventualmente subcultivados. Nestas condições, as células de animais geralmente apresentam um tempo de cultivo finito e restrito a pouco mais de uma dezena de divisões celulares. Células embrionárias podem ser mantidas por períodos mais prolongados em ativa divisão celular. Estudos sistemáticos usando células de camundongos permitiram estabelecer protocolos para imortalização de células derivadas de embriões ⁸. Nestes estudos, demonstrou-se que as células embrionárias apresentam uma progressiva desaceleração na sua taxa proliferativa, o que caracterizou um

processo chamado de senescência replicativa ⁹. Eventualmente, seguida esta fase de senescência, dependendo do tipo celular e do regime de cultura adotado, algumas das células presentes nesta população de células senescentes passam a proliferar. As células que ultrapassam esta crise replicativa freqüentemente podem ser mantidas em cultura por um número superior a 50-100 passagens consecutivas, o que operacionalmente foi definido como imortalização ¹⁰

O fenômeno de imortalização celular, definido há quatro décadas, é freqüente em células de camundongo e mais raro em células humanas. Nos protocolos utilizados, a pressão de imortalização se resume ao protocolo de repiques e manutenção da densidade celular inicial. Não há nenhum agente mutagênico conhecido sendo utilizado nestes protocolos; assim, trata-se de um processo de imortalização “espontânea” ⁸. As células imortalizadas, como por exemplo, os fibroblastos 3T3, não são tumorigênicas quando implantadas em animais singenéticos ou animais imunodeficientes. Esta noção experimental foi útil para a definição de genes causadores de tumores. Protocolos de transfecção ou transformação celular foram então desenvolvidos para estudos de complementação genética. Nestes estudos o material genético inicialmente utilizado foi o DNA de tumores humanos; o fenótipo de complementação foi a geração de tumores em camundongos atímicos ¹¹. Com esta abordagem, foi possível caracterizar a existência de vários oncogenes ^{12,13}, responsáveis pela transformação maligna completa de células imortalizadas.

Operacionalmente, os genes transformantes freqüentemente estão associados ao desenvolvimento de uma segunda capacidade das células imortalizadas: o crescimento independente de ancoragem. Esta capacidade é definida como o crescimento em agar mole (*soft agar*), situação experimental onde as células, privadas de uma superfície aderente, crescem em focos, empilhando-se umas sobre as outras. Estes focos são chamados focos de transformação. Esta capacidade guarda uma boa correlação com a capacidade de crescimento na forma de tumores em animais imunodeficientes.

Uma questão que ainda não apresenta uma resposta clara é o porquê da relativa facilidade de se imortalizar células de camundongo embrionárias. O fato de se ter encontrado um número expressivo de cópias de retrovírus endógenos defectivos inseridos nos genomas de eucariotos superiores, como roedores e humanos, tem sido levantado como hipótese para este achado. Retrovírus são freqüentemente silenciados por metilação em células normais; mecanismos epigenéticos estariam associados à variação no perfil de metilação da cromatina, levando à ativação transcricional de genes retrovirais e repressão de genes supressores de tumor ¹⁴. Esta hipótese poderia justificar a imortalização de células embrionárias na ausência de óbvios agentes transformantes ou genotóxicos.

RETROVÍRUS E TRANSFORMAÇÃO CELULAR

Os retrovírus são vírus de RNA e possuem em seu genoma três genes básicos que são expressos e processados: *gag* – codifica proteínas

da cápsula interna, *prt/pol* – o primeiro codifica as proteases e o segundo codifica uma polimerase e integrase e *env* – codifica as proteínas do envelope viral ¹⁵. Ainda os retrovírus possuem dois elementos idênticos localizados no final da região 5' e 3' – LTRs (*Long Terminal Repeats*) (figura 2). Estas regiões contêm um promotor, um *enhancer*, seqüências repressoras para expressão tecido-específica e sinais de poliadenilação.

Figura 2. Estrutura do genoma de retrovírus. (a) retrovírus infecciosos possuem em seu genoma três genes básicos: *gag* – codifica proteínas da cápsula interna; *pol* – codifica a enzima transcriptase reversa e a integrase e *env* – codifica as proteínas do envelope viral. A expressão da proteína viral é controlada pelos promotores, *enhancer* e sinais de poliadenilação localizados nos LTRs (*Long Terminal Repeats*), que são gerados durante a transcrição reversa. Outros elementos regulatórios presentes no genoma viral, incluem: sítio doador de *splice* (SD), sítio receptor de *splice* (SA para expressão de *env*) e um sítio de ligação *primer* para uma molécula de RNA_t específica usada para iniciar a transcrição reversa. (b) retrovírus endógenos, que possuem uma estrutura similar dos retrovírus infecciosos, mas tipicamente apresentam mutação pontual (bandas em preto), *frameshifts* e deleções (particularmente no gene *env*). Frequentemente, a porção central é perdida por recombinação homologa, formando os LTRs solitários. Traduzido de David J Griffiths. *Genome Biology*. 2(6): 1017.1-1017.5 (2001)

Normalmente, os retrovírus infectam células somáticas e conseqüentemente genes retrovirais integrados no DNA genômico não são passados para a progênie, sendo referidos como retrovírus exógenos. Já os retrovírus endógenos infectam células da linhagem germinativa e são transmitidos de uma geração para a outra. A maioria dos retrovírus endógenos não possui capacidade replicativa, resultado do acúmulo de deleções e mutações ¹⁶. Os retrovírus podem ser classificados como simples ou complexos. O genoma de alguns tipos de retrovírus simples, além de conter os genes comuns para todos o retrovírus, também carregam um gene extra: um oncogene ou superantígeno do vírus MMTV (*murine mammary tumour virus*). O genoma do retrovírus complexo contém genes regulatórios como por exemplo, *tax* e *rex* do HTLV (vírus da leucemia de células T), *tat* e *ver* do HIV (vírus da imunodeficiência humana) e *bel* e *bet* de *Spumavirus* ¹⁷. Existem três vias distintas que levam a transformação maligna de uma célula por retrovírus: (1) integração do provírus adjacente a um oncogene celular levando a sua ativação pelas seqüências regulatórias do LTR; (2) incorporação de um oncogene dentro do genoma do retrovírus e (3) transativação de oncogene onde a proteína *tax* atua no sentido trans tanto para ativar o LTR viral, como também genes celulares incluindo os proto-oncogenes (figura 3) ¹⁷.

Figura 3. Mecanismos da transformação pelos retrovírus. A – ativação insercional do oncogene; B – transcrição do oncogene e C – trans-ativação do oncogene. Traduzido de Robin A. Weiss. *Current Science*. 81:528-534 (2001)

Retrovírus foram inicialmente identificados como agentes causadores de tumores em animais. Hoje, sabe-se que 8% do genoma humano contém seqüências retrovirais endógenas, representando um depósito de genes retrovirais potencialmente patogênicos ¹⁸. Este contingente ainda é pouco explorado, podendo aumentar ainda mais a crescente importância que vírus têm na etiopatogenia de cânceres humanos. Sabe-se hoje que cerca de 15 a 20% dos cânceres incidentes estão associados a infecções virais, como por exemplo aquelas causadas pelos vírus da hepatite B e C que estão envolvidos no carcinoma hepatocelular; tipos específicos de HPV (Papilomavírus humano) que são responsáveis pelo câncer de colo de útero e tumores de orofaringe; Epstein-Barr que é responsável pelos linfoma de Burkitt e linfomas B e o HTLV-1 (vírus da leucemia de células T) que é responsável pela leucemia e linfoma de células T ⁶.

Além disso, dados da literatura também mostram a presença de retrovírus endógenos no genoma de camundongos. Estes possuem papel importante na transformação maligna de células de camundongos ¹⁹. A presença de seqüências retrovirais foi descrita em várias linhagens de melanoma. Entre eles está o retrovírus associado a melanoma (MelArv) encontrado em células de melanoma originados de camundongos C57bl/6, mas não encontrado em células normais. MelArv provavelmente surge durante a transformação maligna ou a progressão tumoral dos melanomas murinos como resultado da recombinação entre o retrovírus com replicação incompetente *Emv-2* e um segundo vírus endógeno MuLV (vírus da leucemia murina). O gene *env* de MelArv codifica um antígeno encontrado em várias linhagens de melanoma como B16, JB/RH e JB/MS (todos originários de animais C57bl/6) chamado antígeno associado a melanoma (MAA) que é reconhecido pelo anticorpo MM2-9B6 ²⁰. Foi demonstrado que este anticorpo tem a capacidade inibir a formação de metástases no fígado e pulmão de animais que tinham melanomas ²¹.

Também foi observado que MelArv de células B16 são capazes de infectar culturas de melanócitos de animais C57bl/6, e em alguns casos induzir a transformação maligna dessas células ²². Nesses melanócitos transformados, MelArv estava inserido no proto-oncogene *c-maf*, sugerindo que este retrovírus leve a transformação maligna dessas células por mutagênese insercional e conseqüentemente levando a ativação desse proto-oncogene. Recentemente foi demonstrado que expressão da proteína *env* é importante para o escape das células tumorais do sistema imune

mediado por células T regulatórias. Vários estudos têm mostrado a expressão de genes retrovirais em alguns tumores humanos, incluindo o melanoma. Thomas Muster e colaboradores mostraram a presença de genes retrovirais e a produção de partículas em células de melanoma humano. Ainda, os autores sugerem que a expressão e produção de partículas retrovirais são ativadas durante o desenvolvimento do melanoma²³. Este fenômeno não é só uma característica de células cultivadas *ex vivo*, mas tem implicações quanto à montagem de uma resposta imune específica²³⁻²⁵.

MELANOMA

Neste trabalho, fomos conduzidos à caracterização de uma linhagem com fenótipo de tumor de origem melanocítica, assim passaremos a resumir as principais características deste tipo de tumor. Melanomas são tumores originados de células produtoras de pigmento – melanócitos, localizados principalmente na camada basal da epiderme humana. Sua incidência vem continuamente aumentando nos últimos 40 anos, atingindo um incremento de até quinze vezes em sua incidência. Este incremento só é menor do que aquele verificado em relação as taxas de incidência de câncer de pulmão em mulheres²⁶.

Observações clínicas e histopatológicas do melanoma cutâneo levaram à proposição de um modelo que incluem 5 passos na sua progressão tumoral²⁷. O nevo comum representa a lesão melanocítica

hiperplástica mais inicial, sendo considerado um indicador de risco para o desenvolvimento do melanoma. O nevo displástico, mostra aumento do nível de atipia citológica e arquitetural, sendo um precursor do melanoma cutâneo em grupos geneticamente definidos de indivíduos. O melanoma de crescimento radial (*radial growth phase*, RGP) é o primeiro estágio maligno reconhecido, onde as células tumorais estão tanto confinadas na epiderme bem como com capacidade de invadir localmente, sem mostrarem capacidade de crescimento rápido ou de formar metástases. Na fase de crescimento vertical (*vertical growth phase*, VGP), as células do melanoma se infiltram e proliferam na derme e no tecido subcutâneo, com risco da disseminação. E finalmente, as células adquirem a capacidade de formar metástases, o que representa o último estágio da progressão tumoral (figura 4)²⁸.

O desenvolvimento do melanoma está associado a fatores ambientais como exposição intermitente, porém excessiva da pele à radiação ultravioleta (UV), em especial à radiação UV-B, acometendo na extensa maioria das vezes indivíduos caucasóides com pele de fototipo I, mais sensíveis às queimaduras solares. As lesões causadas pela radiação levam a alterações genéticas²⁹ que ativam vias específicas de controle da homeostasia celular. A seguir, serão apresentadas as principais vias moleculares associadas ao desenvolvimento e manutenção de melanomas, a partir de observações feitas em células humanas e de camundongo.

Figura 4. Desenvolvimento do melanoma. Melanócitos são células produtoras do pigmento melanina que durante o desenvolvimento migram da crista neural para a pele e estão normalmente confinados na camada basal da epiderme. Cada melanócito transfere os seus melanossomos através de processos dendríticos para aproximadamente 36 queratinócitos, formando a unidade de pigmentação. Os melanomas são histologicamente classificados de acordo com a sua localização e estágio de progressão em 5 diferentes estágios: (1) nevos sem alterações displásticas; (2) nevos displástico com atipia estrutural e arquitetural; (3) melanoma de crescimento radial (RGP); (4) melanoma de crescimento vertical (VGP) e (5) melanoma metastático. Tanto o nevos benigno quanto o displástico são caracterizados pela interrupção da unidade de pigmentação, levando ao aumento do número de melanócitos em relação aos queratinócitos. Essas lesões precursoras progredem para o melanoma in situ, o qual cresce lateralmente e permanece confinado a epiderme, sendo definido como o melanoma RGP. Diferentemente, o melanoma VGP, invade as camadas acima e abaixo da epiderme e penetra pela derme e pelo tecido subcutâneo através da membrana basal, formando nódulos de células malignas. Traduzido de Lynda Chin. *Nature Cancer Reviews*. 3:559-570 (2003)

GENES ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DO MELANOMA

Estudos de genética molecular têm identificado vários genes alterados durante a progressão tumoral do melanoma ³⁰. Entre estes genes, temos o locus CDKN2a localizado no cromossomo 9p21. CDKN2a codifica duas proteínas supressoras de tumor p16^{INK4a} e p19^{ARF} (p14^{ARF} em humanos), originários de uma fase alternativa de leitura (figura 5).

A função de p16^{INK4a} é inibir a atividade do complexo ciclina D com CDK4/6 (quinase dependente de ciclina), impedindo a fosforilação da proteína Rb. Rb hipofosforilado mantém-se associado ao fator de transcrição E2F, levando a inativação deste fator. A progressiva fosforilação de Rb, libera o fator de transcrição E2F, o qual irá ativar genes essenciais para a transição entre as fases G1 e S do ciclo celular e o início da replicação do DNA ^{31,32}.

A proteína p19^{ARF} por outro lado, estabiliza a proteína p53, prevenindo sua degradação mediada por Mdm2 (HDM2 em humanos). Mdm2 age como uma ubiquitina ligase responsável pela degradação proteolítica da proteína p53 via proteasoma ^{31,33}.

A perda da expressão de p16^{INK4a} é um evento comum observado em melanomas e outros tipos de tumores ^{32,34,35}. Vários mecanismos que levam a inativação de CDKN2a têm sido caracterizados. Mutações de ponto, deleções homo- e heterozigóticas e metilação do protomor são freqüentemente detectados em melanomas esporádicos e familiares ^{32,36,37}. Alterações que afetam a atividade de alguns dos componentes da via

INK4a/CDK4/ciclina D/pRb, podem determinar a perda do controle do ciclo celular, dando a estas células a independência proliferativa necessária para a progressão tumoral.

Figura 5. Estrutura e mecanismo de ação dos genes supressores de tumor p16^{INK4a} e p14^{ARF}. O locus CDKN2a localizado no cromossomo 9p21 é composto de 4 exons (E) - 1α; 1β; 2 e 3 – codifica dois supressores de tumor, p16^{INK4a} e p14^{ARF} (p19^{ARF} em camundongos), via fase de leitura alternativo. p16^{INK4a} é traduzido de um produto de splice do E1α, E2 e E3, enquanto p14^{ARF} é traduzido de um produto de splice E1β, E2 e E3. Normalmente p16^{INK4a} sequestra CDK4/6 assim mantendo pRb em um estado hipofosforilado. Na ausência de p16^{INK4a}, CDK4/6 se liga a ciclina D e fosforila Rb. A fosforilação da pRb libera o fator de transcrição E2F, promovendo a transição da fase G1 para S do ciclo celular. p14^{ARF}, por outro lado, sequestra HDM2 uma ubiquitina ligase específica de p53. Na ausência de p14^{ARF}, HDM2 marca p53 por ubiquitinação (UUU) e subsequente degradação proteossomal. A perda de p53 prejudica o mecanismo que normalmente marca as células danificadas geneticamente para parada do ciclo celular e/ou apoptose, levando a proliferação das células danificadas. Perda de CDKN2a, portanto, contribui para tumorigênese pela interrupção de ambas as vias de pRb e p53. Traduzido de Yahov Chvolnovsky. et al. The Journal of Clinical Investigation. 115:813-824 (2005)

Em melanomas também ocorre a ativação da via de sinalização Ras-Raf-MAPK quinase-ERK (RAF-MEK-ERK) e PI3K-Akt (figura 6).

Figura 6. Esquema das vias efectoras de Ras – Raf-MEK-ERK e PI3K-Akt e mutações frequentemente encontrada em pacientes com melanoma. Mutações em *NRAS* são encontradas em aproximadamente 10-20% dos melanomas e ativa ambas as vias efectoras. A via Raf-MEK-ERK pode ser ativada via mutação do gene *BRAF*, encontrado em aproximadamente 50% dos melanomas. Em um subgrupo de melanoma, a ERK quinase é demonstrada por estar constitutivamente ativa na ausência de mutações em *NRAS* e *BRAF*. A via PI3K-Akt pode ser ativada através da perda ou mutação do gene supressor de tumor *PTEN*, ocorrendo em 30-50% dos melanomas ou através da amplificação da isoforma do gene *Akt3*. Enquanto a frequência de amplificação do gene *Akt3* não é conhecida, a *Akt3* quinase é constitutivamente ativa em aproximadamente 60% dos melanomas. Ativação de ERK e/ou *Akt3* promove o desenvolvimento do melanoma por vários mecanismos, incluindo estímulo da proliferação celular e aumento da resistência a apoptose. Traduzido de Yakov Chudnovshy. et al. The Journal of Clinical Investigation 115:813-824 (2005).

Mutações somáticas nos genes da família *RAS*, em particular *NRAS*, são detectados em cerca de 10-37% dos melanomas esporádicos e acima de 95% em melanomas hereditários que apresentam mutações germinativas em *CDKN2a* ³⁰. O oncogene *Ras* pode ativar tanto a via de *Raf* como a de *PI3K*. A importância de ambas as vias no desenvolvimento do melanoma foi confirmado pela identificação de alterações genéticas que ativam cada via independentemente ^{26,38}.

O envolvimento da via *PI3K-Akt* na progressão do melanoma, dá-se frequentemente pela perda de expressão da fosfatase *PTEN* em lesões melanocíticas. A função de *PTEN* é inibir a ativação de *Akt* pela *PI3K*. A inativação do gene *PTEN* ocorre em 30-50% dos melanomas. A ativação constitutiva de *Akt* foi demonstrada em mais de 60% dos melanomas com uma alta frequência de ativação em estágios tardio do melanoma. *Stahl* e colaboradores ³⁹ identificaram amplificação do gene *Akt3* como um mecanismo adicional, independente da perda de *PTEN*, podendo ser responsável pela alta frequência da ativação de *Akt*. Recentemente, vários trabalhos têm mostrado mutações somáticas no gene *BRAF* em 67% dos melanomas ^{26,37,40}. Mutações mais frequentes foram identificadas dentro do domínio quinase. Entre elas, a substituição de um resíduo de valina por ácido glutâmico no códon 599 (V599E) no éxon 15, levando a ativação constitutiva desta proteína e conseqüentemente a um aumento da ativação de *ERK1/2*. É interessante notar que mutações em *BRAF* ocorrem em nevos comuns e displásticos, com frequências tão ou mais altas como nos melanomas metastáticos ³⁷.

Mutações no gene *BRAF* podem ocorrer ao mesmo tempo com a perda ou mutação de PTEN, mas não com *NRAS*. Inversamente, tumores que apresentam mutações em *NRAS*, tipicamente mantém *BRAF* e PTEN sem alterações³⁷. Estes dados mostram a importância de ambas as vias de sinalização PI3K-Akt e Raf-MEK-ERK no desenvolvimento do melanoma.

METILAÇÃO DO DNA E CÂNCER

Metilação do DNA é a principal modificação epigenética no genoma de mamíferos. Esta modificação ocorre predominantemente nos resíduos de citosinas localizados na posição 5' do dinucleotídeo CpG⁴¹⁻⁴³.

A maioria das ilhas CpG são encontradas em regiões próximas de promotores de quase todos os genes do genoma de mamíferos e geralmente não são metilados em células normais. No câncer, a hipermetilação de regiões do promotor está mais frequentemente associada com o silenciamento transcricional de genes, por exemplo, genes supressores de tumor⁴³

A metilação dos resíduos de citosina ocorre após a síntese de DNA pela transferência enzimática de um grupamento metil (-CH₃) ao carbono 5 da base nitrogenada. Esta reação é realizada pelas enzimas metiltransferases de DNA (DNMTs). DNMT1 é a principal enzima responsável por manter o padrão de metilação, enquanto DNMT3A e DNMT3B são responsáveis pela metilação *de novo*^{44,45}. Alterações nestas

enzimas são observadas em tumores humanos. A metilação do DNA não interfere apenas na ligação de fatores de transcrição a regiões específicas do DNA, mas também pode recrutar proteínas que se ligam ao DNA metilado ⁴⁶. Já foram identificadas cinco proteínas que se ligam ao DNA metilado: MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3, MBD4. Essas proteínas recrutam outras proteínas que atuam como repressores transcricionais, incluindo Sin3A e histono-deacetilases ^{47,48}.

Outro mecanismo associado ao silenciamento de genes envolve proteínas importantes na compactação do DNA, as histonas. As histonas são proteínas nucleares que possuem uma dinâmica de associação ao DNA, de acordo como os grupamentos que se ligam a elas. Quando ocorre a acetilação de histonas, ocorre uma diminuição da afinidade dessas proteínas pelo DNA, gerando uma redução na compactação da cromatina o que possibilita a transcrição gênica. Por outro lado, a desacetilação de histonas torna a estrutura da cromatina mais compacta, dificultando o acesso de fatores de transcrição a seus sítios de ligação no DNA e conseqüentemente diminuindo ou bloqueando a transcrição de alguns genes. As enzimas que participam do processo de acetilação e desacetilação das histonas são denominadas histono-acetiltransferases (HATs) e histono-deacetilases (HDAC) ⁴³.

O fenômeno de hipermetilação não é porém um fenômeno global no genoma da célula cancerosa. Ao contrário, é freqüente observar-se hipometilação em extensas regiões do genoma da célula cancerosa. Tem sido proposto que a hipometilação também contribui para o desenvolvimento

de tumores por atuar diretamente com a ativação de oncogenes e elementos retrotransposons (LINES – *long interspersed transposable elements* e SINES – *short interspersed transposable elements*) e/ou instabilidade cromossomal. A hipometilação, por exemplo, é responsável pela ativação dos genes da família MAGE (antígeno associado ao melanoma) e retrotransposons. Estes genes são específicos da linhagem germinativa e os promotores destes genes normalmente são metilados e silenciados em todas as células somáticas adultas, mas são freqüentemente desmetilados e re-expressos em tumores ^{41,48-50}. Da mesma maneira como ocorrem com retrotransposons, derivados de retrovírus, retrovírus endógenos também podem ser re-expressos secundariamente a um estado de hipometilação.

Estes conceitos têm sido explorados como propostas terapêuticas. A idéia seria a de induzir a re-expressão de genes supressores de tumor. Genes que estão silenciados poderiam ser re-expressos pelo uso de agentes desmetilantes como 5-azacitidina; 5-aza-2-deoxicitidina, zebularina ⁵¹⁻⁵⁴ entre outros ou ainda inibidores de histono-deacetilases como TSA (trichostatina-A) ou 4-fenilbutirato ^{45,50,55}, este último conhecido indutor de diferenciação de células de melanoma ⁵⁶. Assim, determinar o envolvimento de mecanismos epigenéticos nas vias de transformação de células cancerosas pode ter implicações terapêuticas. Modelos celulares para estas abordagens se fazem necessários para esta exploração.

OBJETIVOS

2 - OBJETIVO GERAL

Neste trabalho, nosso objetivo foi o de desenvolver pelo menos uma linhagem estabelecida a partir de células embrionárias de camundongos C57bl/6, caracterizando elementos de suas vias de transformação.

3 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer linhagem derivada de células embrionárias de camundongo C57bl/6;
 - Caracterizar a histogênese da linhagem, avaliando seu potencial tumorigênico e metastático em animais singenéticos;
 - Determinar vias principais associadas à tumorigênese, de acordo com a histogênese da linhagem clonada, explorando o envolvimento de mecanismos epigenéticos na manutenção do fenótipo da linhagem.
-

MATERIAIS E MÉTODOS

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Trabalhamos com animais C57bl/6, mantidos no biotério da Faculdade de Medicina da USP, em condições convencionais controladas, sem restrições alimentares com ciclos de vigília-sono de 12 horas em ambiente adequadamente climatizado.

4.1.1 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS EMBRIONÁRIAS

Acasalaram-se machos e fêmeas para obtenção de embriões dos quais foram cultivadas células mesenquimais. A partir do acasalamento, as fêmeas foram observadas diariamente até que se pudesse datar a cópula (análise do plug vaginal). Os embriões foram removidos após 14 dias, quando a maioria dos órgãos estava completamente formada. Os embriões foram manipulados segundo a técnica de explante originalmente desenvolvida por Harrison (1907) e Carrel (1912), citado por Freshney (1994). A fêmea grávida foi sacrificada por deslocamento cervical sob anestesia com clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após assepsia da superfície ventral com etanol 70%, o animal foi levado para o fluxo laminar e a cavidade abdominal aberta para a retirada do útero. Os embriões

foram removidos do útero, colocados em placa contendo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO – BRL, Grand Island, NY) estéril e 100µg/mL de estreptomicina e ampicilina (Gibco), lavados e em seguida transferidos para uma nova placa, onde o tronco foi cuidadosamente individualizado e eviscerado, retirando-se os membros superiores e inferiores. O tronco dos embriões foi então dilacerado gentilmente com o auxílio de bisturi, com o objetivo de se obter fragmentos menores que 1mm³. Estes fragmentos foram então transferidos para uma placa de cultura de 100mm contendo 3mL de DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO – BRL), 100µg/mL de estreptomicina e de ampicilina e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas. Após este período foi adicionado mais 2mL de meio de cultura completo. A troca de meio de cultura foi realizada semanalmente até que as células crescessem para fora do explante e pudesse ser feito o repique. Este foi feito quando as células estavam subconfluentes.

4.1.2 CULTURA DE CÉLULAS

Células mesenquimais embrionárias (MEC) foram cultivadas em meio DMEM pH 7.4 suplementado com 20% de SFB e mantidas em condições de cultura. Ao atingirem a subconfluência (cerca de 70%), as células foram lavadas com PBS/EDTA e retiradas das garrafas para repique pela adição de uma solução de tripsina 0,2% (Instituto Adolfo Lutz) e em seguida a ação

proteolítica da tripsina foi bloqueada pela adição de meio de cultura contendo 10% de SFB. O número de células foi estimado por contagem em hemocítômetro (câmara de Neubauer) avaliando-se a viabilidade celular pelo método de exclusão por azul de Tripan.

Para serem congeladas, as células foram centrifugadas, ressuspensas em uma solução de congelamento contendo SFB e 10% de DMSO (dimetilsufóxido, SIGMA) e estocadas a -70°C em ampolas de congelamento e após um mês, em nitrogênio líquido.

O anticorpo monoclonal anti-galectina-3, foi produzido pelo hibridoma TIB 166 (American Type Culture Collection, ATCC). As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 pH 7.4 (GIBCO-BRL) contendo 20% de SFB a 37°C com 5% de CO₂. O meio de cultura foi recolhido a cada 5 dias e estocado a -20°C. Após aproximadamente 2 meses, foi feito um “pool” dos meios de cultura recolhidos e estes foram testados por Western blot.

As linhagens Melan-a (linhagem derivada de melanócitos murinos não-tumorigênicos) e B16-F10 (linhagem de melanoma murino), cedidas pelo Dr. Vincent Hearing (NIH, Bethesda, MD) e Dr. Isaiah Fidler (M.D. Anderson, Houston, TX) foram cultivadas como descrito na literatura⁵⁷.

4.2 CLONAGEM

As células Mgal3 foram isoladas a partir de uma cultura finita de células mesenquimais embrionárias com o auxílio de um cilindro de clonagem. As células foram plaqueadas em baixa densidade (10³ células) em

placas de 100mm e mantidas em condições de cultivo até o surgimento de clones isolados. Após identificação dos clones a serem isolados, a placa foi lavada duas vezes com PBS e com o auxílio de um cilindro de inox, o qual foi colocado em cima destes clones, adicionou-se 200µL de tripsina. Em seguida, os clones selecionados foram transferidos para uma de placa de 12 poços contendo meio DMEM suplementado com 10% de SFB.

4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Microscopia eletrônica foi realizada no Centro Multiusuário de Microscopia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em colaboração com Helio Corrêa e Maria Cecília dos Santos Lobo Marcondes. Resumidamente, as células Mgal3 foram colocadas em uma solução fixadora de glutaraldeído 2% (Ladd) em PBS por 2 horas a 4°C. Após a fixação as células foram centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm e o *pellet* foi pós-fixado em uma solução de tetróxido de ósmio 1% (Merck) em PBS, durante 1 hora a 4°C. Em seguida o *pellet* foi lavado com soro fisiológico/sacarose 5% 3 vezes (para a retirada do excesso de ósmio) e pós-fixado em acetato de uranila 0,5% diluído em sacarose 5% (Merck) *overnight*. A seguir, o *pellet* foi desidratado em etanol 70% 2 vezes por 10 minutos, etanol 95% 2 vezes por 15 minutos, etanol 100% 4 vezes por 15 minutos e acetona pura 2 vezes por 15 minutos. Em seguida, o *pellet* foi embebido em uma mistura de acetona e resina na proporção de 1:1 durante 3 horas a temperatura ambiente sob agitação e depois embebido em resina pura por 1 hora em estufa a 40°C. As amostras foram incluídas em

formas de silicone e mantidas em estufa a 60°C por 24 horas. Após este período, o material foi retirado da forma e mantido em estufa a 68°C por 4 dias (para a secagem da resina).

O material foi cortado inicialmente para obtenção de cortes semi-finos de aproximadamente 1µm de espessura, que foram corados com uma solução de Azul de Metileno (borato de sódio e azul de metileno)/ Azul II em água, com a finalidade de definir a área de interesse para análise.

Os cortes ultra-finos, com aproximadamente 70nm de espessura foram obtidos em ultramicrotomo LEICA ULT, com navalha de diamante, coletados em tela de cobre e contrastados em solução de acetato de uranila, durante 10 minutos a temperatura ambiente, lavado com água e em seguida corado com citrato de chumbo, durante 20 minutos a temperatura ambiente e novamente lavado com água.

Os cortes foram avaliados em microscópio eletrônico de transmissão LEO 906 Zeiss do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Universidade de Campinas (UNICAMP). Campos selecionados foram documentados e micrografias eletrônicas posteriormente analisadas.

4.4. TUMORIGENICIDADE *IN VIVO*

Para avaliar a tumorigenicidade das células Mgal3, 5 animais selvagens foram inoculados com 1×10^5 células no flanco esquerdo. Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Medicina da USP sem restrições alimentares com ciclos de vigília -sono de 12 horas em ambiente

convencional controlado. Os camundongos foram observados diariamente para acompanhar o aparecimento de tumores. Os animais foram sacrificados quando tumores palpáveis foram observados.

4.5. IMUNO-HISTOQUÍMICA

Imuno-histoquímica foi realizada no instituto Ludwig em colaboração com Suely Nonogaki.

As lâminas com os cortes histológicos foram mantidas por 24 horas em estufa a 60°C, sendo desparafinadas em xilol a 60°C por 20 minutos e xilol à temperatura ambiente por 20 minutos. Prosseguiu-se a hidratação em etanol seriado 100%, 85%, e 70%, por 30 segundos cada etapa, em seguida lavadas em água corrente e destilada. Foi realizada a recuperação de sítios antigênicos fervendo-se as lâminas em tampão citrato de sódio a 10 mM pH 6.0, em panela de pressão (Eterna®, Nigro), durante 4 minutos. Após a fervura, a panela de pressão foi mantida fechada sob água corrente por 10 minutos e aberta à temperatura ambiente por mais 10 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada.

Foi realizado o bloqueio de peroxidase endógena com H₂O₂ (Rioquímica Indústria Farmacêutica) a 3% em água destilada com 4 trocas de 5 minutos cada, lavadas em água corrente e água destilada. Após a lavagem em PBS 10 mM pH 7.4 por 5 minutos, foi realizado o bloqueio de cargas e sítios inespecíficos com uma solução de leite desnatado Molico 1%

e 0,05% de Triton x100 por 20 minutos a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos, água destilada e PBS. Em seguida, os cortes foram incubados com os anticorpos primários HMB45, anti-melanossomo (Dako, M0634; titulação 1:100) e proteína S100 (Dako, Z0311; titulação 1:5000), diluídos em PBS contendo albumina bovina a 1% (BSA – Sigma) e azida sódica 0,1% durante 18 horas a 4°C em câmara úmida.

No dia seguinte, após as lavagens em PBS com 3 trocas de 3 minutos cada, foi realizada a incubação com anticorpo secundário específico biotilado- reagente C (Biotinylated goat anti-mouse/rabbit Ig) do kit StreptABComplex/HRP Duet (mouse/rabbit) (Dako A/S, K0492, Dinamarca) 1:200 diluído em PBS, por 30 minutos à 37°C a temperatura ambiente. Após o período de incubação, os cortes foram novamente lavados em PBS, com 3 trocas de 3 minutos cada e incubadas com o complexo – reagente A (Streptavidin) e reagente B (Biotinylated peroxydase) na titulação 1:200 em PBS por 30 minutos a 37°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS com 3 trocas de 3 minutos cada e incubadas em uma solução substrato: 60 mg de tetrahidrocloreto de 3-3' diaminobenzidina (DAB – Sigma) diluído em 100 mL de PBS, contendo 1 mL de H₂O₂ a 6% e 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), durante 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. A oxidação do DAB resulta em um produto de reação castanho dourado.

Após lavagens em água corrente e água destilada por 3 minutos, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavadas em água corrente e água destilada e mergulhadas 2 vezes em água

amoniacoal (solução de hidróxido de amônio 0,5%) e novamente lavadas em água corrente e água destilada. A desidratação das lâminas foram feitas em gradiente de etanol (etanol 85% por 30 segundos; etanol 95% por 30 segundos e etanol 100% por 30 segundos), diafanizados (xilol, 4 banhos de 30 segundos cada) e montados em Entelan (Merck, Germany). O material foi observado ao microscópio de luz. O controle negativo da reação foi realizado omitindo-se o anticorpo primário.

4.6 MÉTODO CITO-/HISTOQUÍMICO DE FONTANA MASSON

O método de Fontana Masson foi realizado no Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em colaboração com a Dra Miriam Nacagami Soto e Marlene Contini.

Resumidamente, as lâminas foram desparafinadas em estufa a 80°C por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram colocadas no xilol puro (para a retirada da parafina), seguida de reidratação com álcool 100%, 90%, 70% e lavadas em água corrente. As lâminas foram colocadas em uma solução previamente aquecida contendo (nitrato de prata 10%, hidróxido de sódio 10% e amoníaco) até que as amostras apresentassem coloração acastanhada, e, aí lavadas em água corrente. As amostras foram então incubadas em uma solução de cloreto de ouro 1% por 3 minutos a temperatura ambiente e lavadas em água corrente. Para a remoção da prata as amostras foram incubadas em uma solução de tiosulfato de sódio a 2% por 5 minutos e lavadas em água corrente. As amostras foram

contracoradas com verde luz por 2 minutos a temperatura ambiente e então secas em papel filtro. Após serem contracoradas as amostras foram desidratadas em álcool 70%, 90% e 100%, seguido de xilol puro. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Nikon Eclipse E600 e as imagens adquiridas e digitalizadas pelo programa Eclipse Net versão 1.16.3.

4.7 CITOMETRIA DE FLUXO

Aproximadamente 10^6 células foram colocadas por orifício de uma placa de 96 poços de fundo cônico (NUNC, Naperville, IL). As células foram lavadas com albumina bovina do soro (BSA) 1% em PBS e incubadas por 1 hora a 4°C com o anticorpo monoclonal MM2-9B6 (reconhece o antígeno associado a melanoma) cedido pelo Dr. Elieser Gorelik (University of Pittsburgh Cancer Institute and Department of Pathology, Pittsburgh, PA - USA). Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS/BSA 1% e incubadas por 1 hora com o anticorpo anti-imunoglobulina G de rato conjugado a isotiocianato de fluoresceína 1:100 (FITC - Sigma). Após duas lavagens com PBS/BSA 1% as células foram analisadas em citômetro de fluxo (FacScalibur, Beckton & Dickson, San Jose, CA, USA).

4.8 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

As células foram lavadas três vezes com PBS e após a retirada total do PBS, foi adicionado 1 mL do reagente Trizol (GIBCO BRL, Grand Island, NY). O reagente de Trizol é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato

de guanidina que torna mais eficiente a extração de RNA de células e tecidos. Assim que as células se soltaram, foram transferidas para tubos eppendorf onde ficaram homogeneizando durante 5 minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Em seguida, foram adicionados 200µL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha), a mistura homogeneizada por inversão e deixados à temperatura ambiente por 2 minutos. Os tubos foram então centrifugados a 12000g por 15 minutos a 4°C. Este procedimento resultou em 3 fases: a fase aquosa, onde está o RNA, a interface, que contém proteínas e DNA e a fase com o fenol/clorofórmio. Após a transferência da fase aquosa para um novo tubo, foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico (Merck) para a precipitação do RNA e este foi incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir os tubos foram centrifugados a 12000g por 10 minutos a 4°C. O RNA precipitado foi então lavado com etanol 75% (Merck), agitado vigorosamente e centrifugado a 7500g por 5 minutos a 4°C. As amostras foram dissolvidas em água DEPC (água tratada com o inibidor de RNase, dietilpirocarbonato – Merck) e incubadas por 10 minutos a 60°C para completa dissolução do RNA.

A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda 260 e 280 nm e a integridade do material foi verificado em gel de agarose 0,8% (Promega Corporation, USA).

4.8.1 TRATAMENTO DO RNA TOTAL COM *DNase*

A partir de 10 µg de RNA total foi acrescentado um volume de TE (1mM de EDTA e 10mM de Tris-HCl pH 8.0) para um volume final de 50 µL. A esse volume, foram adicionados 50 µL de uma solução para DNase (1 µL de MgCl₂ 1M; 1 µL de DTT 0,1M; 10 µL de DNase-RNase Free 1U/µL; 2 µL de Rnasin 10U/µL; 36 µL de TE e incubou-se a 37°C por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 2 µL de proteinase K (2mg/mL) e a reação foi mantida a 37°C por 30 minutos. Após este período, a reação foi interrompida adicionando-se 125 µL de uma solução de inativação da Dnase (2,5 µL de EDTA 0,5M; 12,5 µL de acetato de sódio 3M; 2,5 µL de SDS 10% e 107,5 µL de água DEPC). Adicionou-se 250 µL de fenol-clorofórmio (1:1), misturou-se por inversão vigorosamente e centrifugou-se a 10000g por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foram adicionados 100 µL de NaCl 0,5M; 500 µL de isopropanol (Merck) e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 10000g por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado com etanol 75% duas vezes e centrifugado a 10000g por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 10 µL de água DEPC.

4.8.2 TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)

Para a síntese do cDNA, foram utilizados aproximadamente 10 µg de RNA total, aos quais acrescentaram-se 1 µL de Oligo dT 500 µg/mL (Invitrogen), 1 µL de dNTP mix 10 Mm (Invitrogen), 1 µL de água DEPC. A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos e rapidamente esfriada em gelo. A seguir fez-se uma centrifugação breve e adicionou-se 4 µL de tampão 5x *first-strand* (Invitrogen), 2 µL de DTT 0,1M, misturou-se gentilmente e incubou-se a 42°C por 2 minutos. Em seguida adicionou-se 1 µL da enzima *Superscript II* (200 U/µL) e incubou-se por 50 minutos a 42°C. A reação foi inativada a 70°C por 15 minutos e armazenado no freezer a - 20°C até o momento do uso.

4.8.3 REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE - PCR

Para a reação de PCR, foram utilizados 200 ng de cDNA; 0,4 µL dNTPs 10mM; 2 µL de tampão da *Taq DNA polimerase* 10X; 0,6 µL de MgCl₂ 50mM; 0,3 µL de *primer antisense* 20 µM; 0,3 µL de *primer sense* 20µM e água em quantidade suficiente para 20 µL.

A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: um ciclo inicial de 95°C por 5 minutos para desnaturação das fitas; 30 ou 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto para pareamento dos *primers* às fitas

de cDNA e 72°C por 1 minuto para extensão das novas fitas, um ciclo de 72°C por 10 minutos para estender possíveis fragmentos incompletos e ao final foi mantido a 4°C. O produto de PCR foi aplicado em gel de agarose 1,7% em TBE (Tris 90mM, Ácido bórico 90mM e EDTA 50mM) na presença de brometo de etídeo (Gibco). As seqüências dos *primers* utilizados nas reações de PCR estão descritas na tabela abaixo:

Nome	Seqüência dos <i>primers</i>	
Galectina-3	CCT GGA GCT TAT CCT GGT CA	GTC ACC ACT GAT CCC CAG TT
CDKN2a	TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA	CTG GGT CAT CTT TTA ACG GT
MA-ECORV	GAA AGT ACC GGG ACT AGG GC	GGC GAC TCA GTC TAT CGG AG
β-actina	TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA	CTG GGT CAT CTT TTC ACG GT

Tabela 1: Os primers foram desenhados utilizando o Primer3 Software <http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3> e a especificidade foi verificada pelo BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.

4.9 NORTHERN BLOT

4.9.1 ELETROFORESE E TRANSFERÊNCIA DO RNA TOTAL PARA MEMBRANA DE NYLON

O gel de agarose 1% foi preparado em 127 mL de água e 14 mL de tampão MOPS 10X [ácido 3-(N-morfolino) propanesulfônico, (Sigma)] 20mM, acetato de sódio 5mM, EDTA 1mM pH 7,0 e após um breve resfriamento foi

adicionado 6 mL de formaldeído 37% (Merck). As amostras foram preparadas ajustando-se uma concentração de 20 µg de RNA total onde foram adicionados 25 µL de tampão para RNA [750 µL formamida deionizada (Sigma), 150 µL de tampão MOPS 10x, 240 µL de formaldeído 37%, 100 µL de água, 100 µL de glicerol (Merck), 80 µL de azul de bromofenol (10% peso/volume)] e a solução foi aquecida a 65°C por 15 minutos. Antes da aplicação, foi adicionado 1 µL de brometo de etídeo 1,0 mg/mL.

A eletroforese foi realizada em tampão MOPS 1x sob agitação a uma força constante de 60V por 5 horas à temperatura ambiente.

Ao termino da eletroforese, o RNA foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm e fotografado (Image Máster – Amersham Pharmacia). O corante brometo de etídeo presente na amostra emite fluorescência laranja quando exposto à radiação UV.

Antes da transferência, o gel foi lavado 3 vezes por 15 minutos cada, sendo a primeira em água e as demais em SSC 2X (SSC 20X solução estoque: NaCl 3M, citrato de sódio 0,3M pH 7,0). A membrana de nylon (Hybond-N, Amersham Internacional, Buckinghamshire, Inglaterra) foi colocada em água por 30 minutos para saturação e , posteriormente, em solução SSC 5X para atingir a mesma concentração do gel no momento da transferência.

A transferência foi realizada em um sistema a vácuo (Vácuo Dine, Pharmacia). O gel foi colocado sobre a membrana e as bolhas existentes

foram retiradas com o auxílio de bastão de vidro sobre a montagem. O vácuo foi ligado, e deu-se a transferência em quatro seqüências com duração de 15 minutos cada, sendo as duas primeiras com solução SSC 5X e as outras duas com SSC 10X, trocando as soluções entre as etapas.

Após a transferência a membrana foi lavada em uma solução de SSC 2X para retirada de resíduos de agarose e seca a temperatura ambiente. Posteriormente, o RNA foi fixado à membrana por exposição à UV no comprimento de onda de 245 nm por 5 minutos cada lado. A membrana foi devidamente identificada e foi marcada a localização das bandas dos RNA ribossômicos 28S e 18S.

4.9.2 OBTENÇÃO DA SONDA

O cDNA utilizado para a síntese da sonda radioativa foi sintetizado a partir do produto de PCR. Para tanto, 10 µL da reação do produto de PCR foi aplicado em gel de agarose 1,7% na presença de brometo de etídeo. Após a corrida, o gel foi visualizado em luz UV para confirmar a amplificação. O produto da PCR foi purificado utilizando-se o *kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Resumidamente, foram adicionados 45 µL da *Membrane Binding Solution* ao produto de PCR e em seguida, transferidos para uma mini-coluna e incubados por 1 minuto à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 10000 g por 1 minuto e descartou-se o sobrenadante. A mini-coluna foi transferida para um novo tubo e foram adicionados 700 µL da solução de lavagem e novamente centrifugado a 10000 g por 1 minuto. Descartou-se o sobrenadante e foram adicionados a

mini-coluna 50 µL água DEPC e incubou-se por 1 minuto à temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 10000g por 1 minuto. O DNA purificado foi mantido a - 20°C até o momento do uso.

4.9.3 SÍNTESE DA SONTA

A síntese da sonda radioativa foi realizada utilizando-se o *kit* de marcação *Rediprime DNA labeling system* (Amersham). Em 50 ng de cDNA foram adicionados 45 µL de TE e fervido por 10 minutos. Esse procedimento é importante para separar a dupla fita de DNA. Em seguida, esse volume foi transferido para um tubo contendo uma mistura de dNTPs, *klenow*, *random primers*, 5 µL nucleotídeo radioativo [α -³²P]dCTP e incubado a 37°C por 30 minutos. A seguir a reação foi passada em coluna de sefadex G50 onde apenas o cDNA sintetizado consegue passar. Em seguida, uma alíquota de 2 µL da amostra foi colocada em um tubo de cintilação contendo 5 mL de aquasol [1L de Triton X-100 (Merck), 0,6 g de POPOP (Sigma), 12 g de PPO (Sigma) e 2 L de Tolueno (Merck)]. Realizou-se a contagem da radioatividade total deste volume em um contador de cintilação LS-5000, Beckman.

Todo o procedimento foi realizado em capela com anteparos de acrílico e após o termino da marcação, foi realizado a monitoração da radioatividade no local com um aparelho Geiger.

4.9.4 HIBRIDIZAÇÃO DA MEMBRANA

As membranas foram colocadas em cilindros de vidro e pré-hibridizadas no forno de hibridização (Techine) por 1 hora a 42°C em 10 mL de solução de hibridização [SSPE 5X (NaCl 0,75M; NaH₂PO₄ 0,05M; EDTA 4mM pH 7,4), Denhardt's (Ficoll 400 0,05 g/mL; polivinilpirolidona 0,05 g/mL; albumina bovina do soro 0,05 g/mL), SDS 1%, Formamida 50%, Sulfato de Dextran 5%, 200 µg/mL de DNA de espermatozoides de salmão desnaturado e água]. Para a hibridização, aproximadamente 2x10⁶ cpm/mL da sonda foi fervida por 10 minutos e adicionada à solução de hibridização e incubada por aproximadamente 16 horas a 42°C. Após esse período, as membranas foram lavadas duas vezes com solução SSPE 2X + 0,1% SDS a temperatura ambiente e uma vez com SSPE 1X + 0,1% SDS a 52°C.

Após as lavagens, retirou-se o excesso de solução das membranas colocando-as entre folhas de papel filtro e, em seguida, foram seladas em saco plástico e expostas a um filme de Raio X-OMAT XK-1 100SH (Kodak Films, São Paulo, Brasil) dentro de um chassi contendo um par de intensificadores de imagem e deixado no freezer - 70°C por um período médio de três dias.

Para a revelação, o filme foi colocado no revelador Gbx (Sigma) até o aparecimento das bandas e, em seguida, fixado com fixador Kodak por 10 minutos, lavado em água corrente e seco.

Para a remoção total das sondas hibridizadas, as membranas foram lavadas duas vezes em água e 1% SDS por 20 minutos a 95°C e depois mantidas a temperatura ambiente até esfriar a solução.

4.10 EXTRAÇÃO DE DNA

As células foram lavadas três vezes com PBS e após a retirada total do PBS, adicionou-se 1 mL de reagente de DNazol (GIBCO BRL). Este reagente é uma solução de lise contendo cloreto de guanidina que permite a precipitação seletiva do DNA. Transferiu-se então o material para tubos de microcentrífuga e centrifugou-se a 10000g por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a transferência do material viscoso para um novo tubo, foram adicionados 500 µL de etanol 100%, homogeneizou-se por inversão, mantendo a mistura a temperatura ambiente por 5 minutos. O DNA foi transferido para um novo tubo e lavado 2 vezes com etanol 95%. O DNA foi solubilizado com 300 µl de NaOH 8 mM e HEPES 1M pH 7.0.

4.10.1 PCR PARA SEQÜENCIAMENTO

Sequenciaram-se os exons 5 a 8 de *TP53* da linhagem Mgal3, comparando-se a seqüência com a do melanoma murino B16-F10. Para a reação de PCR, foram utilizados 50 ng de DNA genômico, 20 pmoles de cada *primers*, 200 µM de dNTPs, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,3, (tampão da PCR) e 1,0 U de Taq DNA Polimerase em volume final de 25 µL. A reação de amplificação foi realizada nas seguintes

condições: um ciclo inicial de 95°C por 5 minutos para desnaturação; 42 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto na temperatura para o pareamento dos *primers* ⁵⁸ conforme a tabela 2 e 1 minuto a 72°C e um ciclo final de extensão de 5 minutos a 72°C.

Exons	Nome dos <i>primers</i>	Seqüências dos <i>primers</i>	Temperatura de anelamento
5	MP5-49F MP4-41R	5'-ACACCTGATCGTTACTCGGCTTGTC-3' 5'-GGAGGAGCCAGGCCTAAGAGCAA-3'	71°C
6	MP6-40F MP6-50R	5'-CACCATGAGCGCTGCTCCGATGG-3' 5'-GCTAGAAAGTCAACATCAGTCTAGG-3'	70°C
7	MP7-56F MP7-57R	5'-CAGGTCACCTGTAGTGAGGTAGGG-3' 5'-TGGAACAGAAACAGGCAGAAGCTGG-3'	71°C
8	MP8-58F MP8-51R	5'-AGTCAGGATGGGGCCCAGCTTTCT-3' 5'-AAGAGTGACTTTGGGGTGAAGCTC-3'	71°C

Tabela 2. Seqüências dos *primers* utilizados para a reação de PCR e sequenciamento de p53.

4.10.2 SEQÜENCIAMENTO

Após a amplificação do DNA genômico, 1µl deste produto foi utilizado para a reação de seqüenciamento utilizando o *kit ABI PRISM™ Big Dye™ terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer)*. A reação de sequenciamento foi realizada nas seguintes condições: um ciclo inicial de 96°C por 5 minutos para a desnaturação, seguido por 25 ciclos de 30

segundos a 96°C, 15 segundos a 55°C e 4 minutos a 60°C. O produto da PCR foi precipitado utilizando isopropanol 60%, centrifugado por 20 minutos a 14000 g. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado duas vezes com etanol 70%. O pellet foi seco e ressuspendido em tampão desnaturante (95% formamida, 5% blue dextran), aquecido a 95°C por 3 minutos e o material aplicado em gel de poliacrilamida desnaturante (*Long Ranger™ Gel Protocols - FMC®*) e utilizando o seqüenciador ABI PRISM™377 DNA Sequencer (Perkin Elmer) em colaboração com a Dra Anamaria Camargo do Instituto Ludwig.

4.11 TRATAMENTO DE Mgal 3 COM INIBIDOR DE METILAÇÃO DO DNA 5'-AZA-2'- DEOXCITIDINA

As células Mgal 3 foram plaqueadas na densidade inicial de 1×10^6 em garrafas de 75cm² em meio DMEM, pH 7,4 acrescido de SFB 10%. Após 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações de 5'-Aza-2'-deoxicitidina, um agente químico que inibe a metilação do DNA (10, 20, 50 e 100µg - Sigma) por 48 horas. As células controle foram cultivadas em meio contendo DMSO (dimetilsufoxido), diluente de 5'-Aza-2'-deoxicitidina. O tratamento com 5'-Aza-2'-deoxicitidina foi adicionado a cada 24 horas. Ao final do tratamento o RNA total e proteína destas células foram extraídos como descrito anteriormente.

4.12 EXTRATOS PROTÉICOS

Após o tratamento as células, foram lavadas com PBS, e ressuspensas em 1mL de tampão de lise (Triton X-100 1%, NaCl 150mM, Tris 50 mM pH 7.4), contendo inibidores de proteases aprotinina 2 μ g/mL (SIGMA) e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 1mM. O lisado foi submetido à agitação por 15 minutos a 4°C e o extrato solúvel foi isolado do material precipitado insolúvel após centrifugação a 13000g por 15 minutos a 4°C. Os extratos foram mantidos a -20°C até o momento do uso, quando sua concentração protéica foi determinada.

4.12.1 DOSAGEM PROTÉICA

A concentração protéica dos extratos foi determinada com o Kit DC Protein Assay (Bio-rad) que é baseado no método de Folin ⁵⁹. O ensaio é baseado na reação de uma proteína com uma solução de Tartarato de cobre seguida da redução do reagente de Folin pela proteína tratada com o cobre em meio alcalino. O desenvolvimento da cor é devido aos aminoácidos tirosina e triptofano e em menor extensão pela cisteína e histidina. A proteína reduz o reagente de Folin pela perda de 1, 2 ou 3 átomos de oxigênio.

Em uma placa de 96 poços, foram colocados 4 μ L de cada amostra a ter sua concentração protéica determinada, 20 μ L da solução de tartarato de cobre e 160 μ L do reagente de Folin. A placa foi homogeneizada vagarosamente e após 15 minutos a temperatura ambiente sua absorbância

a 655nm foi determinada e comparada às obtidas em curva de padrão de BSA (0 – 1,44µg).

4.12.2 WESTERN BLOTTING

As amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida segundo o protocolo de Laemmli em condições não redutora⁶⁰. O gel de corrida foi preparado com Tris 0,375M pH 8.8, SDS 0,1%, acrilamida 10%, persulfato de amônio (APS) 0,03% e N,N,N,N tetra metiletilenodiamina (TEMED, Sigma) e o gel de empilhamento com, Tris 0,125M pH 6.8, SDS 0,1%, acrilamida 4%, APS 0,045% e TEMED. Os extratos protéicos foram diluídos em tampão de amostra não redutor (Tris-HCl 240mM pH 6.8, SDS 0,8%, glicerol 40% e azul de bromofenol 0,02%). A eletroforese foi feita em tampão Tris 25mM, glicina 0,19M pH 8.3, SDS 0,1% à temperatura ambiente e sob uma voltagem constante de 60V.

Os extratos protéicos separados no gel de poliacrilamida-SDS foram eletroforeticamente transferidos para membrana de PVDF (Hydrophobic Polyvinylidene Difluoride, Amersham) ou corados com solução de Comassie Blue. A transferência foi feita em tampão Tris 25mM, Glicina 192mM e Metanol 20% por 1 hora a 100V a 4°C.

Para bloquear os sítios inespecíficos, a membrana foi incubada em leite desnatado Molico (Nestlé) 5% em PBS por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. Depois de lavada 3 vezes por 10 minutos com PBS/Molico, a membrana foi incubada por 16 horas a 4°C com o anticorpo

monoclonal anti-galectina-3 M3/38 (TIB 166 – ATCC) e novamente lavada com PBS/Molico 3 vezes por 10 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado a peroxidase (HRP – Horseradish Peroxidase Conjugate, KPL – Kirkegard & Perry Laboratories, Maryland, USA) 1:1000 diluído em PBS/Molico por 1 hora a temperatura ambiente. A membrana foi revelada com 7,5 mL de PBS, 10 μ L de H_2O_2 e 3,75 mg de DAB (tetrahydrocloro de 3,3'-diaminobenzidina – Sigma, St. Louis, MO). A reação foi interrompida pela imersão da membrana em água destilada após o aparecimento das bandas.

RESULTADOS

5 – RESULTADOS

5.1 APARECIMENTO DE FOCO DE TRANSFORMAÇÃO EM CULTIVO DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS E ESTABELECIMENTO DA LINHAGEM Mgal3.

Este projeto vem sendo desenvolvido no âmbito de um projeto mais amplo, que visa estabelecer especificamente o papel da lectina animal galectina-3 no processo de transformação maligna. Parte da estratégia experimental deste projeto mais amplo inclui a comparação do potencial de transformação de células derivadas de embriões de animais selvagens e animais nulizigotos para o gene da galectina-3⁶¹, mantidos em nosso laboratório. Os resultados descritos a seguir foram obtidos primariamente com células derivadas de animais selvagens.

Explantes da carcaça de embriões de animais selvagens foram mantidas em meio de cultura DMEM pH 7,4 suplementado com 20% de SFB. No processo de cultivo e estabelecimento de linhagens, na décima primeira passagem, observamos o aparecimento de focos de células com um fenótipo diferente das células mesenquimais embrionárias selvagens (MEC^{+/+}) como ilustrado na figura 7. Estas células foram isoladas com ajuda de um cilindro de clonagem, clonadas pela técnica de plaqueamento em baixa densidade, como descrito em materiais e métodos, dando origem à linhagem estabelecida, denominada Mgal3. Uma vez estabelecida, iniciamos a caracterização da histogênese desta linhagem, caracterizando também seu potencial maligno. O fato de apresentar um crescimento independente

de ancoragem, avaliado pelo seu crescimento em focos quando atingida a densidade crítica, sugeriu-nos a possibilidade desta célula ser transformada, assim objetivamos também caracterizar as vias de transformação envolvidas no desenvolvimento de seu potencial fenótipo maligno.

Figura 7. Foco de transformação. Durante o cultivo de células mesenquimais embrionárias selvagem (seta vermelha), observamos células com fenótipo alterado, caracterizado por uma grande relação núcleo-citoplasmática e pela capacidade de crescimento em focos, de maneira independente de ancoragem (seta preta). Este foco foi isolado com ajuda de um anel de clonagem e a linhagem Mgal3 estabelecida e clonada. Barra = 0,1mm.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM Mgal3

5.2.1 PRODUÇÃO DE PIGMENTO

Após a clonagem, estas células foram mantidas em cultura em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após dois dias de cultivo,

observamos uma alteração na cor do meio de cultura (vermelho para marrom escuro), seguido de pigmentação do *pellet* celular, como ilustrado na figura 8. Esta alteração de cor indicava que estas células estavam produzindo e secretando para o meio de cultura um pigmento escuro, característico de células de origem melanocítica. Para efeito de comparação, cultivamos paralelamente linhagens de melanócitos murinos, melan-a⁶² e de melanoma murino, B16-F10, ambas com capacidade pigmentante em condições específicas de cultura^{62,63}. Um número igual de células (10^7) foi então comparado quanto à produção de pigmento presente no *pellet* celular (Figura 8).

Figura 8. Produção de Pigmento. Linhagens de origem melanocítica com capacidade pigmentante e Mgal3 foram mantidas em cultura e após 2 dias o “pellet” foi recolhido por centrifugação e analisado quanto à presença de pigmento (10^7 células por poço). **A** – Melan-a, células derivada de melanócito não tumorigênica; **B** – B16-F10, Melanoma murino e **C** – Linhagem Mgal3.

5.2.2 ORIGEM MELANOCÍTICA DE Mgal3

Para estender a caracterização e natureza histogenética de Mgal3, procedemos às análises ultraestrutural, imuno- e citoquímica da linhagem. 5×10^6 células foram separadas e fixadas em glutaraldeído 2% e processadas para análise ultraestrutural conforme descrito em materiais e métodos. A análise das micrografias eletrônicas mostrou a presença de organelas contendo em seu interior um material eletrodenso. Estas organelas foram identificadas como melanossomos (organelas especializadas na síntese de melanina). Observou-se ainda que estes melanossomos apresentavam estágios diferentes de maturação, como evidenciados pelo acúmulo de diferentes quantidades de material eletrodenso (setas na figura 9).

Para análise imuno- e citoquímica, 10^7 células foram fixadas, incluídas em parafina e processadas, avaliando-se a expressão de antígenos como S100 e HMB45, além de utilizar a coloração Fontana-Masson, específica para melanina. Como mostrado na figura 10 as células mostraram-se fortemente reativas para os marcadores de melanócitos (figura 10 A e B), embora a marcação, como esperado para células em cultura fosse heterogênea. Além disto, uma fração significativa das células mostrou-se fortemente positiva para a reação de Fontana-Masson, mostrando o acúmulo diferencial de grânulos de melanina nestas células. Como mencionado acima, notamos a presença de pigmento no meio de cultura, mesmo na ausência de significativa morte celular, o que sugere que este pigmento seja de alguma forma secretado. Esta atividade secretória poderia explicar, pelo menos em parte, a presença de células negativas na técnica citoquímica.

Em conjunto, estes resultados confirmam que Mgal3 deriva de células melanocíticas, mantendo o padrão de produção deste pigmento.

Figura 9. Micrografias eletrônicas da linhagem Mgal3, mostrando a presença de melanossomos maduros e em diferentes estágios de maturação. Barra = 400nm.

É importante ressaltar que a produção deste pigmento (melanina) por estas células é espontânea, uma vez que não utilizamos nenhum fator que estimule esta produção

Figura 10. Imunocitoquímica da linhagem Mgal3 confirmando a natureza melanocítica desta linhagem. Aproximadamente 1×10^7 células foram fixadas, emblocadas em parafina, processadas e analisadas utilizando dois marcadores de melanócito **A** – S100 (**C** – controle negativo); **B** – HMB45; **D** – coloração com hematoxilina eosina e **E** – Fontana Masson. Barras equivalem a 10µm.

5.2.3 A PRESENÇA DE PARTÍCULAS VIRAIS NA LINHAGEM Mgal3.

Uma observação que nos chamou a atenção na análise das micrografias eletrônicas da linhagem Mgal3 foi a presença de estruturas eletrodensas dentro das cisternas do retículo endoplasmático com o formato de um anel interrompido. Estas estruturas foram identificadas como partículas virais (figura 11).

Li e colaboradores mostraram que células de melanoma de camundongo C57bl/6 como a BL6-8 produzem inúmeras cópias de partículas retrovirais ecotrópicas do tipo C denominado MelArv (Retrovirus Associado a Melanoma) semelhantes às partículas encontradas nesta linhagem.

Figura 11. Micrografias eletrônicas da linhagem Mgal3 mostrando a presença de partículas virais dentro das cisternas do retículo endoplasmático (setas). Barra = 400nm.

MelArv codifica um antígeno conhecido como antígeno associado a melanoma (MAA). Este antígeno é codificado pelo gene *env* e reconhecido pelo anticorpo monoclonal MM2-9B6^{20,22,64}. Foi demonstrado que este anticorpo reage especificamente com células de melanoma dos animais C57bl/6, não reagindo com células normais, nem outros tipos de tumores⁶⁴.

Avaliamos, então, se a linhagem Mgal3 apresentava o MAA em sua superfície. Para isso, as células foram incubadas com o anticorpo monoclonal MM2-9B6 por 1 hora a 4°C, lavadas com PBS/BSA 1% e incubadas com anticorpo anti IgG de rato conjugado a FITC por 1 hora a 4°C. A figura 12 mostra que as células Mgal3 e B16-F10 utilizada como controle positivo expressam o MAA em sua superfície, diferentemente das células Melan-a. A ausência de reatividade ao anticorpo nas células Melan-a sugere que: o epitopo, reconhecido pelo anticorpo não é apresentado de forma correta na superfície das células ou estas células não expressam o antígeno viral.

Figura 12. A expressão do MAA na superfície das células Mgal3 e B16-F10. Os histogramas mostram a distribuição das células positivas ao anticorpo MM2-9B6 (linhas contínuas) e ao anticorpo secundário conjugado a FITC, somente (linhas pontilhadas).

Além disso, também analisamos a expressão do RNAm de genes retrovirais nas linhagens Mgal3, B16-F10, Melan-a e na cultura finita de células mesenquimais embrionárias (MEC), através da técnica de *Northern blot*. Utilizando as regiões de *env* e 3' LTR como sonda, identificamos a presença de dois transcritos de aproximadamente 8,8 Kb e 3,6 Kb nas linhagens Mgal3, Melan-a e B16-F10, mas ausente nas células embrionárias MEC+/+ e MEC-/- (cultura finita). Estes transcritos representam o retrovírus completo e o RNAm processado de *env* respectivamente (figura 13).

Figura 13. Expressão do RNAm do retrovírus nas linhagens Mgal3, B16-F10 e Melan-a, mas não nas células MEC+/+ e MEC-/-. O RNA total das células foi isolado, separado em gel de agarose e analisado por *Northern blot* usando-se sonda específica marcada com ^{32}P para os transcritos de MelArv e GAPDH.

5.2.4 Mgal3 É TUMORIGÊNICA E METASTÁTICA

Com o objetivo de avaliar se as células Mgal3 originariam tumores em animais singenéticos, 1×10^5 células foram injetadas via subcutânea no flanco direito dos animais C57bl/6 selvagens (n=5) e nulizigotos para o gene da glectina-3 (n=4). Os animais foram observados diariamente quanto ao aparecimento de tumores. Após 10 dias da inoculação, tumores palpáveis foram observados em todos os animais, indicando que Mgal3 tem potencial tumorigênico, dando origem a tumores de crescimento relativamente rápido, quando comparados a outros sistemas de melanomas murinos que dispomos em nosso laboratório⁶⁵.

Os animais foram sacrificados e observamos grandes tumores sólidos, bem vascularizados e pigmentados. A análise por imuno-histoquímica utilizando dois diferentes marcadores de melanócitos, HMB45 e S100, mostrou áreas heterogeneamente marcadas para ambos os anticorpos (coloração castanha) com um padrão citoplasmático (figura 14 A e B). Além disso, foi possível encontrar a presença de uma massa de células tumorais infiltrando os linfonodos destes animais como evidenciado pela coloração de hematoxilina (figura 14 D, pontilhado). O método de Fontana-Masson foi utilizado para coloração da massa no linfonodo, sendo possível verificar a presença de células que acumulam melanina no interior dos linfonodos. A figura 14E mostra áreas positivas para a marcação de grânulos de melanina de forma heterogênea.

Estes resultados indicam que células Mgal3 têm a capacidade de gerar tumor em animais singenéticos, além de se estabelecer em sítios distantes (metástase).

Figura 14. Imuno-histoquímica dos tumores derivados de Mgal3 confirmam a natureza melanocítica da linhagem estabelecida. Após 10 dias da inoculação de células Mgal3, os tumores foram processados e analisados utilizando dois marcadores de melanócito, **A** – S100 (**C** – controle negativo) **B** – HMB45, **D** – coloração com hematoxilina e **E** – Fontana Masson. Barras, A,B,C e E equivalem a 10µm e D equivale a 25µm.

5.2.5 ANÁLISE DOS GENES *TP53* E *CDKN2a*

TP53 é um gene de resposta a estresse, localizado na região 17p13.1 e codifica uma proteína supressora de tumores cuja localização é preferencialmente nuclear; sua massa molecular de 53 KDa^{66,67}. Mutações ou deleções de p53 são encontrados em mais de 55% dos tumores humanos. As mutações encontrada neste gene geralmente encontram-se na região de ligação específica ao DNA (éxons 5 a 8) região essencial para a sua função^{58,68}. Com o objetivo de avaliar o *status* do gene *TP53* nesta linhagem, foi realizado seqüenciamento direto dos éxons 5 a 8.

Análise do seqüenciamento mostrou que as linhagens Mgal3 e B16-F10 não apresentaram nenhuma alteração na região codificadora do gene *TP53* (Anexo I). Este resultado coincide com os dados da literatura, mostrando que a freqüência de mutações em p53 é relativamente baixa em melanomas⁶⁹.

O locus *CDKN2a* localizado no cromossomo 9p21 é composto de 4 éxons e codifica duas proteínas supressoras de tumor p16^{INK4a} e p14^{ARF} (p19^{ARF} em camundongo). A inativação de *CDKN2a*, tanto por mutação, deleção homozigótica ou por metilação do promotor têm sido associadas com o desenvolvimento do melanoma. Utilizando a técnica de RT-PCR para amplificação do éxon 2 que é comum para os genes p16^{INK4a} /p19^{ARF}, verificamos que estes genes não são expressos na linhagem Mgal3 (figura 15).

Como mencionado acima, este trabalho está inserido no contexto de um projeto mais amplo, que visa estabelecer o papel de galectina-3 na transformação maligna. Assim, e por razões que serão discutidas adiante, avaliamos também a expressão de galectina-3 em Mgal3. A figura 15 mostra que esta linhagem não expressa o RNAm de galectina-3.

Figura 15. Mgal3 não expressa os genes p16^{INK4a}/p19^{ARF} e galectina-3. O RNA total das células foi extraído e submetido à reação de RT-PCR, utilizando-se iniciadores específicos. A amplificação da β-actina foi utilizada como controle da integridade das amostras de cDNA.

Sabe-se que alterações epigenéticas como silenciamento transcricional por hipermetilação do promotor é um evento bastante freqüente na inativação de genes supressores de tumor ⁴⁶.

Para verificar se a perda da expressão dos genes CDKN2a e LGALS3 era devido à metilação do seu promotor, células Mgal3 foram tratadas com um agente químico que inibe a metilação do DNA 5-aza-2' deoxicitidina em diferentes concentrações (10, 20, 50 e 100μM) por até 48 horas. Ao final do

tratamento, o RNA total e proteínas destas células foram extraídos e submetidos à reação de RT-PCR e Western blot.

Análise de RT-PCR mostrou que apenas a maior concentração de 5-aza-2'deoxicitidina (100 μ M) foi capaz de induzir a expressão do RNAm dos genes p16^{INK4a} / P19^{ARF} (figura 16).

Figura 16. O silenciamento dos genes p16^{INK4a}/p19^{ARF} é revertido após o tratamento com 5-aza-2'deoxicitidina. Células Mgal3 foram tratadas com diferentes concentrações de 5-aza-2'deoxicitidina por 48 horas. Após o tratamento o RNA total foi extraído e submetido à reação de RT-PCR, utilizando-se iniciadores específicos. Canaleta 2 – células tratadas apenas com DMSO; canaleta 3 – 10 μ M; canaleta 4 – 50 μ M e canaleta 5 - 100 μ M

Ao contrario do observado para os genes $p16^{\text{INK4a}}$ / $P19^{\text{ARF}}$ a expressão do RNAm e proteína do gene da galectina-3 foi observado já na concentração de $10\mu\text{M}$ de 5-aza-2'deoxicitidina (figura 17).

Figura 17. O silenciamento do gene de galectina-3 é revertido após o tratamento com 5-aza-2'deoxicitidina. Células Mgal3 foram tratadas com diferentes concentrações de 5-aza-2'deoxicitidina por até 48 horas, Após o tratamento o RNA total e proteína foram extraídos e submetidos à reação de RT-PCR, utilizando-se iniciadores específicos e Western blot. **A** - Canaleta 2 – células tratadas apenas com DMSO; canaleta 3 – $10\mu\text{M}$; canaleta 4 – $50\mu\text{M}$ e canaleta 5 - $100\mu\text{M}$; **B** – canaleta 1 – células 3T3+/+ controle positivo;. Canaleta 2 – células tratadas apenas com DMSO; canaleta 3 - $10\mu\text{M}$ por 24 horas; canaleta 4 - $20\mu\text{M}$ por 24 horas; canaleta 5 - $10\mu\text{M}$ por 48 horas e canaleta 6 - $10\mu\text{M}$ por 48 horas.

DISCUSSÃO

6 – DISCUSSÃO

Neste trabalho descrevemos o estabelecimento da linhagem Mgal3, derivada de explantes de tecidos embrionários de camundongos C57bl/6 selvagens. Esta linhagem é de origem melanocítica, como demonstrado pela produção de pigmento compatível com eumelanina, pela coloração, reação citoquímica pelo método de Fontana-Masson, caracterização ultraestrutural de melanossomos e finalmente reatividade com anticorpos específicos para marcadores de melanócitos (HMB45 e S100). A linhagem é tumorigênica, dando origem a melanomas metastáticos (metástases linfonodais). As vias de transformação envolvem a expressão de novo de genes retrovirais endógenos, com produção do antígeno MAA, reconhecido pelo anticorpo monoclonal MM2-9B6, perda de transcrição de *CDKN2a*, restaurada pelo agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina, o que sugere que pelo menos um dos transcritos de *CDKN2a* tem expressão controlada por metilação de seu promotor. Não há mutações nos éxons 5-8 do gene supressor de tumor *TP53*. Ainda, esta linhagem de melanoma murino não expressa a lectina animal galectina-3, e sua expressão é restaurada após inibição de metilação com 5-aza-2'-deoxicitidina.

Como mencionado, este trabalho está inserido em um projeto mais amplo de nosso laboratório que visa determinar o papel da lectina animal galectina-3 no processo de transformação maligna. Uma das estratégias experimentais para determinar este papel se baseia no cultivo de células embrionárias a partir de explantes de tecidos da carcaça de embriões, o que

enriquece preparações de células de origem mesenquimal ⁷⁰. Nestes protocolos, os meios de cultura não são suplementados para cultivos diferenciados de células epiteliais ou de outra origem, favorecendo a manutenção de células comumente chamadas de fibroblastos embrionários (MEF, mesenchymal embryonic fibroblasts), ou como mais correntemente tem sido chamadas, células mesenquimais embrionárias (MEC, mesenchymal embryonic cells), uma vez que apresentam comprometimento com um fenótipo estabelecido. O cultivo destas células segue um rígido esquema de repiques, como sugerido por Green e Todaro ⁸ há várias décadas, e que permitem o estabelecimento de linhagens (por exemplo, 3T3, 3T6 etc). Durante o cultivo de células derivadas de embriões de animais selvagens, observamos ao longo das dez primeiras passagens o surgimento de foco de transformação ilustrado na figura 7.

O estabelecimento de uma linhagem de origem melanocítica neste protocolo foi um fato inesperado. Como mencionado acima, não há suplementos ao meio de cultura, que é relativamente pobre para o suportar a proliferação de células com requerimentos mais específicos para crescimento como melanócitos ⁷¹. Contudo, a preparação inclui a pele dos embriões, assim há células de origem melanocítica nas preparações dos explantes; que, porém, usualmente não sobrevivem ao protocolo de cultivo. Isto nos faz supor que a linhagem Mgal3 se originou de um melanoma já existente em um dos embriões utilizados no processo de explante de tecidos embrionários.

Diferentemente do que ocorre em células humanas, dois eventos genéticos seriam suficientes para a transformação maligna de células de origem murina ⁷². A análise ultraestrutural permitiu a identificação de partículas virais encontradas nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso. A análise destas partículas levou-nos a postular que tratavam-se de partículas de um vírus ecotrópico freqüentemente presente em células de melanoma murino. Trata-se de um retrovírus endógeno cuja transcrição é ativada ao longo do processo de transformação ^{22,23}. Mais recentemente tem havido um crescente interesse na caracterização destes vírus, em parte motivado pelo achado cada mais freqüente de transcritos virais observados nas diversas abordagens genômicas ou de comparação sistemática entre linhagens tumorigênicas e não-tumorigênicas. De fato, esta observação também foi feita em nosso grupo com a comparação sistemática entre a linhagem de melanócitos murinos melan-a e duas linhagens de melanoma derivados desta linhagem (⁵⁷, R. Chammas, comunicação pessoal).

O retrovírus ecotrópico associado ao desenvolvimento de melanoma murino (MelArv) é um vírus defeitivo ^{22,73}, que por recombinação pode levar à geração de partículas infectantes ⁷⁴. Este vírus foi encontrado em pelo menos três linhagens de melanoma murino independentes (B16, JB/RH e JB/MS). Mgal3 seria uma quarta linhagem caracterizada pela presença deste vírus. Este vírus parece ser transformante, uma vez que a incubação de células derivadas de melanócitos com sobrenadantes contendo um título relativamente alto destas partículas levou à transformação maligna das células receptoras ²². Como mencionado, o mecanismo de transformação

parece associado à inserção do vírus a montante de um protooncogene, *c-maf*⁷⁴. Esta característica do vírus levanta uma possibilidade que precisa ser discutida quanto à origem da linhagem, que poderia ter sido derivada da infecção de melanócitos normais com retrovírus derivados de um melanoma murino produtor de MelArv, como B16-F10. Embora plausível, esta explicação é pouco provável, pois as células embrionárias não foram mantidas no mesmo ambiente ou mesmo cultivadas simultaneamente à linhagem B16-F10, que foi usada neste projeto em um segundo momento, após a obtenção de Mgal3 para efeitos de comparação de seu fenótipo (produção de pigmento e expressão de MAA, reconhecido por MM2-9B6).

Retrovírus endógenos e retrotransposons tem sua transcrição normalmente silenciada em células normais por mecanismos epigenéticos como metilação^{14,73}. Sugere-se que mecanismos de metilação de seqüências retrovirais tenham sido selecionados ao longo da evolução como um possível mecanismo protetor da homeostasia celular. Ao longo do processo de transformação, a hipometilação destas regiões cursaria com a expressão *de novo* destes transcritos, ou mesmo alternativamente, a atividade promotora das LTR destes retrovírus poderia ser recuperada com o processo de hipometilação, levando ao desbalanço na expressão de genes celulares.

Em trabalho recente mostrou-se que a expressão de MelArv está associada diretamente à tumorigênese de linhagens de melanoma. Utilizando a abordagem de RNA de interferência, foi possível mostrar que células de melanoma cujos transcritos de MelArv foram funcionalmente

silenciados (células MelArv⁻) não geram tumores quando transplantadas no tecido subcutâneo. Curiosamente, nenhum dos parâmetros *in vitro* utilizados para predição do potencial tumorigênico se alteraram nas células transfectadas com o RNA de interferência. Contudo, a resposta imune montada pelas células parentais (MelArv⁺) e pelas células MelArv⁻ foram qualitativamente diferentes, sugerindo que antígenos de MelArv sejam imunossupressores, favorecendo o crescimento de células de melanoma (portanto o fenótipo tumorigênico) ⁷⁵.

As implicações destes achados são várias. Apesar de reconhecidos há muito tempo em células em cultura, não se tem valorizado o possível papel de retrovírus endógenos no processo de tumorigênese, principalmente em tumores sólidos. Uma das possíveis explicações para este fato advém da impossibilidade, até a pouco tempo, de discriminar-se o quanto desta ativação transcricional era simplesmente artefactual, decorrente do estabelecimento de linhagens, ou se tinha de fato algum significado. Nos últimos três anos, um número crescente de grupos têm demonstrado que há montagem de resposta *in vivo* contra antígeno retrovirais endógenos ²⁴. Assim, há de fato transcrição ativa destes genes em tumores humanos. As implicações vacinais deste achado passam a ser de grande interesse, uma vez que se possam identificar estes retrovírus. De outro lado, estes achados levantam também um possível problema quanto à interpretação de um número bastante expressivo de trabalhos que usam estas linhagens com alta expressão de retrovírus endógenos (como B16-F10) em protocolos experimentais de imunização. Isto é, em quantos destes trabalhos os efeitos

observados não foram dirigidos contra as proteínas dos retrovírus endógenos, que como o antígeno reconhecido pelo anticorpo MM2-9B6 se expressa na superfície das células tumorais?

Um fato que merece destaque é a natureza do antígeno MM2-9B6, originalmente descrito como uma glicoproteína de membrana de massa molecular em torno de 80 kDa. Como mostramos aqui, as linhagens tumorigênicas Mgal3 e B16-F10 expressam o antígeno MM2-9B6 na superfície, mas a linhagem não tumorigênica melan-a, não. Contudo todas as três linhagens expressam os transcritos de MelArv. Como sugerido pelo grupo de Gorelik ²², que gerou o anticorpo cedido para este estudo é possível que o anticorpo reconheça uma forma mutada de emv-2, e esta mutação esteja associada ao desenvolvimento do melanoma. Alternativamente, é possível que o antígeno seja dependente de uma alteração pós-traducional que ocorra em emv-2, ainda a ser caracterizada. Esta forma de emv-2 poderia estar associada à tumorigênese ou atividade imunossupressora da proteína retroviral. Situação semelhante ocorre em tumores humanos com uma sialomucina, MUC1, que em tumores é diferencialmente glicosilada expondo seqüências potencialmente imunossupressoras nestas condições ⁷⁶.

Avaliamos se havia mutações nos éxons 5 a 8 de *TP53*. Estes éxons representam *hot spots* para mutações neste gene supressor de tumor, e correspondem à região codificadora de domínios ligantes de DNA deste fator transcricional. Como na maioria dos melanomas humanos e de camundongo, não há evidências de mutações nestes éxons de *TP53* em

Mgal3. Contudo, isto não significa que este supressor de tumor esteja de fato funcional nesta linhagem. De fato, quando avaliamos o segundo supressor de tumor, *CDKN2a*, mostramos que Mgal3 não expressa os transcritos deste gene, avaliados por RT-PCR de seqüências específicas do éxon 2 deste gene. *CDKN2a* é um gene complexo, uma vez que pelo menos dois produtos gênicos envolvidos na supressão de tumores são transcritos a partir deste gene. Inicialmente o gene foi identificado por codificar o supressor de tumor $p16^{INK4a}$, inibidor de CDK4 e CDK6, quinases dependentes de ciclina da transição das fases G_1 -S. As seqüências codificadoras deste gene, organizado em três éxons, estão distribuídas ao longo de 8 kb do locus. O segundo produto deste gene, $p19^{ARF}$ (ou $p14^{ARF}$, em humanos), é um regulador indireto da função de p53, por atuar como inibidor de Mdm-2 (HDM-2 em humanos; como descrito na introdução). $p19^{ARF}$ compartilha os éxons 2 e 3 de $p16^{INK4a}$, mas usa um quadro alternativo de leitura aberto neste gene. Ainda, o primeiro éxon de $p19^{ARF}$ localiza-se a montante do primeiro éxon de $p16^{INK4a}$, distante cerca de 20 kb deste éxon. Os elementos promotores destes dois transcritos do locus *CDKN2a* são assim independentes, apesar de seus transcritos compartilharem éxons. Mostramos aqui que Mgal3 não expressa o éxon 2 de *CDKN2a*, que é comum a $p16^{INK4a}$ e $p19^{ARF}$. Assim, não parece haver expressão destes dois supressores de tumor nesta linhagem. Mgal3 assim mostra um fenótipo bastante comum em células de melanoma, isto é, perda da expressão de *CDKN2a*. Com freqüência, pelo menos um dos alelos de *CDKN2a* é silenciado por metilação de seu promotor, o que é especialmente

importante no controle de transcrição de p16^{INK4a}, embora também interfira com a transcrição de p19^{ARF} 33,77,78.

Para avaliar se pelo menos um dos alelos de *CDKN2a* fora silenciado por metilação de seus promotores, tratamos as células com o 5-aza-2'-deoxicitidina. O tratamento levou à re-expressão de pelo menos um dos transcritos de *CDKN2a*, como avaliado por RT-PCR do éxon 2. Avaliação da reexpressão de seqüências do éxon 1 de cada um dos dois transcritos permitirá avaliar qual dos dois transcritos, se não os dois, é controlado por metilação do promotor. De qualquer maneira, pudemos caracterizar que alterações epigenéticas levam ao silenciamento de pelo menos um dos dois transcritos de *CDKN2a*, que não é sequer transcrito em Mgal3. Assim, as vias de transformação de Mgal3 cursam com a expressão *de novo* de seqüências retrovirais endógenas e perda de expressão de genes supressores de tumor; ilustrando o modelo de hipometilação de algumas regiões do genoma associadas à hipermetilação de regiões de promotor de um gene supressor de tumor relevante no desenvolvimento de melanomas.

O estabelecimento e caracterização desta linhagem de melanoma murino têm-nos permitido validar achados de um outro sistema de progressão tumoral de melanoma murino desenvolvido em parte pelo nosso grupo^{57,65}. Este sistema consiste da linhagem Melan-a e pelo menos duas linhagens tumorigênicas derivadas desta linhagem (Tm1 e Tm5). A análise sistemática entre proteínas e transcritos destas três linhagens por abordagens proteômica e *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE) permitiu identificar um número de possíveis marcadores de progressão, cuja

significado clínico está em avaliação no momento. Neste modelo, pudemos mostrar que pelo menos três genes tem sua expressão completamente perdida ao longo da progressão tumoral: *CDKN2a*, *LGALS3*, que codifica galectina-3, e, *MT2*, metalotioneína-2. Todos os três genes tem promotores em possíveis ilhas de dinucleotídeos CpG. De fato, Verônica Rodrigues Teixeira em nosso laboratório mostrou que o promotor de galectina-3 é de fato hipermetilado em melanomas murinos e que a desmetilação está associada a reexpressão do gene. Assim estes dados sugerem que galectina-3, antes associada à progressão tumoral de melanomas ⁷⁹, é de fato perdida neste modelo pareado de progressão. Nossos dados com *Mgal3* suportam independentemente a noção de que galectina-3 não é necessária para a manutenção do fenótipo transformado, e que sua expressão é controlada por hipermetilação de seu promotor, de maneira concomitante com o que ocorre com *CDKN2a*. Teixeira e colaboradores têm estendido estas análises para tumores humanos, tendo encontrado uma frequência significativa de silenciamento do gene de galectina-3 por hipermetilação de seu promotor (⁵⁷, Teixeira e Chammas, comunicação pessoal).

CONCLUSÕES

7 – CONCLUSÕES

Estabelecemos e caracterizamos a origem e as vias de transformação de uma nova linhagem de melanoma murino Mgal3, derivada de explantes de tecidos embrionários de camundongos C57bl/6.

Mgal3 é de origem melanocítica, como mostrado pela produção de pigmento, presença de melanossomos, reatividade aos anticorpos HMB45 e S100 (marcadores de melanócitos) e marcação positiva a Fontana Masson. Estas células mostraram-se capazes de gerar tumor em animais singenéticos além de se estabelecerem em sítios distantes (metástases linfonodais).

As vias de transformação da linhagem Mgal3 estão associadas a:

- (1) reativação de genes retrovirais presentes no genoma das células;
- (2) inativação por hipermetilação de genes supressores de tumor localizados no locus *CDKN2a*, o que levaria a perda do controle do ciclo celular exercido por estes genes;
- (3) silenciamento do gene *LGALS3*, que codifica galectina-3 por mecanismo epigenético, indicando que galectina-3 não é essencial para a manutenção do fenótipo transformado deste melanoma murino.

Enfim, desenvolvemos uma linhagem de melanoma murino independente dos modelos já existentes, sendo um instrumento útil para validação de expressão diferencial de genes associados à progressão de melanomas murinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70, 2000.
 2. Tanooka, H. X chromosome inactivation-mediated cellular mosaicism for the study of the monoclonal origin and recurrence of mouse tumors: a review. *Cytogenet.Genome Res.*, 104: 320-324, 2004.
 3. Jones, P. A. and Baylin, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat.Rev.Genet.*, 3: 415-428, 2002.
 4. Radisky, D., Hagios, C., and Bissell, M. J. Tumors are unique organs defined by abnormal signaling and context. *Semin.Cancer Biol.*, 11: 87-95, 2001.
 5. Wiseman, H. and Halliwell, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem.J.*, 313 (Pt 1): 17-29, 1996.
 6. zur, H. H. Viruses in human cancers. *Eur.J.Cancer*, 35: 1174-1181, 1999.
 7. Hahn, W. C. and Weinberg, R. A. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat.Rev.Cancer*, 2: 331-341, 2002.
 8. Todaro, G. J. and Green, H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells en culture and their development into established lines. *The Journal of Cell Biology*, 17: 299-313, 1963.
 9. Toussaint, O., Remacle, J., Dierick, J. F., Pascal, T., Fripiat, C., Zdanov, S., Magalhaes, J. P., Royer, V., and Chainiaux, F. From the Hayflick mosaic to the mosaics of ageing. Role of stress-induced premature
-

- senescence in human ageing. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 34: 1415-1429, 2002.
10. Hayflick, L. and MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp.Cell Res.*, 25: 585-621, 1961.
11. Finlay, C. Rat embryo fibroblast complementation assay with ras genes. *Methods Enzymol.*, 255: 389-394, 1995.
12. Malumbres, M. and Barbacid, M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat.Rev.Cancer*, 3: 459-465, 2003.
13. Knudson, A. G. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat.Rev.Cancer*, 1: 157-162, 2001.
14. Menendez, L., Benigno, B. B., and McDonald, J. F. L1 and HERV-W retrotransposons are hypomethylated in human ovarian carcinomas. *Mol.Cancer*, 3: 12, 2004.
15. Jonkers, J. and Berns, A. Retroviral insertional mutagenesis as a strategy to identify cancer genes. *Biochim.Biophys.Acta*, 1287: 29-57, 1996.
16. Lower, R. The pathogenic potential of endogenous retroviruses: facts and fantasies. *Trends Microbiol.*, 7: 350-356, 1999.
17. Weiss, R. A. Retroviruses and human cancer. *Semin.Cancer Biol.*, 3: 321-328, 1992.
18. Buscher, K., Trefzer, U., Hofmann, M., Sterry, W., Kurth, R., and Denner, J. Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer Res.*, 65: 4172-4180, 2005.
-

19. Mangeney, M., Pothlichet, J., Renard, M., Ducos, B., and Heidmann, T. Endogenous retrovirus expression is required for murine melanoma tumor growth in vivo. *Cancer Res.*, 65: 2588-2591, 2005.
 20. Leong, S. P., Muller, J., Yetter, R. A., Gorelik, E., Takami, T., and Hearing, V. J. Expression and modulation of a retrovirus-associated antigen by murine melanoma cells. *Cancer Res.*, 48: 4954-4958, 1988.
 21. Li, M., Muller, J., Xu, F., Hearing, V. J., and Gorelik, E. Inhibition of melanoma-associated antigen expression and ecotropic retrovirus production in B16BL6 melanoma cells transfected with major histocompatibility complex class I genes. *Cancer Res.*, 56: 4464-4474, 1996.
 22. Li, M., Xu, F., Muller, J., Hearing, V. J., and Gorelik, E. Ecotropic C-type retrovirus of B16 melanoma and malignant transformation of normal melanocytes. *Int.J.Cancer*, 76: 430-436, 1998.
 23. Muster, T., Waltenberger, A., Grassauer, A., Hirschl, S., Caucig, P., Romirer, I., Fodinger, D., Seppel, H., Schanab, O., Magin-Lachmann, C., Lower, R., Jansen, B., Pehamberger, H., and Wolff, K. An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells. *Cancer Res.*, 63: 8735-8741, 2003.
 24. Kershaw, M. H., Hsu, C., Mondesire, W., Parker, L. L., Wang, G., Overwijk, W. W., Lapointe, R., Yang, J. C., Wang, R. F., Restifo, N. P., and Hwu, P. Immunization against endogenous retroviral tumor-associated antigens. *Cancer Res.*, 61: 7920-7924, 2001.
 25. Schiavetti, F., Thonnard, J., Colau, D., Boon, T., and Coulie, P. G. A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen
-

- recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res.*, 62: 5510-5516, 2002.
26. Chudnovsky, Y., Khavari, P. A., and Adams, A. E. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J.Clin.Invest*, 115: 813-824, 2005.
27. Clark, W. H. Tumour progression and the nature of cancer. *Br.J Cancer*, 64: 631-644, 1991.
28. Hsu, M. Y., Meier, F., and Herlyn, M. Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation*, 70: 522-536, 2002.
29. Melnikova, V. O., Bolshakov, S. V., Walker, C., and Ananthaswamy, H. N. Genomic alterations in spontaneous and carcinogen-induced murine melanoma cell lines. *Oncogene*, 23: 2347-2356, 2004.
30. Reifemberger, J., Knobbe, C. B., Sterzinger, A. A., Blaschke, B., Schulte, K. W., Ruzicka, T., and Reifemberger, G. Frequent alterations of Ras signaling pathway genes in sporadic malignant melanomas. *Int.J.Cancer*, 109: 377-384, 2004.
31. Czajkowski, R., Drewa, T., Wozniak, A., and Krzyzyska-Malinowska, E. Cell cycle in sporadic melanoma. *Int.J.Dermatol.*, 41: 550-556, 2002.
32. Talve, L., Sauroja, I., Collan, Y., Punnonen, K., and Ekfors, T. Loss of expression of the p16INK4/CDKN2 gene in cutaneous malignant melanoma correlates with tumor cell proliferation and invasive stage. *Int.J.Cancer*, 74: 255-259, 1997.
33. Hayward, N. K. Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene*, 22: 3053-3062, 2003.
-

34. Rocco, J. W. and Sidransky, D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp.Cell Res.*, 264: 42-55, 2001.
 35. van der Velden, P. A., Metzelaar-Blok, J. A., Bergman, W., Monique, H., Hurks, H., Frants, R. R., Gruis, N. A., and Jager, M. J. Promoter hypermethylation: a common cause of reduced p16(INK4a) expression in uveal melanoma. *Cancer Res.*, 61: 5303-5306, 2001.
 36. Walker, G. J. and Hayward, N. K. Pathways to melanoma development: lessons from the mouse. *J.Invest Dermatol.*, 119: 783-792, 2002.
 37. Curtin, J. A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H. N., Busam, K. J., Kutzner, H., Cho, K. H., Aiba, S., Brocker, E. B., LeBoit, P. E., Pinkel, D., and Bastian, B. C. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N.Engl.J.Med.*, 353: 2135-2147, 2005.
 38. Yang, F. C., Merlino, G., and Chin, L. Genetic dissection of melanoma pathways in the mouse. *Semin.Cancer Biol.*, 11: 261-268, 2001.
 39. Stahl, J. M., Sharma, A., Cheung, M., Zimmerman, M., Cheng, J. Q., Bosenberg, M. W., Kester, M., Sandirasegarane, L., and Robertson, G. P. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res.*, 64: 7002-7010, 2004.
 40. Meltzer, P. S. Genetic diversity in melanoma. *N.Engl.J.Med.*, 353: 2104-2107, 2005.
 41. Clark, S. J. and Melki, J. DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene*, 21: 5380-5387, 2002.
 42. Jones, P. A. DNA methylation and cancer. *Oncogene*, 21: 5358-5360, 2002.
-

43. Jones, P. A. and Baylin, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat.Rev.Genet.*, 3: 415-428, 2002.
 44. Laird, P. W. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat.Rev.Cancer*, 3: 253-266, 2003.
 45. Schneider-Stock, R., Diab-Assef, M., Rohrbeck, A., Foltzer-Jourdainne, C., Boltze, C., Hartig, R., Schonfeld, P., Roessner, A., and Gali-Muhtasib, H. 5-Aza-cytidine is a potent inhibitor of DNA methyltransferase 3a and induces apoptosis in HCT-116 colon cancer cells via Gadd45- and p53-dependent mechanisms. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 312: 525-536, 2005.
 46. Prokhortchouk, E. and Hendrich, B. Methyl-CpG binding proteins and cancer: are MeCpGs more important than MBDs? *Oncogene*, 21: 5394-5399, 2002.
 47. Karpf, A. R. and Jones, D. A. Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer. *Oncogene*, 21: 5496-5503, 2002.
 48. Robertson, K. D. DNA methylation and human disease. *Nat.Rev.Genet.*, 6: 597-610, 2005.
 49. Yoder, J. A., Walsh, C. P., and Bestor, T. H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.*, 13: 335-340, 1997.
 50. Ehrlich, M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, 21: 5400-5413, 2002.
 51. Marquez, V. E., Kelley, J. A., Agbaria, R., Ben Kasus, T., Cheng, J. C., Yoo, C. B., and Jones, P. A. Zebularine: a unique molecule for an
-

epigenetically based strategy in cancer chemotherapy.

Ann.N.Y.Acad.Sci., 1058: 246-254, 2005.

52. Lemaire, M., Momparler, L. F., Bernstein, M. L., Marquez, V. E., and Momparler, R. L. Enhancement of antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine by zebularine on L1210 leukemia. *Anticancer Drugs*, 16: 301-308, 2005.
 53. Zhou, L., Cheng, X., Connolly, B. A., Dickman, M. J., Hurd, P. J., and Hornby, D. P. Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. *J.Mol.Biol.*, 321: 591-599, 2002.
 54. Laird, P. W. Cancer epigenetics. *Hum.Mol.Genet.*, 14 Spec No 1: R65-R76, 2005.
 55. Curradi, M., Izzo, A., Badaracco, G., and Landsberger, N. Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation. *Mol.Cell Biol.*, 22: 3157-3173, 2002.
 56. Liu, L., Shack, S., Stetler-Stevenson, W. G., Hudgins, W. R., and Samid, D. Differentiation of cultured human melanoma cells induced by the aromatic fatty acids phenylacetate and phenylbutyrate. *J.Invest Dermatol.*, 103: 335-340, 1994.
 57. Souza, G. A., Godoy, L. M. F., Teixeira, V. R. T., Otake, A. H., Sabino, A., Rosa, J. C., Dinarte, A. R., Pinheiro, D. G., Silva Jr., W. A., Eberlin, M. N, Chammas, R., and Greene, L. J. Proteomic and SAGE profiling of murine melanoma progression indicates the reduction of proteins responsible for ROS degradation. *Proteomics* . 2006.
-

58. Tam, A. S., Foley, J. F., Devereux, T. R., Maronpot, R. R., and Massey, T. E. High frequency and heterogeneous distribution of p53 mutations in aflatoxin B1-induced mouse lung tumors. *Cancer Res.*, 59: 3634-3640, 1999.
 59. Peterson, G. L. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal.Biochem.*, 100: 201-220, 1979.
 60. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
 61. Hsu, D. K., Yang, R. Y., Pan, Z., Yu, L., Salomon, D. R., Fung-Leung, W. P., and Liu, F. T. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am.J.Pathol.*, 156: 1073-1083, 2000.
 62. Bennett, D. C., Cooper, P. J., and Hart, I. R. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Int.J.Cancer*, 39: 414-418, 1987.
 63. Aberdam, E., Bertolotto, C., Sviderskaya, E. V., de, T., V, Hemesath, T. J., Fisher, D. E., Bennett, D. C., Ortonne, J. P., and Ballotti, R. Involvement of microphthalmia in the inhibition of melanocyte lineage differentiation and of melanogenesis by agouti signal protein. *J.Biol.Chem.*, 273: 19560-19565, 1998.
 64. Gorelik, E., Jay, G., Kim, M., Hearing, V. J., DeLeo, A., and McCoy, J. P., Jr. Effects of H-2Kb gene on expression of melanoma-associated antigen and lectin-binding sites on BL6 melanoma cells. *Cancer Res.*, 51: 5212-5218, 1991.
-

65. Correa, M., Machado, J., Jr., Carneiro, C. R., Bosco, P. J., Bader, M., Travassos, L. R., Chammas, R., and Jasiulionis, M. G. Transient inflammatory response induced by apoptotic cells is an important mediator of melanoma cell engraftment and growth. *Int.J.Cancer*, 2004.
 66. Park, D. J., Nakamura, H., Chumakov, A. M., Said, J. W., Miller, C. W., Chen, D. L., and Koeffler, H. P. Transactivational and DNA binding abilities of endogenous p53 in p53 mutant cell lines. *Oncogene*, 9: 1899-1906, 1994.
 67. Prives, C. and Hall, P. A. The p53 pathway. *J.Pathol.*, 187: 112-126, 1999.
 68. van Oijen, M. G. and Slootweg, P. J. Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53. *Clin.Cancer Res.*, 6: 2138-2145, 2000.
 69. Smith, S. H., Goldschmidt, M. H., and McManus, P. M. A comparative review of melanocytic neoplasms. *Vet.Pathol.*, 39: 651-678, 2002.
 70. Freshey, R. I. Primary Culture. *Culture of Animal Cells, a manual of basic technique*, 4th ed, pp. 149-175. New York: Wiley-Liss, 2005.
 71. Hsu, M. Y., Elder, D., and Herlyn, M. Melanoma: The Wistar Melanoma (MW) Cell Lines. *In* J. R. W. Masters and B. Palsson (eds.), *Human Cell Culture*, 1 ed, pp. 259-274. London: Kluwer Academic Publishers, 1999.
 72. Rangarajan, A., Hong, S. J., Gifford, A., and Weinberg, R. A. Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell*, 6: 171-183, 2004.
-

73. Khan, A. S., Muller, J., and Sears, J. F. Early detection of endogenous retroviruses in chemically induced mouse cells. *Virus Res.*, 79: 39-45, 2001.
 74. Li, M., Huang, X., Zhu, Z., and Gorelik, E. Sequence and insertion sites of murine melanoma-associated retrovirus. *J.Virol.*, 73: 9178-9186, 1999.
 75. Mangeney, M., Pothlichet, J., Renard, M., Ducos, B., and Heidmann, T. Endogenous retrovirus expression is required for murine melanoma tumor growth in vivo. *Cancer Res.*, 65: 2588-2591, 2005.
 76. Finn, O. J., Jerome, K. R., Henderson, R. A., Pecher, G., Domenech, N., Magarian-Blander, J., and Barratt-Boyes, S. M. MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunological Reviews* 145, 61-89. 1995.
 77. Jones, P. A. Epigenetics in carcinogenesis and cancer prevention. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 983: 213-219, 2003.
 78. Hoek, K., Rimm, D. L., Williams, K. R., Zhao, H., Ariyan, S., Lin, A., Kluger, H. M., Berger, A. J., Cheng, E., Trombetta, E. S., Wu, T., Niinobe, M., Yoshikawa, K., Hannigan, G. E., and Halaban, R. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res.*, 64: 5270-5282, 2004.
 79. Lotan, R. and Raz, A. Lectins in Cancer Cells. *Ann.N.York Acad.Sci.*, 551: 385-398, 1988.
-

ANEXO I

Éxon 5

C57bl/6 GTACTCTCCTCCCCCTCAATAAGCTATTCTGCCAGCTGGCGAAGACGTGCCCTGTGCAGTTG
Mgal3 GTACTCTCCTCCCCCTCAATAAGCTATTCTGCCAGCTGGCGAAGACGTGCCCTGTGCAGTTG

C57bl/6 TGGGTCAGCGCCACACCTCCAGCTGGGAGCCGTGTCCGCGCCATGGCCATCTACAAGAAG
Mgal3 TGGGTCAGCGCCACACCTCCAGCTGGGAGCCGTGTCCGCGCCATGGCCATCTACAAGAAG

C57bl/6 TCACAGCACATGACGGAGGTCGTGAGACGCTGCCCCCACCATGAGCGCTGCTCCGATGGT
Mgal3 TCACAGCACATGACGGAGGTCGTGAGACGCTGCCCCCACCATGAGCGCTGCTCCGATGGT

C57bl/6 GATGG
Mgal3 GATGG

Éxon 6

C57bl/6 CCTGGCTCCTCCCCAGCATCTTATCCGGGTGGAAGGAAATTTGTATCCCGAGTATCTGGAAG
Mgal3 CCTGGCTCCTCCCCAGCATCTTATCCGGGTGGAAGGAAATTTGTATCCCGAGTATCTGGAAG

C57bl/6 ACAGGCAGACTTTTCGCCACAGCGTGGTGGTACCTTATGAGCCACCCGAGG
Mgal3 ACAGGCAGACTTTTCGCCACAGCGTGGTGGTACCTTATGAGCCACCCGAGG

Éxon 7

C57bl/6 CCGGCTCTGAGTATACCACCATCCACTACAAGTACATGTGTAATAGCTCCTGCATGGGGGG
Mgal3 CCGGCTCTGAGTATACCACCATCCACTACAAGTACATGTGTAATAGCTCCTGCATGGGGGG

C57bl/6 CATGAACCGCCGACCTATCCTTACCATCATCACACTGGAAGACTCCAG
Mgal3 CATGAACCGCCGACCTATCCTTACCATCATCACACTGGAAGACTCCAG

Éxon 8

C57bl/6 TGGGAACCTTCTGGGACGGGACAGCTTTGAGGTTTCGTGTTTGTGCCTGCCCTGGGAGAGAC
Mgal3 TGGGAACCTTCTGGGACGGGACAGCTTTGAGGTTTCGTGTTTGTGCCTGCCCTGGGAGAGAC

C57bl/6 CGCCGTACAGAAGAAGAAAATTTCCGCAAAAAGGAAGTCCTTTGCCCTGAACTGCCCCCAG
Mgal3 CGCCGTACAGAAGAAGAAAATTTCCGCAAAAAGGAAGTCCTTTGCCCTGAACTGCCCCCAG

C57bl/6 GGAGCGCAAAGAGAG
Mgal3 GGAGCGCAAAGAGAG

Anexo I. Sequenciamento direto dos éxons 5 a 8 do gene *TP53* da linhagem Mgal3 não apresentou nenhuma alteração na região codificadora, neste exemplo à seqüência foi comparado com genoma do camundongo C57bl/6.

APÉNDICE