

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:
PNEUMOLOGIA

**MODELO EXPERIMENTAL DE METÁSTASES
PULMONARES DE MELANOMA MURINO B16-F10 EM
CAMUNDONGOS C57BL/6N COM CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS DE PULMÃO DE CAMUNDONGO
C57BL/6N TRANSGÊNICO**

GERSON JUNQUEIRA JÚNIOR

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO CARLOS PROLLA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Pneumologia
para obtenção do título de Doutor em Medicina

Porto Alegre - 2005

J957m Junqueira Júnior, Gerson

Modelo experimental de metástases de melanoma murino B16-F10 em camundongos C57BL/6N com células tronco mesenquimais de pulmão de camundongo C57BL/6N transgênico / Gerson Junqueira Júnior; orient. João Carlos Prolla. - Porto Alegre: UFRGS, 2005.

56 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Pneumologia.

1. Melanoma. 2. Neoplasia pulmonar. 3. Bioensaios. 4. Animais de laboratório. I. Junqueira Júnior, Gerson. II. Título.

C.D.U. 616.2-006.81

Ficha catalográfica elaborada na Biblioteca do Complexo Hospitalar Santa Casa pela bibliotecária Sandra G. Feldmann - CRB 10/789.

*Malignant melanoma writes its message in the skin
with its own ink and it is there for all us to see.
Some see but do not comprehend.*

Neville Davis

À minha querida esposa *Jaqueline*,
que com amor e compreensão soube
me incentivar durante esta jornada.

Aos meus filhos *Laura e Gabriel*,
fonte inesgotável de alegria,
pela ternura e companheirismo constante;

À minha mãe *Corina*,
exemplo de dedicação e amor
ao longo da minha formação.

AGRADECIMENTOS

Ao final desta tese, não pude deixar de lembrar do tempo e esforço empregados durante todo este período. Foram quase seis anos de intensa atividade intelectual e física. Agradeço, neste momento, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta pesquisa e, de forma especial:

* ao Prof. Dr. João Carlos Prolla, pelas sugestões e orientação durante a execução deste trabalho;

* ao Prof. Dr. José da Silva Moreira, pelo incentivo e tolerância constantes;

* à Prof^ª Dr^ª Lúcia Maria Kliemann, pelas sugestões e dedicação durante a avaliação histológica, bem como fraternal amizade;

* ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (ILPC), em especial à Prof^ª Dr^ª Célia Regina Whitaker Carneiro, pela cessão das células para cultura e dos animais de experimentação;

* ao Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela utilização das dependências do Laboratório de Imunogenética e, em especial, ao biólogo Pedro Cesar Chagastelles, pela curiosidade científica e dedicação demonstradas com as culturas celulares;

* à Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), pela utilização das dependências da Coordenação de Produção e Experimentação Animal e, em especial, à médica-veterinária Luisa Maria Gomes de Macedo Braga, incansável nos cuidados com os animais de experimentação;

* ao colega e amigo Helio Soares Pilla, pelo auxílio na documentação fotográfica dos resultados, revisão bibliográfica e padronização técnica do texto;

* ao colega e amigo Rodrigo Pozza Pinto, pelas orientações de cunho estatístico;

* ao colega Antonio Carlos Timm, pelo auxílio na versão do Resumo para o idioma inglês;

* à bibliotecária Sandra G. Feldmann, da biblioteca do Complexo Hospitalar Santa Casa, pela elaboração da ficha catalográfica;

* ao secretário do Curso de Pós-Graduação em Medicina: Pneumologia, Marco Aurélio da Silva, pelo interesse e atenção demonstrados;

* ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro;

* à minha prima Belkis Giannetti Miceli, pelo apoio logístico em São Paulo;

* e aos meus amigos e companheiros do cotidiano Marília Bittencourt Espíndola, Márcio Fernando Boff, Ronaldo Oliveira da Silva e Sérgio Luís Thiesen Hilgert, que me deram o respaldo diário necessário para que eu me dedicasse a esta pesquisa.

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA	II
PENSAMENTO	III
DEDICATÓRIAS	IV
AGRADECIMENTOS	V
SUMÁRIO	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE QUADROS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMO	XIII
SUMMARY	XV
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	8
3. MATERIAL E MÉTODO	9
3.1. AMOSTRA	9
3.2. PROCEDIMENTOS	10
3.2.1. Cultura Celular	10
3.2.2. Inoculação	15
3.2.3. Seguimento	16
3.2.4. Avaliação Histológica	16
3.2.5. Análise Estatística	17
4. RESULTADOS	18
4.1. Avaliação Histológica	18
4.2. Análise Estatística	23
5. DISCUSSÃO	24

6. CONCLUSÃO	30
7. REFERÊNCIAS	31
NORMAS ADOTADAS	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Camundongo C57BL/6N (página 10).

Figura 2 - Fotomicrografia (100 x) mostrando as células tronco mesenquimais de pulmão de camundongo C57BL/6N transgênico (página 15).

Figura 3 - Detalhe da técnica de inoculação intravenosa das células de melanoma murino B16-F10 na cauda do camundongo C57BL/6N (página 16).

Figura 4 - Toracolaparotomia no camundongo C57BL/6N para retirada completa do pulmão (página 17).

Figura 5 - Fotomicrografia (50x) mostrando o pulmão do camundongo C57BL/6N com metástases de melanoma murino B16-F10 (página 20).

Figura 6 - Fotomicrografia (100x) mostrando o pulmão do camundongo C57BL/6N com metástases de melanoma murino B16-F10 (página 20).

Figura 7 - Fotomicrografia (100x) mostrando o pulmão do camundongo C57BL/6N com micrometástase de melanoma murino B16-F10 (página 21).

Figura 8 - Fotomicrografia (50x) mostrando o pulmão do camundongo C57BL/6N com metástases de melanoma murino B16-F10 (página 21).

Figura 9 - Fotomicrografia (100x) mostrando o pulmão do camundongo C57BL/6N com metástases de melanoma murino B16-F10 (página 22).

Figura 10 - Fotomicrografia (400x) mostrando o pulmão do camundongo C57BL/6N com metástases de melanoma murino B16-F10 (página 22).

Figura 11 - Detalhe da técnica de inoculação subcutânea das células de melanoma murino B16-F10 no dorso do camundongo C57BL/6N (página 24).

Figura 12 - Camundongo C57BL/6N, após a morte, com o tumor subcutâneo desenvolvido no dorso (página 25).

Figura 13 - Detalhe do tumor mostrando sua localização subcutânea (página 25).

Figura 14 - Tumor completamente excisado mostrando sua relação com o tamanho do animal de experimentação (página 26).

LISTA DE QUADROS

Quadro I - Resultados observados nos camundongos C57BL/6N do grupo controle (página 18).

Quadro II - Resultados observados nos camundongos C57BL/6N do grupo experimental (página 19).

LISTA DE ABREVIATURAS

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DMSO: dimetil sulfóxido

EDTA: ácido etilenodiamino tetracíclico dissódico

FEPPS: Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

HE: hematoxilina-eosina

ILPC: Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer

INCa: Instituto Nacional do Câncer

POPs: procedimentos operacionais padrão

rpm: rotações por minuto

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

RESUMO

O melanoma cutâneo representa 1 a 3% de todas as neoplasias malignas. Sua incidência vem aumentando em várias partes do mundo, inclusive no Brasil. Em 2005, conforme dados obtidos a partir dos Registros de Base Populacional de algumas grandes capitais brasileiras, incluindo Porto Alegre, a incidência de melanoma cutâneo chegou a 5,2 por 100 mil habitantes.

Sua forma metastática é, na maioria das vezes, incurável, com taxas de sobrevida em 5 anos menores que 5% e de sobrevida mediana em torno de 4 meses. O órgão mais freqüentemente acometido pela disseminação metastática do melanoma cutâneo é o pulmão (18-36%).

O arsenal terapêutico disponível para o tratamento da doença avançada traz resultados insatisfatórios, estimulando a realização de estudos experimentais com novas drogas. Um modelo experimental com bastante aplicabilidade para esses estudos é o de metástases pulmonares de melanoma cutâneo.

A linhagem celular selecionada para o experimento foi a variante F10 do melanoma murino B16. Seu cultivo em laboratório apresenta rápido crescimento e é facilmente transplantada em camundongos C57BL/6N, com alta capacidade de disseminação metastática.

Como as células tronco mesenquimais possuem efeito imunomodulador, questiona-se se suas propriedades imunossupressoras podem ter como para-efeito o favorecimento do crescimento tumoral.

O objetivo do presente estudo é observar a presença de metástases pulmonares de melanoma murino B16-F10 desenvolvidas experimentalmente em camundongos C57BL/6N, com ou sem a inclusão

de células tronco mesenquimais de pulmão de camundongo C57BL/6N transgênico.

Para tanto, dividiram-se 31 camundongos da cepa C57BL/6N em 2 grupos, denominados grupo controle - 17 animais - e grupo experimental - 14 animais.

Os animais do grupo controle receberam uma dose individual de 3×10^5 células de melanoma murino B16-F10. Já os camundongos do grupo experimental receberam, além da dose de células de melanoma murino, uma dose individual de 10^5 células tronco mesenquimais de pulmão de camundongo C57BL/6N transgênico.

Os camundongos foram inoculados no primeiro dia do experimento (dia 1) por via intravenosa e acompanhados até a sua morte (dia 28). Após, era feita a excisão completa do pulmão para avaliação histológica da presença ou não de metástases nesse órgão.

A comparação entre os dois grupos não mostrou diferença estatisticamente significativa ($\alpha = 0,05$).

SUMMARY

Cutaneous melanoma has an incidence rate of 1 to 3% among all malignant neoplasms. In Brazil and several countries its incidence rate has been increasing. In 2005, according to data from INCa of some Brazilian capital cities, including Porto Alegre, the incidence of cutaneous melanoma reached 5,2 per 100,000 inhabitants.

Metastatic melanoma is, mostly, not curable, with 5-year survival rate lower than 5% and mean survival around 4 months. The most frequently involved viscus in metastatic dissemination is the lung (18-36%).

The therapeutical modalities at disposal for advanced disease treatment have unsatisfactory results, thus stimulating experimental trials with new drugs. A most convenient experimental model to that research is that of pulmonary metastases of cutaneous melanoma.

The chosen cell line was the B16-F10 murine melanoma. Its culture in laboratory presents rapid growth and it is easily transplanted to C57BL/6N mice, achieving high rates of metastatic dissemination.

The mesenchymal stem cells have immunomodulatory properties. It is debated if its immunosuppressive properties may, as side-effect, favor tumor growth.

The objective of this research is to evaluate the development of pulmonary metastases of B16-F10 murine melanoma experimentally introduced in C57BL/6N mice, with and without the use of lung mesenchymal stem cells from transgenic C57BL/6N mice.

For that purpose, 31 C57BL/6N strain mice were separated in 2 groups, designated control group - 17 animals - and experimental group - 14 animals.

The control group received an individual dose of 3×10^5 cells of B16-F10 murine melanoma. On the other hand, mice in the experimental group received, besides the murine melanoma cells, an individual dose of 10^5 lung mesenchymal stem cells from transgenic C57BL/6N mice.

The mice were inoculated on the first day of the experiment (day 1) through intravenous route and observed until their death (day 28). After that, complete excision of the lung was performed to histologically evaluate the presence of metastases in that organ.

The comparison between the two groups showed no statistically significant difference ($\alpha = 0,05$).

1. INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo é uma lesão maligna que tem origem no melanoblasto da pele, representando 1 a 3% de todas as neoplasias malignas. O tumor desenvolve-se em qualquer área da pele e, excepcionalmente, pode atingir mucosas, leptomeninges e o globo ocular. Ocorre em igual proporção entre homens e mulheres e acomete principalmente pessoas de pele clara. Embora o pico de incidência ocorra entre os 40 e 60 anos, a lesão tem sido observada em qualquer grupo etário, sendo, porém, bastante rara em crianças (KOH, 1991; EVANS e MANSON, 1994; BERWICK, 1998; WAGNER, GORDON, CHUANG, COLEMAN, 2000).

A etiologia do melanoma cutâneo permanece obscura, porém vários fatores ambientais e do hospedeiro têm sido associados ao desenvolvimento dessa neoplasia. Dentre esses fatores, exposição solar excessiva, queimaduras solares, pele clara, cabelos loiros ou ruivos, grande quantidade de sardas nos ombros e dorso, história familiar de melanoma e presença de ceratose actínica parecem ser os mais importantes (KOH, 1991; EVANS e MANSON, 1994; WAGNER e col, 2000; GANDINI, SERA, CATTARUZZA, PASQUINI, ZANETTI, MASINI, BOYLE e MELCHI, 2005; MIHM, 2005).

Estudos sugerem ser a luz solar o fator ambiental mais importante na gênese do melanoma cutâneo. O mecanismo preciso de sua atuação não é de todo conhecido. Tem-se proposto que os raios ultravioletas estimulam o potencial mitótico dos melanócitos (KOH, KLIGLER e LEW, 1990; KOPE, KRIPKE e STERN, 1990; LONGSTRETH, 1998; BAKOS, WAGNER, BAKOS, LEITE, SPERHACKE, DZEKANIAK e GLEISNER, 2002; WAGNER e col, 2000; DE FABO, 2005).

A incidência do melanoma cutâneo vem aumentando em várias partes do mundo. Na Escócia, o aumento da incidência nos últimos 25 anos foi de 4 vezes nos homens e de 2,4 vezes nas mulheres (MacKIE, 2005). Na Noruega e Suécia, a incidência anual triplicou nos últimos 45 anos. Na Austrália e Nova Zelândia, as taxas de incidência também cresceram e são os países com as maiores incidências mundiais atualmente. Nos Estados Unidos, a incidência triplicou nos últimos 25 anos, estimando-se em 59.580 novos casos em 2005, com 7.770 mortes. (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2005; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2005; DE FABO, 2005). A explicação para essa elevação na incidência estaria no aumento da exposição à radiação solar nas raças de pele clara (MORTON, 1990; DE FABO, 2005; GARBE, 2005; MIHM, 2005).

No Brasil, conforme dados obtidos a partir dos Registros de Base Populacional de São Paulo, Porto Alegre, Recife e Fortaleza, a incidência de melanoma cutâneo variou entre 1,3 e 5,2 por 100 mil habitantes no período de 1978 a 2005. (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1992; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2005; LANDMAN, NEVES, BRESCHTBÜHL, SCRAMIM, ENOKIHARA, SANTOS, MAIA, e BELFORT, 2005).

A população do Rio Grande do Sul apresenta um percentual maior de indivíduos de cor branca, etnicamente classificados como caucasianos, do que o restante do Brasil (83,6% x 53,7%). É grande também o número de trabalhadores que exerce suas atividades em zonas rurais - agricultura, pecuária, pesca - com exposição intensa aos raios solares (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2000). Esses fatores certamente concorrem para que, em nosso meio, também se observe um aumento da incidência do melanoma cutâneo, tornando-se cada vez mais importante sua prevenção e tratamento (VENEGAS, FLORES,

BLACHER, DAUDT e CERSKI, 1992; MIGLIAVACCA, GUIMARÃES e HOFMANN, 1993; BAKOS e col, 2002).

Em Porto Alegre, segundo dados da Secretaria Estadual da Saúde e do Meio Ambiente e do Instituto Nacional do Câncer (INCa), as taxas de incidência variaram de 1,43/100.000 e 1,42/100.000 em 1991, para os sexos masculino e feminino respectivamente, para 8,33/100.000 e 10,19/100.000 em 2006 (estimativa), uma das mais altas em todo o país (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2005).

Não só a incidência como também a morbidade e a mortalidade do melanoma cutâneo vêm aumentando. Os sítios mais freqüentes de disseminação metastática do melanoma cutâneo são a pele, o subcutâneo e os linfonodos (42-59%). Em segundo lugar, como principal víscera acometida, está o pulmão (18-36%) (MEYERS e BALCH, 1998). Sua forma metastática é, na maioria das vezes, incurável, com taxas de sobrevida em 5 anos menores que 5% e de sobrevida mediana em torno de 4 meses (LEE, TOMSU, Von ESCHEN, 2000; MANOLA, ATKINS, IBRAHIM, KIRKWOOD, 2000).

A cirurgia está indicada no tratamento das metástases sistêmicas quando estas forem únicas ou confinadas a um único sítio metastático e tecnicamente passíveis de ressecção (CASCINELLI, BELLI, VAGLINI e LOVO, 1991; BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1992; EVANS e MANSON, 1994; BALCH, 1998; OLLILA, HSUEH, STERN, MORTON, 1999; WAGNER e col, 2000; GARBE, 2005).

A quimioterapia sistêmica também pode ser empregada, porém não causa aumento significativo na sobrevida; 20 a 25% dos pacientes tratados terão uma resposta parcial e apenas 1% terá resposta efetiva e durável. A dacarbazina, utilizada de forma isolada, é a única droga citotóxica que tem demonstrado taxas consistentes de resposta que variam entre 15 e 25%.

Entretanto essa resposta em geral é parcial, de poucos meses e principalmente em metástases de tecidos moles. Outras drogas têm sido estudadas, como as nitrosuréias, a cisplatina e o taxol, porém nenhuma demonstrou superioridade em relação à dacarbazina. Vários estudos cooperativos, combinando múltiplas drogas, têm demonstrado aumento na toxicidade sem elevação significativa da resposta (LAKHANJ, SELBY e BLISS, 1990; KOH, 1991; BUZAID e MURREN, 1992; GUERRY e SCHUCHTER, 1992; EVANS e MANSON, 1994; WAGNER e col, 2000).

O papel da radioterapia no tratamento do melanoma cutâneo é limitado e tem relação direta com a dose empregada e com a extensão e localização do tumor. Sua maior indicação é para o tratamento paliativo de metástases sintomáticas em ossos, cérebro e raque (ANG, GEARA, BYERS e PETERS, 1998; SHEN, WANCK, MORTON, 2000).

A imunoterapia é outra alternativa para o melanoma cutâneo. Resposta objetiva em pacientes com doença metastática foi observada com a utilização de modificadores da resposta biológica, como o α -interferon e a interleucina-2, isolados ou associados a fármacos citotóxicos, porém com taxas não superiores a 20%. Outras modalidades terapêuticas estão sendo investigadas, porém sem resultados promissores (BUZAID e MURREN, 1992; RICHARDS, GILEWSKI, RAMMING, MITCHEL, DOANE e VOGELZANG, 1992; STEFFENS e LIVINGSTON, 1992; EVANS e MANSON, 1994; FOPPOLI, CITTERIO, POLASTRI e GUERRIERI, 1994; ATZPODIEN, HÄNNINEN, KIRCHNER, FRANZKE, KÖRFER, VOLKENANDT, DUENSING, SCHOMBURG, CHAITCHIK e POLIWODA, 1995; ATKINS, KUMKEL, SZNOL, ROSENBERG, 2000; WAGNER e col, 2000; KIRKWOOD, IBRAHIM, LAWSON, ATKINS, AGARWALA, COLLINS, MASCARI, MORRISSEY, CHAPMAN, 2001).

Os resultados insatisfatórios obtidos com as modalidades de tratamento do melanoma cutâneo metastático têm estimulado a realização de estudos experimentais com novos métodos. A busca de drogas alternativas ou complementares para o tratamento do melanoma cutâneo, principalmente nos estágios avançados, tem ocasionado um grande número de publicações na área (GARBE, 2005).

Estudos *in vitro* e *in vivo* são de fundamental importância para o melhor entendimento do comportamento biológico dessa neoplasia e para o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos. A cultura de células e a utilização de animais de experimentação são modelos experimentais vantajosos para testar um grande número de drogas e selecionar compostos específicos contra esse tumor (BEATTIE, TISSOT e AMOSS, 1988; KREUTZ, 1992).

Existem diferentes modelos experimentais de melanoma, os quais envolvem variadas linhagens celulares e distintos animais de experimentação, apresentando desfechos biológicos variados.

A linhagem celular selecionada para o presente experimento foi a variante F10 do melanoma murino B16 proveniente do ILPC. A técnica de cultura celular adotada para o cultivo das células foi adaptada do ILPC (FRESHNEY, 1988) e já empregada pelo autor anteriormente com pequenas modificações (JUNQUEIRA Jr., 1996). Seu cultivo em laboratório apresenta rápido crescimento e é facilmente transplantada *in vivo*, com alta capacidade de disseminação metastática.

O camundongo C57BL/6N, animal de experimentação utilizado neste trabalho, tem pelagem negra, peso médio de 25g e vive 2 anos em média. O acasalamento pode ser feito entre irmãos logo após o desmame (isogênicos) ou a partir de 54 a 60 dias de vida, quando o roedor atinge a idade adulta. A média de parição por fêmea é de 5 filhotes, com período gestacional de 21 dias. É um animal dócil e de fácil manipulação,

possibilitando estudos terapêuticos variados (UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 1982; ANDERSEN, D'ALMEIDA, KO, KAWAKAMI, MARTINS, MAGALHÃES e TUFIK, 2004). O autor pretendeu estudar e desenvolver um modelo experimental de melanoma com metástases pulmonares.

Em relação às células tronco mesenquimais, já foi demonstrado seu efeito imunomodulador. Recentemente, DI NICOLA, CARLO-STELLA, MAGNI, MILANESI, LONGONI, MATTEUCCI, GRISANTI e GIANNI (2002) demonstraram que células tronco mesenquimais apresentam propriedades imunossupressoras na proliferação de linfócitos T induzida por células alogênicas. Esse fenômeno parece ser mediado por produção de citocinas, em particular o fator de crescimento de hepatócitos e fator de crescimento transformante- β 1, e não pela indução de apoptose.

Em complemento aos estudos *in vitro*, a administração intravenosa *in vivo* de células tronco mesenquimais levou a um modesto, mas significativo, aumento na sobrevida de enxertos cutâneos com uma eficácia comparável aos agentes imunossupressores utilizados clinicamente (BARTHOLOMEW, STURGEON, SIATSKAS, FERRER, McINTOSH, PATIL, HARDY, DEVINE, UCKER, DEANS, MOSELEY e HOFFMAN, 2002; SEMBEIL, SANHADJI, VIVIER, CHARGUI e TOURAINÉ, 2003).

Especula-se que as propriedades imunossupressoras das células tronco mesenquimais possam ter efeito promotor no crescimento de células neoplásicas. Experimentalmente, FIERRO, SIERRALTA, EPUNAN e MINGUELL (2004), utilizando células de câncer de mama humano MCF-7 observaram favorecimento do seu crescimento com células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea. Também *in vivo*, ZHU, XU, JIANG, QIAN, CHEN, HU, CAO, HAN e CHEN (2005) evidenciaram favorecimento no crescimento tumoral de células neoplásicas F6 e SW480

com a utilização de células tronco mesenquimais de medula óssea fetal e adulta.

DJOUAD, PLENCE, BONY, TROPEL, APPARAILLY, SANY, NOËL e JORGENSEN (2003), utilizando experimentalmente o melanoma murino B16, demonstraram que a inoculação subcutânea em camundongos alogênicos, só mostrou crescimento dessas células quando foram utilizadas conjuntamente células tronco mesenquimais de medula óssea.

Partindo dessa premissa, o autor utilizou células tronco mesenquimais juntamente com células de melanoma murino B16-F10, visando aumentar a possibilidade de desenvolvimento de metástases pulmonares no modelo experimental em questão.

A linhagem celular selecionada foi células tronco mesenquimais isoladas de pulmão de camundongo C57BL/6N transgênico proveniente do Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética da UFRGS. A técnica de cultura celular adotada para o cultivo das células foi a mesma do Laboratório de Imunogenética (MEIRELLES & NARDI, 2003).

2. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é observar a presença de metástases pulmonares de melanoma murino B16-F10 desenvolvidas experimentalmente em camundongos C57BL/6N, com ou sem a inclusão de células tronco mesenquimais de pulmão de camundongo C57BL/6N transgênico.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. AMOSTRA

Foram utilizados 31 camundongos (*Mus domesticus domesticus*) da cepa C57BL/6N, fêmeas, isogênicos, adultos, clinicamente saudáveis e provenientes do ILPC de São Paulo (Figura 1).

Os animais foram alojados na Coordenação de Produção e Experimentação Animal da FEPPS da Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente do Rio Grande do Sul, em condições sanitárias de biotério convencional, com controle de temperatura (22 a 24°C) e luminosidade (12 h de ciclo claro). Foram mantidos em caixas de polipropileno padrão para camundongo (30 x 20 x 13 cm) com tampas gradeadas de arame galvanizado com tratamento antioxidante, com 5 animais por caixa no máximo. As caixas eram limpas duas vezes por semana, com troca da serragem e alimentação. Utilizava-se serragem esterilizada em autoclave e a alimentação consistiu de ração para camundongo Nuvilab® (Nuvital®) e água fresca permanente.

O manejo dos roedores obedeceu às normas estabelecidas pelos procedimentos operacionais padrão (POPs) da Coordenação de Produção e Experimentação Animal da FEPPS e pelos princípios éticos da experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 2005).

Os 31 camundongos foram divididos em 2 grupos por alocação casual probabilística. Convencionou-se denominá-los grupo controle e grupo experimental.

Nos animais do grupo controle - 17 camundongos - foram inoculadas células de melanoma murino no primeiro dia do experimento (dia 1).

Nos animais do grupo experimental - 14 camundongos - foram inoculadas células de melanoma murino juntamente com células tronco mesenquimais também no primeiro dia do experimento (dia 1).



Figura 1 - Camundongo C57BL/6N

3.2. PROCEDIMENTOS

3.2.1. Cultura Celular

As linhagens celulares utilizadas foram o melanoma murino B16-F10 e as células tronco mesenquimais de pulmão de camundongo C57BL/6N transgênico. Ambas foram cultivadas no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética da UFRGS.

Todo o trabalho foi realizado em condições assépticas, em capela de fluxo laminar com lâmpada ultravioleta (Luwa®), com material estéril e descartável.

Como substrato químico para o cultivo celular, foram utilizados os seguintes meios:

melanoma murino B16-F10

- 1.000 ml de meio de cultura MEM com L-glutamina (Sigma®)
- 100 ml de soro fetal bovino (Cultilab®)
- 2 g de bicarbonato de sódio 5,6% (Sigma®)
- 2,38 g de HEPES (Sigma®)

células tronco mesenquimais de pulmão de camundongo C57BL/6N transgênico

- 1.000 ml de meio de cultura DMEM (Sigma®)
- 100 ml de soro fetal bovino (Cultilab®)
- 3,7 g de bicarbonato de sódio 5,6% (Sigma®)
- 2,5 g de HEPES (Sigma®)

Como substrato físico, foi utilizada garrafa plástica de 25 cm² para cultura de células, plana e com tampa vedadora (TPP®).

a) Descongelamento

As células de melanoma murino B16-F10 e as células tronco mesenquimais eram estocadas e congeladas em tanques de nitrogênio líquido, em pequenas alíquotas dentro de frascos criogênicos estéreis de 2 ml, fundo em “u” e com tampa de rosca interna (Corning®). Para

descongelá-las, o frasco criogênico era retirado do nitrogênio líquido e aquecido, sem agitação, em banho-maria a 37°C.

b) Semeadura

Terminado o descongelamento, o frasco criogênico era lavado com álcool etílico 70% e o seu conteúdo transferido para um tubo de centrífuga de 15 ml, de polipropileno e com tampa vedadora (Corning®), com 8 ml de substrato químico. O tubo era centrifugado (Excelsa Baby I modelo 206 - Fanem®) por 5 min a 1.000 rotações por minuto (rpm). O sobrenadante era desprezado por decantação e todo o excesso do tubo aspirado com auxílio de pipeta Pasteur. Eram adicionados 7 ml de substrato químico ao tubo. As células eram desprendidas suavemente, batendo-se o tubo na palma da mão, e transferidas para a garrafa de cultura celular. O conteúdo da garrafa era homogeneizado levemente, observado ao microscópio invertido (Carl Zeiss®) e, a seguir, a garrafa era mantida em estufa (Forma Scientific®) a 37°C, com atmosfera contendo 5% de CO₂ e umidade relativa de 100%, com a tampa entreaberta.

c) Troca do substrato químico

A garrafa era observada ao microscópio invertido diariamente. A cada 72 h, ou antes disto se houvesse mudança acentuada do pH do substrato químico (variação da coloração do róseo para o alaranjado), era feita a troca do substrato químico antigo. Esse era decantado e substituído por 7 ml de substrato químico novo, com leve homogeneização do conteúdo da garrafa e novamente observado ao microscópio invertido. A garrafa era recolocada na estufa de CO₂ com a tampa entreaberta.

d) Tripsinização e repique

Quando a garrafa ficava repleta de células, o substrato químico era decantado e as células eram lavadas com meio Hank's (Sigma®) livre de Ca^{++} e Mg^{++} . A seguir, adicionava-se 1,5 ml de solução de tripsina-EDTA (Sigma®) aquecida a 37°C. O frasco era homogeneizado e as células eram ressuspensas batendo-se vigorosamente o frasco contra a palma da mão e, após, o conteúdo era observado ao microscópio invertido. O repique das células era feito na proporção 1:10, adicionando-se 8,5 ml de substrato químico à garrafa e transferindo 0,5 ml do conteúdo para garrafas novas, completando o volume com 6,5 ml de substrato químico. O conteúdo era homogeneizado levemente, observado ao microscópio invertido e incubado em estufa de CO_2 , mantendo-se as tampas das garrafas entreabertas.

e) Doses para inoculação

Quando a garrafa ficava repleta de células, o substrato químico era decantado e as células eram lavadas duas vezes com meio Hank's (Sigma®). A seguir, adicionava-se 2 ml de solução de tripsina-EDTA (Sigma®) aquecida a 37°C. As células eram desprendidas, batendo-se vigorosamente o frasco contra a palma da mão, e ressuspensas em 8 ml de meio Hank's (Sigma®). As células viáveis eram contadas com azul tripan em câmara de Neubauer e ressuspensas numa concentração de 3×10^5 células (número de células para inoculação em cada animal de experimentação) para cada 0,2 ml. Após, as células eram imediatamente inoculadas nos camundongos.

f) Congelamento

Quando a garrafa ficava repleta de células, o substrato químico era decantado e as células tripsinizadas como descrito anteriormente e congeladas. Como substrato químico para o congelamento, era utilizado o seguinte meio:

solução criopreservante: 9 ml de soro fetal bovino (Cultilab®)

1 ml de DMSO (Sigma®)

As células eram ressuspensas na solução criopreservante, transferidas para frascos criogênicos (Corning®) e mantidas por 24 h no *freezer* a -80°C e, após, estocados em nitrogênio líquido.

g) Isolamento das células tronco mesenquimais

As células tronco mesenquimais foram isoladas de pulmão de camundongo C57BL/6N transgênico (Figura 2). O tecido pulmonar era colocado em meio Hank's (Sigma®) por 10 min. A seguir, era transferido para tubos de 1,5 ml contendo solução de 1 mg/ml de colagenase tipo 1 (Sigma®) e incubado por 1 h em banho-maria a 37°C, com homogeneização ocasional. Após, o sobrenadante era transferido para um tubo de centrifuga de 15 ml (Corning®), contendo substrato químico, e centrifugado por 10 min a 1.000 rotações por minuto (rpm). Então, as células eram plaqueadas em um poço de uma placa de 6 poços (TTP®). Após 72 h era feita a troca do substrato químico antigo e as células tripsinizadas como descrito anteriormente. A partir deste ponto, as células eram cultivadas em garrafas de cultura celular.

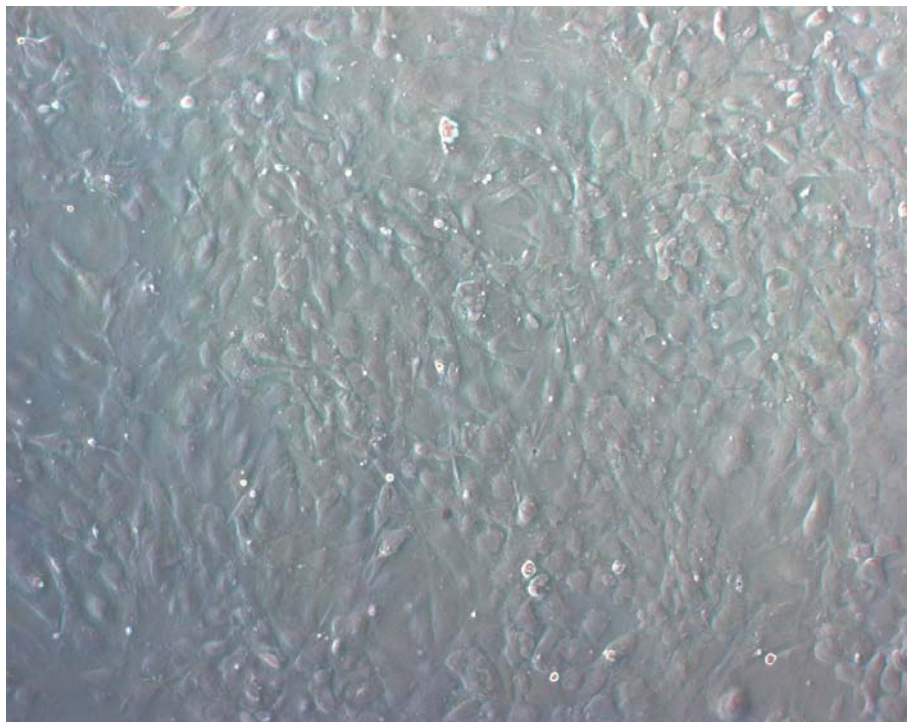


Figura 2 - Fotomicrografia (100 x) mostrando as células tronco mesenquimais de pulmão de camundongo C57BL/6N transgênico

3.2.2. Inoculação

Os camundongos foram inoculados no primeiro dia do experimento (dia 1). Os animais foram submetidos à contenção manual, e a injeção foi feita por via intravenosa na veia caudal média, com seringa de 1 ml e agulha hipodérmica (13 x 0,30 mm) (Figura 3).

Os animais do grupo controle receberam uma dose individual de 3×10^5 células de melanoma murino B16-F10. Já os camundongos do grupo experimental receberam, além da dose de células de melanoma murino, uma dose individual de 10^5 células tronco mesenquimais de pulmão de camundongo C57BL/6N transgênico.

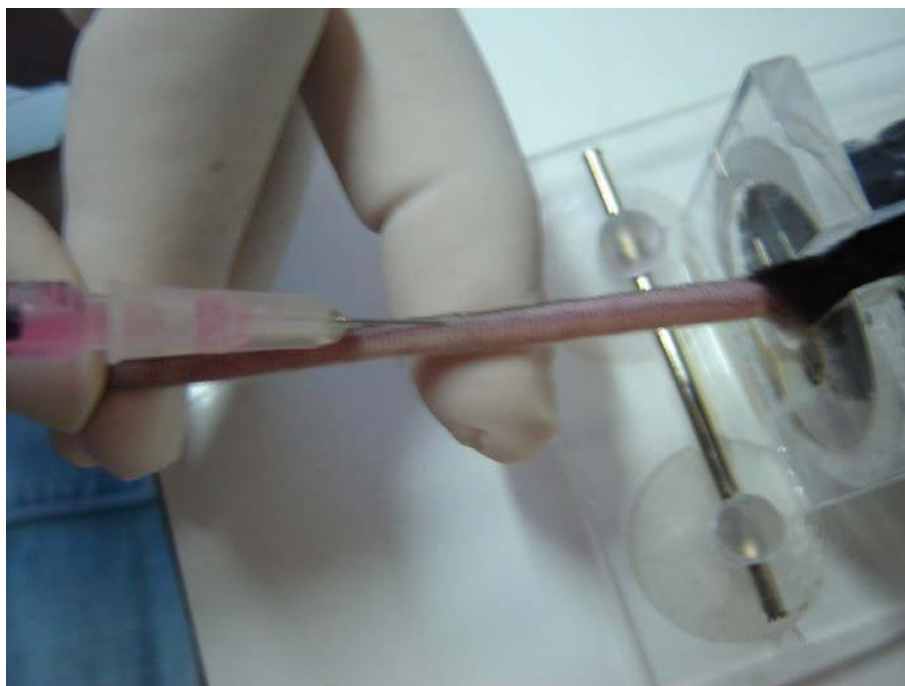


Figura 3 - Detalhe da técnica de inoculação intravenosa das células de melanoma murino B16-F10 na cauda do camundongo C57BL/6N

3.2.3. Seguimento

Cada camundongo era acompanhado diariamente, observando-se suas condições clínicas, desde o momento da inoculação (dia 1) até a sua morte (dia 28). Todos animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

3.2.4. Avaliação Histológica

Após a morte dos animais, era feita a excisão completa do pulmão para avaliação da presença ou não de metástases nesse órgão (Figura 4). O médico patologista que realizou as análises não tinha conhecimento dos grupos de estudo a que pertenciam os camundongos.

Avaliou-se a presença ou não de metástases pulmonares a partir da leitura de cortes histológicos obtidos através da inclusão total do órgão. Prepararam-se lâminas em número suficiente para que todo o pulmão fosse amostrado, variando de uma a três. Os cortes foram feitos em micrótomo rotativo (American Optical 820®) com navalhas descartáveis, com 4 μ m de espessura e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE).



Figura 4 - Toracolaparotomia no camundongo C57BL/6N para retirada completa do pulmão

3.2.5. Análise Estatística

Na análise da presença ou não de metástases pulmonares nos grupos em estudo, foi empregado o teste qui-quadrado com correção de *Yates* para duas amostras independentes. O nível de significância utilizado foi $\alpha = 0,05$ com 1 grau de liberdade. Os dados foram processados através do programa estatístico SPSS (versão 6.0).

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Os Quadros I e II exibem os resultados encontrados, respectivamente, nos grupos controle e experimental.

QUADRO I
RESULTADOS OBSERVADOS NOS CAMUNDONGOS
C57BL/6N DO GRUPO **CONTROLE**

Nº CAMUNDONGO	METÁSTASES PULMONARES
1	SIM
2	NÃO
3	SIM
4	SIM
5	SIM
6	NÃO
7	NÃO
8	SIM
9	SIM
10	NÃO
11	NÃO
12	NÃO
13	NÃO
14	NÃO
15	SIM
16	SIM
17	SIM

QUADRO II
RESULTADOS OBSERVADOS NOS CAMUNDONGOS
C57BL/6N DO GRUPO **EXPERIMENTAL**

Nº CAMUNDONGO	METÁSTASES PULMONARES
1	SIM
2	SIM
3	SIM
4	SIM
5	SIM
6	NÃO
7	NÃO
8	SIM
9	NÃO
10	SIM
11	SIM
12	SIM
13	NÃO
14	SIM

As Figuras 5 a 10 mostram aspectos relacionados à presença de metástases nos pulmões dos camundongos à microscopia óptica.

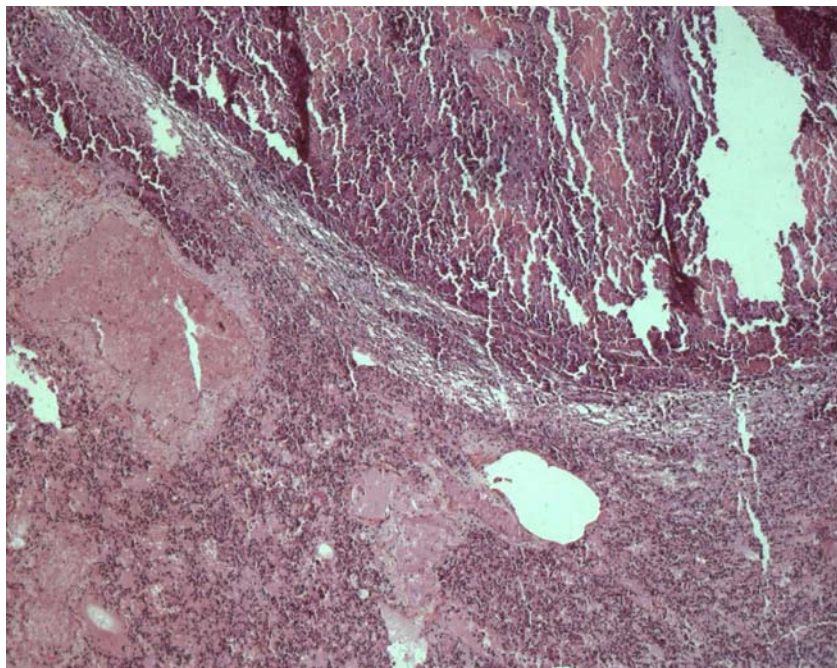


Figura 5 - Fotomicrografia (50x) mostrando o pulmão do camundongo C57BL/6N com metástases de melanoma murino B16-F10

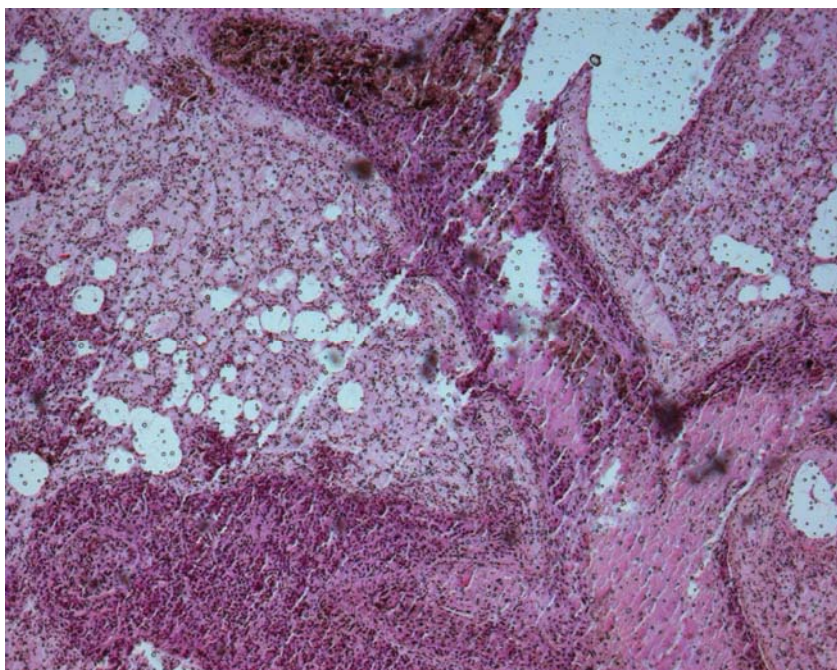


Figura 6 - Fotomicrografia (100x) mostrando o pulmão do camundongo C57BL/6N com metástases de melanoma murino B16-F10

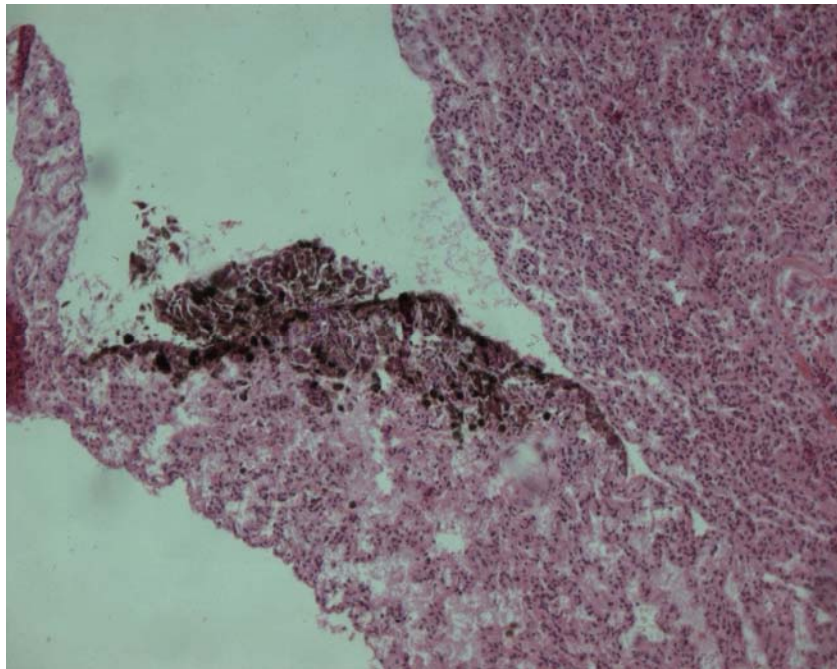


Figura 7 - Fotomicrografia (100x) mostrando o pulmão do camundongo C57BL/6N com micrometástase de melanoma murino B16-F10

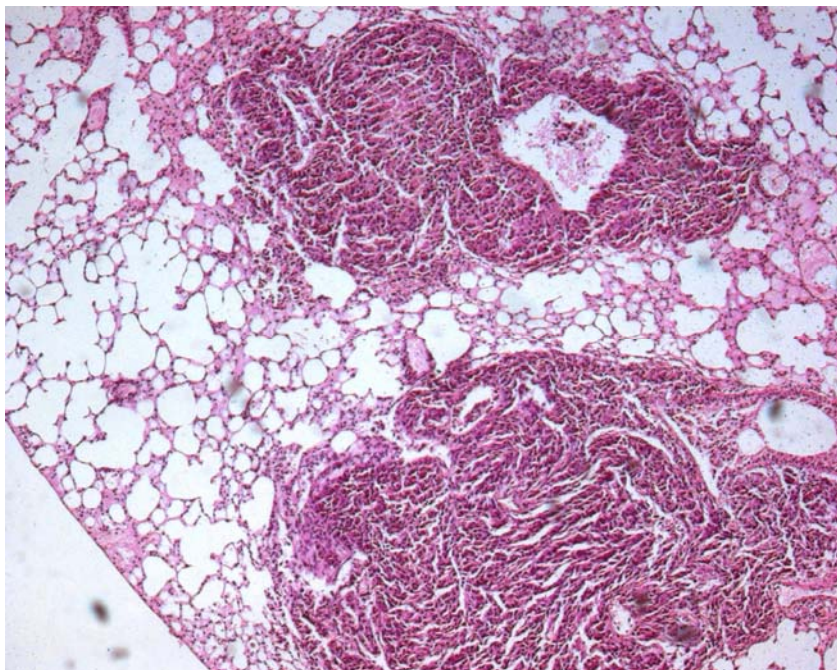


Figura 8 - Fotomicrografia (50x) mostrando o pulmão do camundongo C57BL/6N com metástases de melanoma murino B16-F10

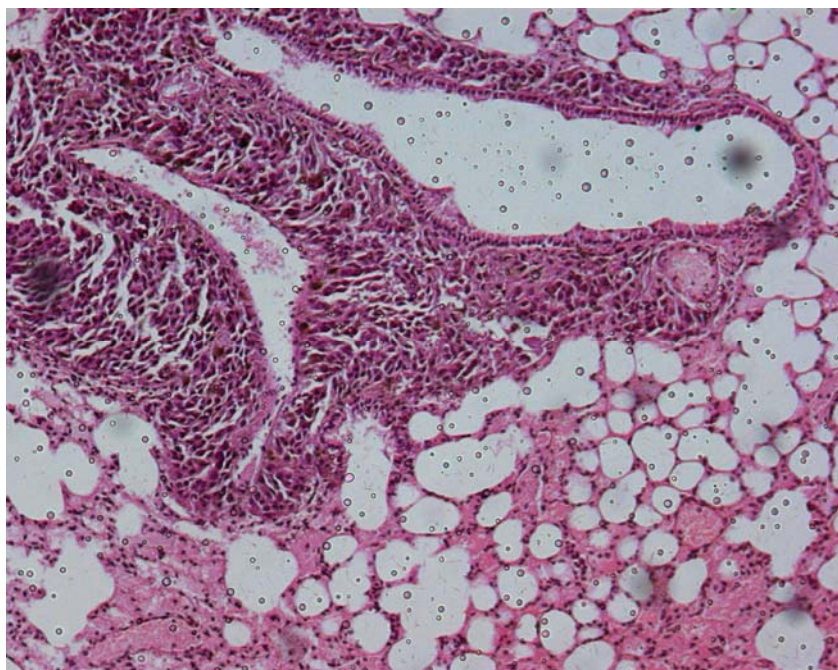


Figura 9 - Fotomicrografia (100x) mostrando o pulmão do camundongo C57BL/6N com metástases de melanoma murino B16-F10

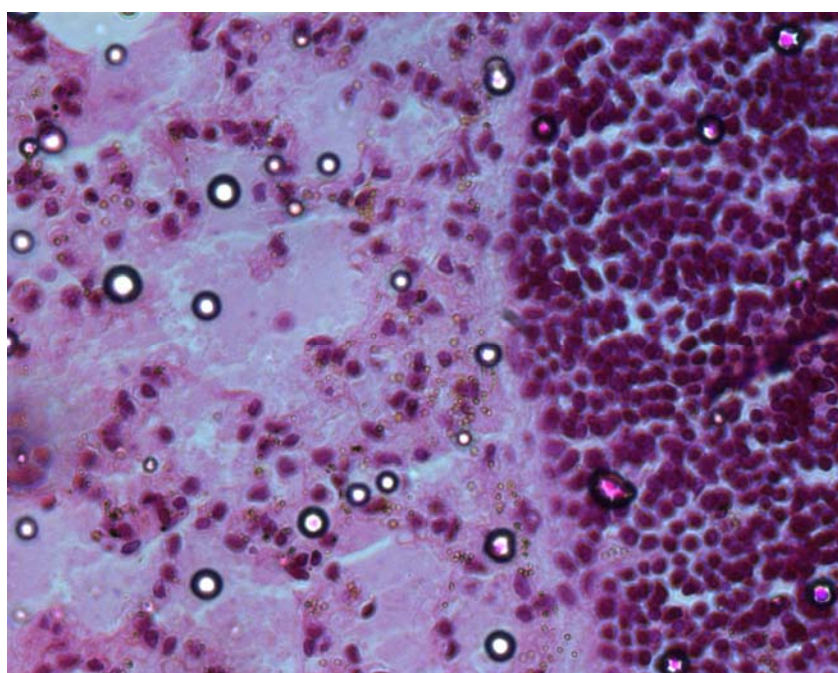


Figura 10 - Fotomicrografia (400x) mostrando o pulmão do camundongo C57BL/6N com metástases de melanoma murino B16-F10

4.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O resultado do teste qui-quadrado com correção de *Yates* foi de 2,022 e a comparação entre os dois grupos não mostrou diferença estatisticamente significativa ($\alpha = 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A inoculação subcutânea de uma dose de 5×10^5 células de melanoma murino B16-F10 (Figura 9) implica o desenvolvimento de um nódulo hipodérmico que se torna palpável em torno de 1 a 2 semanas. Esse nódulo evolui para um tumor sólido, de grandes dimensões, que pode ulcerar a pele. O surgimento de metástases sistêmicas é incomum. Em 4 a 5 semanas, em média, o camundongo morre; o peso do tumor dificulta a locomoção do animal e conseqüentemente sua alimentação, levando-o ao óbito por inanição. Quando a inoculação é feita no dorso do camundongo, o tumor provoca restrição da caixa torácica e também ocasiona insuficiência respiratória restritiva (JUNQUEIRA Jr., 1996; JUNQUEIRA Jr., BRAGA, MOTTA e PILLA, 1997) (Figuras 10, 11 e 12).



Figura 11 - Detalhe da técnica de inoculação subcutânea das células de melanoma murino B16-F10 no dorso do camundongo C57BL/6N



Figura 12 - Camundongo C57BL/6N, após a morte, com o tumor subcutâneo desenvolvido no dorso



Figura 13 - Detalhe do tumor mostrando sua localização subcutânea



Figura 14 - Tumor completamente excisado mostrando sua relação com o tamanho do animal de experimentação

Com a inoculação intraperitoneal da mesma dose de células, provoca-se o desenvolvimento de um tumor sólido que ocupa toda a cavidade abdominal em poucos dias, freqüentemente com envolvimento do mediastino por contigüidade. O envolvimento dos parênquimas hepático e pulmonar não é a regra. Em 2 semanas, em média, o camundongo morre por insuficiência respiratória restritiva (JUNQUEIRA Jr., 1996; JUNQUEIRA Jr. e col, 1997).

A vantagem do primeiro modelo experimental sobre o segundo deve-se ao fato de ter-se um tempo maior para observação dos eventos estudados entre a inoculação e o óbito. No entanto, em nenhum deles observa-se o surgimento de metástases parenquimatosas (JUNQUEIRA Jr., 1996; JUNQUEIRA Jr. e col, 1997).

Existem relatos de modelos experimentais de metástases hepáticas através da inoculação intra-esplênica, por laparotomia, de células de melanoma murino B16 em camundongos C57BL/6N (CALORINI,

MAROZZI, BYERS, WANECK, LEE, ISSELBACHER e GATTONI-CELLI, 1992; ARAKI, ARAKI, BIANCONE, STAMENKOVIC, IZUI, YAMAMURA e VASSALLI, 1997; SONG, NOMIZU, YAMADA e KLEINMAN, 1997; LENTINI, VIDAL-VANACLOCHA, FACCHIANO, CARAGLIA, ABBRUZZESE e BENINATI, 2000; LE DIGUARHER, CHOLLET, BERTRAND, HENNIG, RAIMBAUD, SABATINI, GUILBAUD, PIERRE, TUCKER e CASARA, 2003; CORADINI, ZORZET, ROSSIN, SCARLATA, PELLIZZARO, TURRIN, BELLO, CANTONI, SPERANZA, SAVA, MAZZI e PERBELLINI, 2004; SPERANZA, PELLIZZARO e CORADINI, 2005).

No presente estudo, o autor pretendeu desenvolver o modelo experimental de metástases pulmonares através da inoculação intravenosa na veia caudal média do roedor.

A veia caudal média é um vaso tributário direto da veia cava inferior nos camundongos. Em relação à anatomia pulmonar, esses roedores possuem dois pulmões, sendo o direito com quatro lobos e o esquerdo com um lobo único (COOK, 2005).

Diversos trabalhos são encontrados na literatura relatando a utilização de células de melanoma murino B16 através dessa via de inoculação e o desenvolvimento exclusivo de metástases pulmonares, mas não existe uma padronização em relação ao número de células que devem ser inoculadas, variando entre 3×10^4 a 5×10^5 células de melanoma murino B16 por dose individual. Não existe, também, padronização em relação ao tempo de surgimento das metástases pulmonares, variando entre 14 e 28 dias (NETLAND e ZETTER, 1984; PAULI e LEE, 1988; LAPIERRE, HOLME, LAM, TRESSLER, STORM, WEE, STACK, CASTELLOT e TYRRELL, 1996; SONG e col, 1997; MANNINI, CALORINI, MUGNAI e RUGGIERI, 1997; OLIVEIRA FILHO, BEVILACQUA e CHAMMAS, 1997; ISHIGURO, NAITO, HANAOKA,

NAGAWA, MUTO e TSURUO, 1998; LENTINI e col, 2000; YOSHIKAWA, NAKAMURA, YAMAGUCHI, KAGOTA, SHINOZUKA e KUNITOMO, 2001; HYODOU, NISHIKAWA, UMEYAMA, KOBAYASHI, YAMASHITA e HASHIDA, 2004).

Existem, também, variantes distintas do melanoma murino B16. A variante F10 é a que possui maior capacidade de disseminação metastática, presumivelmente exigindo uma quantidade de células menor para seu desenvolvimento *in vivo* (JUNQUEIRA Jr., 1996; JUNQUEIRA Jr. e col, 1997).

Outro ponto pertinente a ser discutido é a predileção das células B16-F10 pelo tecido pulmonar para disseminação metastática quando a via de inoculação é a intravenosa.

NETLAND e ZETTER (1984) observaram que as células de melanoma murino B16-F10 são dotadas de órgão-especificidade tecidual. Essas células apresentam, *in vitro*, uma ligação específica para os tecidos que elas seletivamente colonizam, *in vivo*, conforme demonstrado pelos autores após inoculação intravenosa do melanoma murino B16 e posterior análise histológica dos órgãos alvo.

Muitos tumores demonstram padrões característicos de disseminação metastática que não se enquadram numa simples teoria de captura celular anatômico-mecânica. PAULI e LEE (1988), também estudando as células de melanoma murino B16-F10, demonstraram que a órgão-especificidade tecidual das metástases é parcialmente mediada pela adesão seletiva das células neoplásicas ao endotélio microvascular órgão-específico.

Já HYODOU e col (2004) sugerem que o mecanismo inicial da disseminação metastática das células de melanoma murino B16 esteja relacionado com a captura mecânica das mesmas pela microvasculatura do pulmão.

Durante o projeto piloto do presente estudo, utilizando-se doses individuais de 10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 e 5×10^5 células de melanoma murino B16-F10, observou-se que com a dose intermediária já havia o aparecimento de metástases pulmonares, razão pela qual optou-se pela mesma como dose individual padrão para a pesquisa.

Também nesse momento, foi arbitrado o período de 4 semanas para morte do roedor e avaliação histológica do surgimento das metástases pulmonares. Inicialmente, com duas semanas, nenhum dos animais do projeto piloto apresentou metástases pulmonares.

Na verdade, em todos os camundongos inoculados nesse período, o surgimento de metástases pulmonares parecia ser algo fortuito. Após revisão de toda a sistemática de cultura celular e técnica de inoculação, pensou-se em buscar algo que facilitasse o desenvolvimento das metástases pulmonares, uma vez que não se conseguia reproduzir o modelo experimental como descrito na literatura.

A aplicabilidade clínica das células tronco mesenquimais é assunto de grande interesse na atualidade devido ao seu uso potencial em medicina regenerativa e em engenharia tecidual.

Pensou-se então na utilização de células tronco mesenquimais como favorecedoras do crescimento das células de melanoma murino B16-F10 metastáticas no pulmão, pelos fatores relacionados ao seu mecanismo imunossupressivo já mencionado anteriormente. Contudo, o presente estudo não confirmou essa hipótese.

6. CONCLUSÃO

Nas condições experimentais do presente estudo, a associação de células de melanoma murino B16-F10 com células tronco mesenquimais de pulmão de camundongo C57BL/6N transgênico, não alterou o desenvolvimento de metástases pulmonares em camundongos C57BL/6N.

7. REFERÊNCIAS

AMERICAN CANCER SOCIETY - Statistics for 2005. Cancer facts and figures 2005. Disponível em: <http://www.cancer.org/docroot/STT/stt_O.asp>. Acesso em dezembro 2005.

ANDERSEN, M.L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G.M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P.J.F.; MAGALHÃES, L.E.; TUFIK, S. - *Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação*. São Paulo, UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo, 2004. 167p.

ANG, K.K.; GEARA, F.B.; BYERS, R.M.; PETERS, L.J. - Radiotherapy for melanoma. In: BALCH, C.M.; HOUGHTON, A.N.; SOBER, A.J.; SOONG, S. - *Cutaneous melanoma*. Saint Louis, Quality Medical Publishing, 1998. p.389-403.

ARAKI, M.; ARAKI, K.; BIANCONE, L.; STAMENKOVIC, I.; IZUI, S.; YAMAMURA, K.; VASSALLI, P. - The role of E-selectin for neutrophil activation and tumor metastasis in vivo. *Leukemia*, 3:209-12,1997.

ATKINS, M.B.; KUMKEL, L.; SZNOL, M.; ROSENBERG, S.A. - High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long term survival update. *Cancer J. Sci. Am.*, 6(supl. 1):11-4,2000.

ATZPODIEN, J.; HÄNNINEN, E.L.; KIRCHNER, H.; FRANZKE, A.; KÖRFER, A.; VOLKENANDT, M.; DUENSING, S.; SCHOMBURG, A.; CHAITCHIK, S.; POLIWODA, H. - Chemoimmunotherapy of advanced malignant melanoma: sequential administration of subcutaneous interleukin-2 and interferon- α after intravenous dacarbazine and carboplatin

or intravenous dacarbazine, cisplatin, carmustine and tamoxifen. *Eur. J. Cancer*, 31A:876-81,1995.

BAKOS, L.; WAGNER, M.; BAKOS, R.M.; LEITE, C.S.; SPERHACKE, C.L.; DZEKANIAK, K.S.; GLEISNER, A.L. - Sunburn, sunscreens, and phenotypes: some risk factors for cutaneous melanoma in southern Brazil. *Int. J. Dermatol.*, 41:557-62,2002.

BALCH, C.M. - Surgical treatment of advanced melanoma. In: BALCH, C.M.; HOUGHTON, A.N.; SOBER, A.J.; SOONG, S. - *Cutaneous melanoma*. Saint Louis, Quality Medical Publishing, 1998. p.373-88.

BARTHOLOMEW, A.; STURGEON, C.; SIATSKAS, M.; FERRER, K.; McINTOSH, K.; PATIL, S.; HARDY, W.; DEVINE, S.; UCKER, D.; DEANS, R.; MOSELEY, A.; HOFFMAN, R. - Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol.*, 30:42-8,2002

BEATTIE, C.W.; TISSOT, R.; AMOSS, M. - Experimental models in human melanoma research: a logical perspective. *Sem. Oncol.*, 15:500-11,1988.

BERWICK, M. - Epidemiology: current trends, risk factors, and environmental concerns. In: BALCH, C.M.; HOUGHTON, A.N.; SOBER, A.J.; SOONG, S. - *Cutaneous melanoma*. Saint Louis, Quality Medical Publishing, 1998. p.551-72.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCa). COORDENAÇÃO DE PROGRAMAS DE CONTROLE DE CÂNCER (Pro-Onco). - *Oncologia hoje: melanoma*. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde,1992. 28p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA NACIONAL DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCa). COORDENAÇÃO DE PROGRAMAS DE CONTROLE DE

CÂNCER (Pro-Onco). - *Câncer no Brasil: dados dos registros de base populacional*. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde, 1995. v.2.

BUZAID, A.C. & MURREN, J.R. - Chemotherapy for advanced malignant melanoma. *Int. J. Clin. Lab. Res.*, 21:205-9, 1992.

CALORINI, L.; MAROZZI, A.; BYERS, H.R.; WANECK, G.L.; LEE, K.W.; ISSELBACHER, K.J.; GATTONI-CELLI, S. - Expression of a transfected H-2Kb gene in B16 cells correlates with suppression of liver metastases in triple immunodeficient mice. *Cancer Res.*, 52:4036-41, 1992.

CASCINELLI, N.; BELLI, F.; VAGLINI, M.; LOVO, G.F. - Tumores cutâneos. In: VERONESI, U. - *Cirurgia oncológica*. Buenos Aires, Panamericana, 1991. p.768-805.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA) – Legislação e ética. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br/etica.htm>>. Acesso em dezembro 2005.

COOK, M.J. - The anatomy of the laboratory mouse. Disponível em: <<http://www.informatics.jax.org/cookbook/contents.shtml>>. Acesso em dezembro 2005.

CORADINI, D.; ZORZET, S.; ROSSIN, R.; SCARLATA, I.; PELLIZZARO, C.; TURRIN, C.; BELLO, M.; CANTONI, S.; SPERANZA, A.; SAVA, G.; MAZZI, U.; PERBELLINI, A. - Inhibition of hepatocellular carcinomas in vitro and hepatic metastases in vivo in mice by the histone deacetylase inhibitor HA-but. *Clin. Cancer Res.*, 10:4822-30, 2004.

DE FABO, E. - Ultraviolet B radiation initiates melanoma whereas ultraviolet A does not. In: *6th World Congress on Melanoma - Book of abstracts*. Vancouver, 2005. p.71.

DI NICOLA, M.; CARLO-STELLA, C.; MAGNI, M.; MILANESI, M.; LONGONI, P.D.; MATTEUCCI, P.; GRISANTI, S.; GIANNI, A.M. - Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation

induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99:3838-43,2002.

DJOUAD, F.; PLENCE, P.; BONY, C.; TROPEL, P.; APPARAILLY, F.; SANY, J.; NOËL, D.; JORGENSEN, C. - Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*, 102:3837-44,2003.

EVANS, G.R.D. & MANSON, P.N. - Review and current perspectives of cutaneous malignant melanoma. *J. Am. Col. Surg.*, 178:523-40,1994.

FIERRO, F.A.; SIERRALTA, W.D.; EPUNAN, M.J.; MINGUELL, J.J. - Marrow-derived mesenchymal stem cells: role in epithelial tumor cell determination. *Clin. Exp. Metastasis*, 21:313-9,2004.

FOPPOLI, M.; CITTERIO, G.; POLASTRI, D.; GUERRIERI, R. - The feasibility of repetitive courses of high-dose continuous intravenous infusion interleukin-2 and subcutaneous alpha-interferon with polychemotherapy in advanced malignant melanoma. *Tumori*, 81:102-6,1994.

FRESHNEY, R.I. - *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 2.ed. New York, Alan R. Liss, 1988. 287p.

GANDINI, S.; SERA, F.; CATTARUZZA, M.S.; PASQUINI, P.; ZANETTI, R.; MASINI, C.; BOYLE, P.; MELCHI, C.F. - Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur. J. Cancer*, 41:2040-59,2005.

GARBE, C. - Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma - 2005. In: 6th *World Congress on Melanoma - Book of abstracts*. Vancouver, 2005. p.46.

GUERRY, D. & SCHUCHTER, L.M. - Disseminated melanoma - is there a new standard therapy? *N. Engl. J. Med.*, 327:560-1,1992.

HYOUDOU, K.; NISHIKAWA, M.; UMEYAMA, Y.; KOBAYASHI, Y.; YAMASHITA, F.; HASHIDA, M. - Inhibition of metastatic tumor growth in mouse lung by repeated administration of polyethylene glycol-conjugated catalase. *Clin. Cancer Res.*, 10:7685-91,2004.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCa) - Estimativa 2006: Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=tabelaestados.asp&UF=RS>>. Acesso em dezembro 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). SISTEMA IBGE DE RECUPERAÇÃO AUTOMÁTICA (SIDRA) - Censo demográfico 2000. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/istabl.asp?z=cd&o=7&i=P&c=2093>>. Acesso em dezembro 2005.

ISHIGURO, T.; NAITO, M.; HANAOKA, K.; NAGAWA, H.; MUTO, T.; TSURUO, T. - Enhanced metastasis of B16 melanoma cells by unexpected elevated expression metastasis-associated TI-241 (LRF-1-, Jun-Fos-related) gene treated with antisense oligonucleotide. *Clin. Exp. Metastasis*, 16:179-83,1998.

JUNQUEIRA Jr., G. *Tamoxifeno no tratamento do melanoma murino B16-F10 em camundongos C57BL/6N*. Tese. Porto Alegre, UFRGS, 1996. 81p.

JUNQUEIRA Jr., G.; BRAGA, L.M.G.M.; MOTTA, M.S.; PILLA, H.S. - Modelo experimental de melanoma murino em camundongos. *An. Bras. Dermatol.*, 72:487-9,1997.

KIRKWOOD, J.M.; IBRAHIM, J.; LAWSON, D.H.; ATKINS, M.B.; AGARWALA, S.S.; COLLINS, K.; MASCARI, R.; MORRISSEY, D.M.; CHAPMAN, P.B. - High-dose interferon alfa-2b does not diminish antibody response to GM2 vaccination in patients with resected melanoma:

results of the Multicenter Eastern Cooperative Oncology Group Phase II Trial E2696. *J. Clin. Oncol.*, 19:1430-6,2001.

KOH, H.K.; KLIGLER, B.E.; LEW, R.A. - Sunlight and cutaneous malignant melanoma. *Photochem. Photobiol.*, 51:765-79,1990.

KOH, H.K. - Cutaneous melanoma, review article. *N. Engl. J. Med.*, 325:171-82,1991.

KOPE, A.W.; KRIPKE, M.L.; STERN, R.S. - Sun and malignant melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 11:674-84,1984.

KREUTZ, F.T. - O laboratório de biologia tumoral - a cultura de células e os xenotransplantes. In: FLECK, J. - Câncer: integração Clínico-biológica. Rio de Janeiro, MEDSI, 1992. p.337-52.

LAKHANI, S.; SELBY, P.; BLISS, J.M. - Chemotherapy for malignant melanoma: combinations and high doses produce more responses without survival benefit. *Br. J. Cancer*, 61:330-34,1990.

LANDMAN, G.; NEVES, R.I.; BRESCHTBÜHL, E.R.; SCRAMIM, A.P.; ENOKIHARA, M.; SANTOS, I.A.; MAIA, M.; BELFORT, F. - Brazilian internet based melanoma registry: a pilot with 465 primary cutaneous melanoma for a nationwide database. In: 6th World Congress on Melanoma - Book of abstracts. Vancouver, 2005. p.41.

LAPIERRE, J.; HOLME, K.; LAM, L.; TRESSLER, R.J.; STORM, N.; WEE, J.; STACK, R.J.; CASTELLOT, J.; TYRRELL, W.J. - Chemical modifications of heparin that diminish its anticoagulant but preserve its heparanase-inhibitory, angiostatic, anti-tumor and anti-metastatic properties. *Glycobiology*, 6:355-66,1996.

LE DIGUARHER, T.; CHOLLET, A.M.; BERTRAND, M.; HENNIG, P.; RAIMBAUD, E.; SABATINI, M.; GUILBAUD, N.; PIERRE, A.; TUCKER, G.C.; CASARA, P. - Stereospecific synthesis of 5-substituted 2-bisarylthiocyclopentane carboxylic acids as specific matrix metalloproteinase inhibitors. *J. Med. Chem.*, 46:3840-52,2003.

LEE, M.I.; TOMSU, K.; Von ESCHEN, K.B. - Duration of survival for disseminated malignant melanoma: results of a meta-analysis. *Melanoma Res.*, 83:81-92,2000.

LENTINI, A.; VIDAL-VANACLOCHA, F.; FACCHIANO, F.; CARAGLIA, M.; ABBRUZZESE, A.; BENINATI, S. - Theophylline administration markedly reduces hepatic and pulmonary implantation of B16-F10 melanoma cells in mice. *Melanoma Res.*, 10:435-43,2000.

LONGSTRETH, J.D. - Melanoma genesis: putative causes and possible mechanisms. In: BALCH, C.M.; HOUGHTON, A.N.; SOBER, A.J.; SOONG, S. - *Cutaneous melanoma*. Saint Louis, Quality Medical Publishing, 1998. p.535-50.

MacKIE, R. - Melanoma incidence in the west of Scotland over 25 years. In: 6th *World Congress on Melanoma - Book of abstracts*. Vancouver, 2005. p.50.

MANNINI, A.; CALORINI, L.; MUGNAI, G.; RUGGIERI, S. - Diminution of the development of experimental metastases produced by murine metastatic lines in essential fatty acid-deficient host mice. *Clin. Exp. Metastasis*, 16:407-14,1997.

MANOLA, J.; ATKINS, M.; IBRAHIM, J.; KIRKWOOD, J.M. - Prognostic factors in metastatic melanoma: a pooled analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials. *J. Clin. Oncol.*, 18:3782-93,2000.

MEIRELLES, L.S. & NARDI, N.B. - Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br. J. Haematol.*, 123:702-711,2003

MEYERS, M.L. & BALCH, C.M. - Diagnosis and treatment of metastatic melanoma. In: BALCH, C.M.; HOUGHTON, A.N.; SOBER, A.J.; SOONG, S. - *Cutaneous melanoma*. Saint Louis, Quality Medical Publishing, 1998. p.325-72.

MIGLIAVACCA, A.; GUIMARÃES, J.R.; HOFMANN, E. - Melanoma: experiência do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - RS, de 1973 a 1990. *Rev. Bras. Cancerol.*, 39:27-33,1993.

MIHM, M. - The vertical growth phase and prognostic factors in melanoma. In: *6th World Congress on Melanoma - Book of abstracts*. Vancouver, 2005. p.38.

MORTON, D.L. - Current management of malignant melanoma. *Ann. Surg.*, 212:123-4,1990.

NETLAND, P.A. & ZETTER, B.R. - Organ-specific adhesion of metastatic tumor cells in vitro. *Science*, 224:1113-5,1984.

OLIVEIRA FILHO, R.S.; BEVILACQUA, R.G.; CHAMMAS, R. - Hyperthermia increases the metastatic potencial of murine melanoma. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30:941-5,1997.

OLLILA, D.W.; HSUEH, E.C.; STERN, S.L.; MORTON, D.L. - Metastasectomy for recurrent stage IV melanoma. *J. Surg. Oncol.*, 71:209-13, 1999.

PAULI, B.U. & LEE, C.L. - Organ preference of metastasis. The role of organ-specifically modulated endothelial cells. *Lab. Invest.*, 58:379-87,1988.

RICHARDS, J.M.; GILEWSKI, T.A.; RAMMING, K.; MITCHEL, B.; DOANE, L.L.; VOGELZANG, N.J. - Effective chemotherapy for melanoma after treatment with interleukin-2. *Cancer*, 69:427-9,1992.

SEMBEIL, R.; SANHADJI, K.; VIVIER, G.; CHARGUI, J.; TOURAINE, J.-L. - Prolonged survival of mouse skin allografts after transplantation of fetal liver cells transduced with hIL-10 gene. *Transpl. Immunol.*, 13:1-8,2004.

SHEN, P.; WANCK, L.A.; MORTON, D.L. - Is adjuvant radiotherapy necessary after positive lymph node dissection in head and neck melanomas? *Ann. Surg. Oncol.*, 7:554-9,2000.

SONG, S.Y.; NOMIZU, M.; YAMADA, Y.; KLEINMAN, H.K. - Liver metastasis formation by laminin-1 peptide (LQVQLSIR)-adhesion selected B16-F10 melanoma cells. *Int. J. Cancer*, 71:436-41,1997.

SPERANZA, A.; PELLIZZARO, C.; CORADINI, D. - Hyaluronic acid butyric esters in cancer therapy. *Anticancer Drugs*, 16:373-9, 2005.

STEFFENS, T.A. & LIVINGSTON, P.O. - Status of adjuvant therapy of melanoma. *Surg. Onc. Clin. N. Am.*, 1:307-33,1992.

UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. PUBLIC HEALTH SERVICE. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. - *NIH Rodents: 1980 catalogue*. National Institutes of Health, 1982. 253p.

VENEGAS, L.F.; FLORES, C.; BLACHER, G.G.; DAUDT, A.W.; CERSKI, C.T. - Cutaneous malignant melanoma in Rio Grande do Sul, Brazil: study of 101 cases. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 38:122-6,1992.

WAGNER, J.D.; GORDON, M.S.; CHUANG, T.Y.; COLEMAN, J.J.3rd - Current therapy of cutaneous melanoma. *Plast. Reconstr. Surg.*, 105:1774-99,2000.

YOSHIKAWA, N.; NAKAMURA, K.; YAMAGUCHI, Y.; KAGOTA, S.; SHINOZUKA, K.; KUNITOMO, M. - Suitable indices for evaluating the intensity of tumor metastasis in a mouse experimental metastatic model. *In Vivo*, 15:485-8,2001.

ZHU, W.; XU, W.; JIANG, R.; QIAN, H.; CHEN, M.; HU, J.; CAO, W.; HAN, C.; CHEN, Y. - Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp. Mol. Pathol.*, no prelo, 2005.

NORMAS ADOTADAS

GOLDENBERG, S.; AZEVEDO, J.L.M.C.; POBLACIÓN, D.A.; FINO, T.P.M. – *Referências bibliográficas: manual adotado pelo Curso de Pós-Graduação em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Escola Paulista de Medicina*. São Paulo, Brasiliana, 1990. 40p.

GOLDENBERG, S. – Orientação normativa para elaboração de tese. *Acta Cir. Bras.*, 8(supl.1):1-24,1993.