

ROSEMAIRY LUCIANE MENDES

**MORFOLOGIA E REGIMES DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS CELULARES
DERIVADAS DE MELANOMA MURINO B16F10, PRIMÁRIO E METASTÁTICO, EM
CAMUNDONGOS BALB/c**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA – MINAS GERAIS
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M838m
2011

Mendes, Rosemary Luciane, 1974-
Morfologia e regimes de crescimento das linhagens
celulares derivadas de melanoma murino B16F10, primário
e metastático, em camundongos BALB/c / Rosemary
Luciane Mendes. – Viçosa, MG, 2011.
xix, 109f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Adilson Ariza Zacaro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 81-93.

1. Melanoma. 2. Melanoma - Crescimento. 3. Melanoma -
Morfologia. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 616.99477

ROSEMAIRY LUCIANE MENDES

**MORFOLOGIA E REGIMES DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS CELULARES
DERIVADAS DE MELANOMA MURINO B16F10, PRIMÁRIO E METASTÁTICO, EM
CAMUNDONGOS BALB/c**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 04 de agosto 2011.

Anilton César Vasconcelos

Márcio Santos Rocha

Márcia de Carvalho Vilela

Leandro Licursi de Oliveira

Adilson Ariza Zacaro
(Orientador)

Dedico esta tese ao meu amado pai, amigo e mentor, e ao mestre e amigo professor Marcelo José Vilela.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Marcelo José Vilela, meu eterno mestre, pela orientação, confiança, amizade e pelos valiosos ensinamentos.

Ao Professor Adilson Ariza Zacaro, por ter aceitado me orientar num momento tão delicado. Agradeço principalmente pela valiosa orientação e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Professor Marcelo Lobato Martins, pela orientação sobre a função de distribuição de tamanhos de agregados, pelo apoio, pelos incentivos e por ter viabilizado a execução de grande parte dos experimentos que contribuíram para esta tese.

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Departamento de Biologia Geral (DBG) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade e pelo apoio.

Aos professores dos Departamentos de Biologia Geral e Medicina Veterinária da UFV, pelos conhecimentos transmitidos.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial aos Departamentos de Biologia Animal (DBA) e Microbiologia, principalmente aos funcionários Nilo, Rita, João, Lúcia, Pablo e Sr. Paulo, pela presteza, simpatia e carinho com que sempre me atenderam.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (UFV), pela disponibilidade dos equipamentos.

Aos amigos do Laboratório do Câncer, Andressa, Carine, Daniela, Mariana e Renata, pelos incentivos, pelo bom ambiente de convivência e pela amizade. Gostaria de agradecer especialmente ao Juliano, pelo companheirismo, incentivo, bom humor e otimismo. À Lorena e ao Marco Antônio, por terem estado ao meu lado num momento muito difícil. Obrigada por continuarem no barco comigo. A amizade e o apoio de vocês foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Às colegas do doutorado Ana Paula e Daniela, pelo auxílio nas técnicas histológicas.

A todos os que fazem do Laboratório de Histologia do DBG/UFV um local aberto a quem quer fazer pesquisa.

À Profa. Mariella Bontempo Duca de Freitas, por ter disponibilizado e permitido a nossa permanência e a continuação dos experimentos no Laboratório de Ecofisiologia e Cultura de células (DBA/UFV).

A minha família, pessoas que amo imensamente, que me apoiam e sempre estão ao meu lado. Ao Hércules, pelo apoio incondicional, incentivo e presença constante mesmo quando ausente. Vocês fazem tudo valer a pena.

Aos amigos Adriana, Juarez e Zê, pela amizade, conselhos, companheirismo, incentivos e pela torcida.

A Deus, fonte de tudo, obrigada pelas valiosas lições aprendidas durante esse processo e principalmente pelos anjos que o Senhor colocou em minha vida.

A todos que de alguma forma colaboraram para a execução deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Melanoma subcutâneo (tumor primário) em camundongo BALB/c induzido pela inoculação subcutânea de 1×10^6 células B16F10 (39 dias). A medição do tumor com auxílio de paquímetro..... 25
- Figura 2** – Esquema do sistema usado para a análise das lamínulas. O microscópio ficava sob uma mesa com tampo de vidro transparente onde as lamínulas eram projetadas. Uma folha de papel vegetal era usada como anteparo para as projeções das lamínulas. 29
- Figura 3** – Contagem dos agregados celulares. A lamínula onde as células foram plaqueadas continha em média 72 campos (círculos). O sentido da contagem dos aglomerados nos campos microscópicos está indicado pelas setas. 29
- Figura 4** – Melanoma subcutâneo em camundongo BALB/c do grupo em que foram inoculadas 1×10^6 células B16F10 por via subcutânea (39 dias). (A) Tumor subcutâneo, apresentando extensa vascularização (angiogênese), indicada pelas setas. (B) Tumor primário após excisão. 32
- Figura 5** - Metástases pulmonares em camundongo BALB/c que recebeu inoculação de 1×10^6 células B16F10 por via endovenosa. Em A, vista interna do camundongo, passados 25 dias do desafio. A seta aponta um nódulo metastático no pulmão. (B) Pulmões preparados para a contagem dos nódulos tumorais (setas). 33
- Figura 6** – Metástases pulmonares em camundongo BALB/c que recebeu inoculação de células B16F10B por via endovenosa. Na figura são mostrados os pulmões de camundongo após 25 dias da inoculação das células (1×10^6 células B16F10B). As setas indicam nódulos metastáticos. 34
- Figura 7** – Cultura de células B16F10B (sublinhagem celular derivada de melanoma subcutâneo B16F10 após uma passagem in vivo em camundongos BALB/c) microscópio invertido. De A a D são mostradas fotografias a partir de 48h do início da cultura evidenciando diferentes estágios de crescimento da mesma. (A) Células migrando do explante tumoral (exp). (B) Podem ser vistas células em divisão celular (seta). (C) Células em subconfluência e (D) células em semiconfluência. A seta aponta uma célula contendo grânulos de melanina. (A=48h, B=96h, C=144h e D=192h). As barras nas figuras de A a D correspondem a $50 \mu\text{m}$ 36
- Figura 8** – Células B16F10 cultivadas sobre lamínula de vidro. (A) e (B) mostram a morfologia das B16F10 em cultura quando coradas por HE. As setas mostram o pleomorfismo celular característico dessa linhagem. A seta branca mostra uma célula pequena e a vermelha, uma célula com citoplasma amplo e núcleo apresentando vários nucléolos. (A e B= 120h). Barras (A) – $100 \mu\text{m}$ e (B) – $50 \mu\text{m}$ 36

- Figura 9** – Células B16F10B cultivadas sobre lamínulas de vidro. Coloração HE. (A e B) Cultura celular em semiconfluência, mostrando o pleomorfismo celular (célula fibroblastoide; seta vermelha); células poligonais (seta preta); células gigantes (cabeça de seta). O asterisco mostra uma célula contendo grânulos de melanina. (A e B =96h). Barras, (A e B) – 100 μ m. 37
- Figura 10** - Cultura de células B16F10BM (sublinhagem celular derivada de nódulos metastáticos crescidos em camundongos BALB/c após inoculação endovenosa de células B16F10B). De A a D, são mostradas fotografias a partir de 48h do início da cultura evidenciando diferentes estágios de crescimento da mesma. Em A, observa-se pleomorfismo celular evidenciado pela presença de células poligonais (seta) e células com formato fibroblastoide (cabeça de seta). O asterisco (*) denota a presença dos grânulos acastanhados no citoplasma celular. (B), a seta mostra os prolongamentos celulares. É possível perceber a refringência nas células (cabeça de seta), sinal de divisão celular. (C) A maioria das células possui formato fibroblastoide e mostra grande interação intercelular. (D) Cultura em confluência. Nesse estágio as células são praticamente todas poligonais e não se percebem prolongamentos citoplasmáticos. (A= 48h, B= 72h, C= 120h, D= 192h em cultura). As barras de A a D correspondem a 100 μ m. 38
- Figura 11** – Células B16F10BM cultivadas sobre lamínulas de vidro. (A) Células apresentam núcleos com nucléolos evidentes (seta). (B) Observar o pleomorfismo celular. (A e B = 120h). As barras (A e B) correspondem a 50 μ m. 38
- Figura 12** – Cultura de células B16F10M (sublinhagem celular derivada de nódulos metastáticos crescidos em camundongos BALB/c após inoculação endovenosa de células B16F10). De A a E, são mostradas fotografias a partir de 24h do início da cultura evidenciando diferentes estágios de crescimento da mesma, sendo possível observar a grande quantidade de grânulos de melanina presentes no citoplasma celular (*). (A= 24h, B= 48h, C= 120h, D= 144h). As barras correspondem, de A a D a 50 μ m. 40
- Figura 13** – Células B16F10M cultivadas em lamínulas de vidro e coradas por HE. (A) Cultura celular semiconfluente evidenciando a quase ausência de contatos intercelulares. (B) Campo selecionado de (A), visto em maior aumento (A e B = 120h). Barras, (A) – 300 μ m e (B) - 100 μ m. 40
- Figura 14** – Curvas de crescimento da linhagem celular B16F10 e das sublinhagens celulares B16F10B, -BM e -M cultivadas em monocamada. O número inicial de células plaqueadas foi de 1000 células. 42
- Figura 15** - Aspectos histopatológicos de tumor subcutâneo crescido em camundongo BALB/c a partir da inoculação de células B16F10. Em A, pseudocápsula (seta) com infiltrado inflamatório. (B) Células tumorais em torno de vaso sanguíneo (vs). (C) Áreas de necrose no

parênquima tumoral (setas). Em D, as cabeças de seta mostram células com diferentes padrões de distribuição do pigmento melanina. A cabeça de seta preta mostra uma célula com a melanina dispersa no citoplasma, e a vermelha mostra célula com melanina dispersa de forma mais densa próximo ao limite celular. (E) Podem-se notar características das células tumorais, tais como presença de múltiplos nucléolos (nu), aumento da relação núcleo/citoplasma, pleomorfismo celular (células com tamanhos variados - 1 e 2). A seta mostra célula em mitose. As barras equivalem a 100 μm (A, B, C e D); 50 μm (E). Coloração por HE. 43

Figura 16 – Cortes histológicos de pulmões de camundongos BALB/c corados por HE. (A) Pulmão de camundongo controle, evidenciando arquitetura preservada do pulmão. (B) e (C), aspectos histopatológicos de metástases pulmonares induzidas em camundongos BALB/c a partir da inoculação de células tumorais. (B) Pulmão de camundongo que recebeu inoculação de células B16F10, a seta evidencia nódulo metastático na região pleural. (C) Pulmão de camundongo que recebeu inoculação de células B16F10B, as setas evidenciam nódulos metastáticos na região pleural. Barras - 100 μm (A) e 300 μm (B e C). 45

Figura 17 – Cortes histológicos de fígado de camundongo BALB/c que recebeu a inoculação de células tumorais por via endovenosa. (A) Vista panorâmica de corte histológico de fígado, onde se observa que a arquitetura do órgão foi preservada e não houve colonização de células metastáticas. (B) Cordões de hepatócitos, intercalados por capilares sinusoides que drenam em direção à veia centro lobular (vc). Barras -100 μm (A e B). Coloração por HE. 46

Figura 18 – MET de células B16F10 cultivadas in vitro por 120h. (A) Célula de melanoma mostrando abundância de retículo endoplasmático rugoso (RER). Presença de núcleo eucromático (n) onde se pode ver um nucléolo (nu). (B). IAPs (setas) são visualizadas dentro de cisternas do RER. Notar a abundância de ribossomos livres (cabeça de seta). (C) Melanossomos tipos II e IV. (D) Ponto de contato intercelular (seta). Grande número de ribossomos livres no citoplasma (cabeça de seta). G – Golgi; m – mitocôndria. Barras - 0,8 μm (A e C); 0,4 μm (B) e 0,5 μm (D). 48

Figura 19 – MET de células B16F10B cultivadas in vitro. (A) Três células são mostradas, mantendo contato (cabeças de seta). Há a presença de melanossomos isolados nos quatro estágios de maturação (I, II III e IV). A célula central apresenta várias projeções citoplasmáticas (seta). (B) Melanossomos nos estágios III e IV. (C) IAPs (setas). Contato intercelular, (cabeça de seta). (D) As células B16F10B possuem um Golgi (G) bem desenvolvido e núcleo eucromático (n). m – mitocôndria; nu - nucléolo. Barras - 0,8 μm (A e C); 0,4 μm (B) e 0,5 μm (D). 49

Figura 20 – MET de tumor primário crescido em camundongos BALB/c a partir da inoculação de células B16F10. (A) As células do parênquima tumoral apresentaram grande número de melanossomos, que ora estavam dispersos (cabeça de seta), ora em aglomerados (seta) (B) Região de contato intercelular mostrando maior eletrondensidade (cabeça de seta). Notar a abundância de ribossomos livres (seta). (C). Melanócito com grande quantidade de melanossomos em todos os estágios de maturação (I a IV) Os melanossomos nos estágios III e IV formaram um aglomerado. (D) Melanossomos em maior aumento. Mitocôndrias túrgidas (m). n - núcleo. Barras – 3,0 μm (A); 0,5 μm (B); 0,8 μm (C) e 0,4 μm (D)..... 51

Figura 21 – MET de pulmão de camundongo BALB/c controle. (A). Interface entre os vasos sanguíneos (vs) onde se podem ver hemácias (h) e macrófago (ma) e os espaços alveolares (ea); pneumócitos tipo I (I) no parênquima pulmonar com vesículas citoplasmáticas; fibroblastos (F); pneumócitos tipo II (II) com corpos lamelares contendo surfactante (seta). (B) Fusão lâmina basal entre as células do parênquima e endotélio (seta). (C). Pneumócito I evidenciando as vesículas citoplasmáticas e fibras de colágeno (C) no estroma pulmonar. (D) A seta evidencia um desmossomo entre dois pneumócitos I. Barras - 1,6 μm (A); 0,5 μm (B e C) e 0,4 μm (D). 53

Figura 22 – MET de metástases pulmonares em camundongos BALB/c a partir da inoculação de células B16F10. (A). Células metastáticas apresentando melanossomos (cabeça de seta); (B) Parênquima pulmonar apresentando melanossomos dispersos (cabeça de seta e em aglomerados (seta), em estágios variados de maturação (I, II e IV). (C) Células metastáticas exibindo RER bem desenvolvido, núcleo eucromático e melanossomos nos estágios I, II e IV. (D) Célula metastática no espaço alveolar (ea), apresentando melanossomos em todos os estágios de maturação (I-IV). m – mitocôndria; n – núcleo; nu – nucléolo. Barras – 3,0 μm (A); 2,6 μm (B, C e D)..... 55

Figura 23 – MET de metástases pulmonares em camundongos BALB/c a partir da inoculação de células B16F10B. (A). Parênquima pulmonar apresentando células metastáticas facilmente reconhecíveis pela quantidade de melanossomos (Mel). Uma célula menor é vista no espaço alveolar. (B). Célula metastática emitindo inúmeras projeções. (C) Os melanossomos nesse tipo de células se dispõem normalmente em grupos. Barras – 3,0 μm (A); 0,5 μm (B); 2,6 μm (C) e 0,8 μm (D)..... 56

Figura 24 – MEV das células B16F10 cultivadas in vitro. (A e B) Agregados celulares (A-48h e B-72h). (C) Uma célula com citoplasma amplo (96h). (D) Um grupo de células em divisão celular (seta) pode ser observado, bem como a presença de inúmeros filopódios na superfície das células (120h). Barras – 20 μm (A, B); 30 μm (C); 10 μm (D)..... 58

- Figura 24** – MEV das células B16F10 cultivadas *in vitro* (E e F) Agregados celulares representativos das interações celulares onde podem ser observadas células mais coesas entre si e células com menor grau de interação apresentando morfologia poliédrica e fibroblastoide. Essa última normalmente relacionada com fenótipo migratório (E – 96h e F – 120h). (G) As células se conectam por projeções, (96h) e/ou por contatos que abrangiam uma maior superfície celular (H). Barras – 30 μ m (E e F) e 100 μ m (G e H).....59
- Figura 25** – MEV das células B16F10B cultivadas *in vitro*. (A) Agregados vistos em menor aumento. As células B16F10B apresentam interação celular por meio de projeções citoplasmáticas (B e C) e há inúmeros filopódios em sua superfície (D, detalhe de C – 48h). (A a D – 48h). Barras – 100 μ m (A); 10 μ m (B, C e D)..... 61
- Figura 25** – MEV das células B16F10B cultivadas *in vitro*. De E a G é possível observar o pleomorfismo celular, com células poliédricas, fibroblastoides (E e F – 72h; G -96h) e células gigantes (citoplasma amplo) como a célula mostrada pela seta (G -96h). (H) Contato intercelular. A célula da esquerda apresenta inúmeros filopódios. Barras – 100 μ m (E); 30 μ m (F); 200 μ m (G) e 2 μ m (H).....62
- Figura 25** – MEV das células B16F10B cultivadas *in vitro*. De I a K - sobreposição das células e pleomorfismo dos agregados. Em M (detalhe) - grande número de células em divisão. (i, j e K -96h; L e M-120h. Barras – 20 μ m (I, J e M); 100 μ m (K e L); 10 μ m (detalhe da M).....63
- Figura 26** – A função de distribuição de tamanhos de agregados ns da linhagem B16F10, cultivada em diferentes tempos de observação, foi traçada em gráfico duplo logarítmico. Observar que as curvas correspondentes aos tempos 4, 24 e 48 horas apresentam decaimento em leis de potência (retas). O eixo das ordenadas representa ($n_{(s)}$) número de células por agregado celular e o eixo das abscissas, o número total de agregados (s).....65
- Figura 27** – A função de distribuição de tamanhos de agregados $n_{(s)}$, da sublinhagem B16F10B, cultivada em diferentes tempos de observação, foi traçada em gráfico duplo logarítmico. Observar que as curvas correspondentes ao tempo t =48 horas apresenta decaimento exponencial (curva). A partir desse tempo e as demais curvas apresentam decaimento em leis de potência (retas). O eixo das ordenadas representa ($n_{(s)}$) número de células por agregado celular e o eixo das abscissas, o número total de agregados (s).....66
- Figura 28** – A função de distribuição de tamanhos de agregados $n_{(s)}$, da sublinhagem B16F10BM, cultivada em diferentes tempos de observação, foi traçada em gráfico duplo logarítmico. Observar que as curvas correspondentes a todos os tempos apresentaram decaimento em leis de potência (retas). O eixo das ordenadas representa ($n_{(s)}$) número de células por agregado celular e o eixo das abscissas, o número total de agregados (s).....67

Figura 29 – A função de distribuição de tamanhos de agregados $n_{(s)}$ da sublinhagem B16F10M, cultivada em diferentes tempos de observação, foi traçada em gráfico duplo logaritmo. Observar que as curvas correspondentes a todos os tempos apresentaram decaimento em leis de potência (retas). O eixo das ordenadas representa ($n_{(s)}$) número de células por agregado celular e o eixo das abscissas, o número total de agregados (s). 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de nódulos metastáticos pulmonares após inoculação endovenosa de células B16F10 em camundongos BALB/c.....	33
Tabela 2 – Número de nódulos metastáticos pulmonares após inoculação endovenosa de células B16F10B em camundongos BALB/c.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B16F10 - linhagem de melanoma murino surgido espontaneamente em camundongos C57BL/6

B16F10B - Sublinhagem celular derivada do crescimento *in vitro* dos tumores primários induzidos pela inoculação subcutânea de células B16F10 em camundongos BALB/c

B16F10BM- Sublinhagem celular derivada do crescimento *in vitro* de metástases pulmonares induzidas pela inoculação endovenosa de células da sublinhagem B16F10B.

B16F10M - Sublinhagem celular derivada do crescimento *in vitro* de metástases pulmonares induzidas em camundongos BALB/c pela inoculação endovenosa de células B16F10.

cm² – centímetro quadrado

cm² – centímetros quadrados

CO₂ – gás carbônico

DBA- Departamento de Biologia Animal

DBG- Departamento de Biologia Geral

DMEM - Dulbecco's Modified Eagles Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

ev – via de inoculação endovenosa

IAP – Partícula intracisterna tipo A

IARC - International Agency Research on Cancer

INCA – Instituto Nacional do Câncer

MC – meio completo

MEC - Matriz extracelular

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

mm – milímetros

MO - Microscopia óptica

NMM- Núcleo de Microscopia e Microanálise

°C – temperatura em grau Celsius

PBS - Tampão fosfato de sódio

RER – retículo endoplasmático rugoso

rpm- rotações por minuto

sc - via de inoculação subcutânea

UFV – Universidade Federal de Viçosa

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

µm - micrômetros

RESUMO

MENDES, ROSEMAIRY LUCIANE. D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2011. **Morfologia e regimes de crescimento das linhagens celulares derivadas de melanoma murino B16F10, primário e metastático, em camundongos BALB/c.** Orientador: Adilson Ariza Zacaro. Co-orientador: Marcelo Lobato Martins

O melanoma é uma neoplasia maligna derivada dos melanócitos, células pigmentadas encontradas predominantemente na pele. Embora não esteja entre as neoplasias mais prevalentes é responsável pela quarta causa de morte entre os pacientes com câncer. A compreensão dos mecanismos envolvidos na gênese e progressão do melanoma é crucial para o seu tratamento. Modelos experimentais que representem as fases da progressão do melanoma ainda são raros, mas a cultura de células é uma ferramenta importante para tais investigações. Os objetivos deste trabalho foram: estabelecer um modelo de estudo do melanoma murino B16F10 por meio do estabelecimento de sublinhagens celulares que correspondem ao tumor primário e às metástases, após passagem dessas células *in vivo* em camundongos BALB/c; caracterizar morfologicamente por meio de microscopia óptica e eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV) a linhagem B16F10 e as sublinhagens derivadas; e investigar as leis de escala que regem o crescimento das linhagens de células de melanoma. Nesse contexto, células de melanoma B16F10 foram injetadas subcutaneamente (sc.) em camundongo BALB/c e a linhagem derivada dos tumores primários foi denominada de B16F10B. A linhagem B16F10 e a sublinhagem B16F10B foram inoculadas endovenosamente (ev.) em camundongos BALB/c e as sublinhagens obtidas das metástases foram denominadas B16F10M e B16F10BM, respectivamente. A linhagem B16F10 e as sublinhagens B16F10B, -BM e -M foram analisadas em MO, MET e MEV, revelando uma grande heterogeneidade na morfologia dessas células e nos agregados por elas formados. As células B16F10 e B16F10B também revelaram à MET presença de partículas virais. Para a caracterização das leis de escala que regem os regimes de crescimento das células B16F10, -B, -BM e -M, as linhagens celulares foram cultivadas sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços e retiradas em intervalos de 24 horas, durante 7 dias. O número de células por agregado e o número total de agregados foram usados para determinar a função de distribuição de tamanho de agregados que sugerem uma transição nas funções de distribuição de um decaimento exponencial para um que segue lei de potência para as células B16F10B. As demais linhagens analisadas sempre exibiram um comportamento de lei de potência. A distribuição em leis de potência indica a ausência de um tamanho característico para os tamanhos dos agregados, podendo refletir na falta de mecanismos de controle da replicação celular aliada à estabilidade dos agregados. A transição no regime de crescimento exibido pelas células B16F10B sugere que o crescimento celular contínuo na cultura pode exercer forças seletivas que destroem os mecanismos de regulação, tais como a dependência de ancoragem e o crescimento de densidade-dependente. A caracterização morfológica, bem como do regime de crescimento das sublinhagens derivadas das células B16F10 mostrou que há diferenças e similaridades entre as mesmas, porém, para uma melhor caracterização dessas células, outras análises devem ser realizadas, tais como: resistência a drogas, integridade genômica e padrão de expressão de moléculas de adesão.

ABSTRACT

MENDES, ROSEMAIRY LUCIANE. D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2011. **Morphology and regimes growth of cell lines derivative from murine melanoma B16F10, primary and metastatic, in BALB/c mice.** Advisor: Adilson Ariza Zacaro. Co-Advisor: Marcelo Lobato Martins.

Melanoma is a malignant neoplasm derived from melanocytes, specialized pigmented cells that are found predominantly in the skin. Although it does not figure among the most prevalent cancer types, melanoma is responsible for the fourth leading cause of cancer patients death. Understanding of the mechanisms involved in the genesis and progression of melanoma is crucial for the cancer treatment. Experimental models that representing phases of melanoma progression are still rare, but the cell culture is an important tool for such investigations. The aims of the work were to determine a study model of murine melanoma B16F10 by the establishment of cell sublineages corresponding to the primary tumor and to the metastases, after passage of these cells in BALB/c mice; to characterize morphologically by optical microscopy (OM) and transmission electron (TEM) and scanning electron (SEM) the B16F10 lineage and sublineages derived from B16F10; to investigate the scaling laws that rule the growth of melanoma cell lines. In this context, B16F10 melanoma cells were injected subcutaneously (sc) in BALB/c mice and the subline derived from subcutaneous tumors was named B16F10B. The B16F10 lineage and the B16F10B sublineage were inoculated intravenous (iv) in BALB/c mice, and the sublineages of metastases obtained were named B16F10M and B16F10BM, respectively. The B16F10B lineage and the B16F10, -BM and -M sublineages were analyzed by OM, TEM and SEM, what revealed an extent heterogeneity in the morphology of these cells and clusters formed by them. B16F10 and B16F10B cells also disclosed to MET viral particles presence. To characterize the scaling laws that rule the growth regimes of the B16F10, -B, -BM and -M cells, the cells lineages were cultured on glass coverslips in 24-well plates and removed at intervals of 24 hours for 7 days. The number of cells per cluster and the total number of clusters were used to determine the cluster size functions. The results suggest distribution functions with a transition to an exponential decay that follows a power law for B16F10B cells. The other lineages analyzed always exhibits a power law behavior. The power law distribution indicates the absence of a characteristic size for the clusters sizes which, from the biological point of view, might reflect the lack of control mechanisms of cell replication allied to the stability of clusters. The transition in the growth regime exhibited by B16F10B cells suggests that the continued cell growth in culture may exert selective forces which destroy regulation mechanisms such as cell anchorage dependence and density-dependent growth.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Neoplasia.....	2
2.1.1 Biologia da célula tumoral	2
2.2 Metástases	7
2.3 Melanoma	9
2.4 Modelos de Estudo do Melanoma.....	11
2.5 Caracterização de padrões de crescimento.....	13
2.5.1 Função de distribuição de tamanhos de agregados	15
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo geral.....	18
3.2 Objetivos específicos	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Cultura de células	19
4.1.1 Linhagens celulares	19
4.1.2 Manutenção das linhagens celulares <i>in vitro</i>	19
4.1.3 Dissociação das células	20
4.1.4 Criopreservação.....	20
4.1.5 Descongelamento	20
4.1.6 Contagem do número de células viáveis	20
4.1.7 Cinética de crescimento das células em cultura	21
4.2 Animais.....	21
4.3 Protocolos dos experimentos.....	22
4.3.1 Transplante subcutâneo.....	22
4.3.2 Transplante endovenoso.....	22
4.3.3 Estabelecimento das sublinhagens celulares	23
4.3.4 Medida do volume tumoral	24
4.3.5 Análise histopatológica.....	25

4.3.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	26
4.3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	27
4.3.8 Plaqueamento das células em lamínulas	27
4.3.9 Método de contagem das células.....	28
4.3.10 Quantificação e estabelecimento do regime de crescimento das células B16F10 e das sublinhagens derivadas	30
4.3.11 Registro Fotográfico	31
5 RESULTADOS	32
5.1 Tumor primário	32
5.2 Metástases Pulmonares	32
5.2.1 Metástases pulmonares derivadas da inoculação endovenosa de células B16F10	33
5.2.2 Metástases pulmonares derivadas da inoculação endovenosa de células B16F10B.....	34
5.3 Sublinhagens derivadas de B16F10	35
5.3.1 Análise morfológica e descrição do comportamento <i>in vitro</i> das sublinhagens derivadas de B16F10	35
5.3.2 Cinética de crescimento da linhagem B16F10 e das sublinhagens derivadas <i>in vitro</i>	41
5.4 Análise Histopatológica	42
5.4.1 Tumor primário.....	42
5.4.2 Metástases pulmonares	44
5.5 Análise ultraestrutural - Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)....	46
5.5.1 Células B16F10 cultivadas <i>in vitro</i>	46
5.5.2 Células B16F10B cultivadas <i>in vitro</i>	47
5.5.3 Tumor subcutâneo derivado da inoculação das células B16F10	49
5.5.4 Pulmão controle	52
5.5.5 Metástases pulmonares derivadas de B16F10 – Células B16F10M.....	54
5.5.6 Metástases pulmonares derivadas de B16F10B – Células B16F10BM	54
5.6 Análise ultraestrutural – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	57
5.6.1 Células B16F10.....	57
5.6.2 Células B16F10B	60
5.7 Padrões de crescimento.....	64
6. DISCUSSÃO	69
6.1 Estabelecimento das sublinhagens e características morfológicas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>.....	69
6.2 Regimes de crescimento.....	75

7 CONCLUSÕES	79
8 PERSPECTIVAS	80
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
ANEXO I.....	94
ANEXO II.....	99
ANEXO III.....	105

1 INTRODUÇÃO

O câncer pode ser entendido como uma falha nos processos homeostáticos normais relacionados com a proliferação, diferenciação, quiescência celular e apoptose. O melanoma, tumor maligno que surge dos melanócitos, células pigmentadas especializadas que são encontradas predominantemente na pele, corresponde à quarta causa de morte entre pacientes com câncer (INCA, 2011). Por meio de um complexo sistema de fatores de crescimento e moléculas de adesão celular, os queratinócitos controlam o crescimento e o comportamento dos melanócitos. A perda desse controle leva ao desenvolvimento do melanoma (HAASS *et al.*, 2004; 2005). Durante a progressão tumoral, células tumorais sofrem alterações moleculares ou aumento da capacidade de sobrevivência, proliferação, capacidade de invasão e formação de metástases. O conhecimento sobre a biologia do melanoma pode auxiliar no entendimento de mecanismos envolvidos na sua formação, o que é de fundamental importância, uma vez que esse câncer, que tem alto poder metastático, é frequentemente resistente às terapias (CHEN *et al.*, 2009; VILLANUEVA; HERLYN, 2009).

Modelos animais, assim como os métodos de cultura de células, têm auxiliado na elucidação de mecanismos envolvidos na interação entre fatores relacionados ao tumor e ao hospedeiro, e no desenvolvimento das neoplasias. Modelos *in vitro* e *in vivo* têm sido amplamente utilizados no estudo do melanoma e constituem ferramentas indispensáveis para a elucidação dos principais aspectos clínicos e biológicos dessa doença. Além disso, modelos matemáticos envolvendo a cinética de agregação celular associados com estratégias biológicas também podem auxiliar no melhor entendimento a respeito da biologia tumoral.

Desse modo, esta pesquisa tem por objetivo o isolamento e a caracterização morfológica e dos regimes de crescimento do melanoma murino B16F10 e de sublinhagens celulares dele derivadas após passagem *in vivo* em camundongos BALB/c. Essas sublinhagens podem representar um instrumento útil nas pesquisas sobre melanoma e, portanto, a caracterização dessas linhagens é necessária para o estabelecimento das possíveis relações desse modelo murino com o câncer humano, bem como para a compreensão dos fenômenos de invasão e metástases.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neoplasia

A proliferação, diferenciação e apoptose celular são processos normais que ocorrem durante a vida do indivíduo. A desregulação desses processos pode resultar em um crescimento celular autônomo e diminuição ou perda da diferenciação e apoptose celular que, no conjunto, recebem o nome de neoplasia.

As neoplasias, segundo critérios clínicos, morfológicos (macro e microscópicos) e comportamento biológico são divididas em duas categorias: benignas e malignas.

As neoplasias benignas geralmente são formadas por células bem diferenciadas e que, por possuírem baixo índice mitótico, permitem o desenvolvimento de vasos sanguíneos, o que garante uma nutrição adequada ao tumor. Sendo assim, ocorrem poucas áreas de necrose ou hemorragia no parênquima tumoral e, além disso, a lesão apresenta um crescimento expansivo que gera uma compressão de estruturas adjacentes ao tumor. Em consequência, ocorre a formação de uma pseudocápsula fibrosa, o que faz com que a lesão seja bem delimitada. Por isso, o tumor benigno apresenta recidiva negativa quando é extirpado cirurgicamente (STRICKER; KUMAR, 2010; BRASILEIRO FILHO *et al.*, 2011).

Neoplasia maligna (câncer ou tumor maligno) refere-se às várias formas de doenças de etiopatogenia multifatorial dependente da constituição genética, do ambiente e do estilo de vida do indivíduo (WEINBERG, 1996). Segundo estimativas da *International Agency Research on Cancer – IARC* (2011) (<http://globocan.iarc.fr/>), surgem, por ano, mais de 12 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo. No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer – INCA (2011) (<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010>), a doença já é a segunda causa de morte.

Para se transformar em uma célula cancerosa, uma célula normal deve sofrer determinadas mutações e adquirir algumas capacidades funcionais características que permitem à célula cancerosa sobreviver, multiplicar e disseminar. Essas funções são adquiridas em diferentes tipos de tumores por meio de mecanismos distintos e em várias fases da tumorigênese. Essas propriedades da célula tumoral maligna serão discutidas nas seções seguintes.

2.1.1 Biologia da célula tumoral

Para se transformar em uma célula maligna, uma célula normal deve sofrer determinadas mutações e adquirir algumas características como: autossuficiência de sinais externos para ativar o ciclo celular, insensibilidade a sinais antiproliferativos,

imortalidade replicativa (síntese continuada de telomerase), angiogênese sustentada, reprogramação do metabolismo energético, evasão dos mecanismos de apoptose, da senescência e do sistema imune, e capacidade de invadir e metastatizar. Além dessas alterações, duas características podem influenciar positivamente o crescimento tumoral: a instabilidade genômica e a inflamação (WEINBERG; HANAHAN, 2011).

As células malignas respondem às pressões seletivas as quais são submetidas. Ocorre acúmulo de mutações atingindo os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Os proto-oncogenes (genes promotores do crescimento celular) mutados transformam-se em oncogenes, que se caracterizam por promover o crescimento celular na ausência de sinais proliferativos normais. Os genes supressores de tumores, apesar do nome, não têm a função de inibir (suprimir) o surgimento de tumores, esse nome se deve ao fato de que, em células normais, esses genes regulam negativamente o crescimento celular. Se esses genes estiverem mutados surge a possibilidade do aparecimento de tumores. Dois exemplos de genes supressores de tumores são os que codificam as proteínas Rb e p53; elas funcionam direcionando a célula para proliferar ou, alternativamente, ativar programas de senescência e apoptose (HANAHAN; WEINBERG, 2011). As células cancerosas ultrapassam a senescência pela inativação de rotas de sinalização celular chaves, como as da Rb e p53 (SCHOPFER *et al.*, 2007). Em um tecido normal, múltiplos sinais antiproliferativos operam mantendo a interrupção temporária do ciclo celular (quiescência) para corrigir falhas detectadas nos pontos de checagem, induzindo a interrupção permanente do ciclo celular (senescência) ou ativando a morte celular programada (apoptose). Portanto, a partir desses mecanismos, a homeostase do tecido pode ser mantida, pois esses sinais inibidores do crescimento podem bloquear a proliferação celular. Células cancerosas evadem a esses sinais antiproliferativos para poder prosperar (COLLADO; SERRANO, 2010; KUMAR *et al.*, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Assim, as oncoproteínas desprovidas de elementos reguladores, internos e externos, tornam-se constitutivamente ativas, o que capacita a célula a ser autossuficiente no crescimento.

A senescência corresponde ao estado em que as células estão viáveis, mas não são proliferativas, pois permanecem na fase G1. Normalmente ocorre em condições de estresse celular, tais como a diminuição do telômero e danos no DNA (SERRANO *et al.*, 1997; COLLADO *et al.*, 2007; COLLADO; SERRANO, 2010; WEINBERG; HANAHAN, 2011).

A indução da expressão do oncogene (ras) com a inativação de genes supressores de tumor (p53 ou p16) podem transformar células normais em tumorigênicas em modelos de roedores (SERRANO *et al.*, 1997). Entretanto, células que expressam altos níveis de oncoproteínas (RAS, MYC, RAF) podem entrar em

senescência e/ou apoptose dependendo da atuação das proteínas expressas pelos genes supressores de tumor. Ao contrário, células que expressam baixos níveis dessas proteínas podem evadir da senescência e proliferar (SERRANO *et al.*, 1997; COLLADO; SERRANO, 2010; WEINBERG; HANAHAN, 2011). A elevação da sinalização proliferativa feita por oncoproteínas pode provocar neutralização das respostas das células, principalmente a indução da senescência celular e/ou apoptose. Mas algumas células cancerosas podem se adaptar aos altos níveis de sinalização oncogênica por desabilitar seus circuitos de senescência ou de apoptose induzida. Assim, além da capacidade de indução e manutenção de sinais estimulatórios do crescimento, as células cancerosas devem também contornar os programas que regulam negativamente a proliferação celular. Muitos desses programas dependem da ação de genes supressores de tumores, que operam de várias formas, evitando o crescimento e a proliferação celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Em cultura, a senescência é dependente do número de duplicações celulares bem como das condições *in vitro*. Ou seja, a senescência não é um processo passivo que depende apenas do número de divisões celulares, mas responde ativamente a estímulos mitogênicos agressivos (SERRANO *et al.*, 1997).

Cânceres são frequentemente compostos de populações de células heterogêneas que podem ser definidas por expressão diferencial de marcadores de superfície celular e pela capacidade de propagar tumores em modelos murinos. Postula-se que somente poucas células das populações dentro de um tumor heterogêneo têm a capacidade de proliferar e, conseqüentemente, manter a heterogeneidade tumoral. Essas subpopulações de células tumorigênicas são chamadas de células tronco do tumor ou células propagadoras do tumor (COLLADO *et al.*, 2007; HELD *et al.*, 2010; RAMBOW; LARUE, 2010; ALISON *et al.*, 2010).

Quando cultivadas *in vitro*, as células cancerosas apresentam comportamentos específicos. Por exemplo, se apresentam imortalizadas (tem número indefinido de divisões celulares) devido à grande atividade da enzima telomerase, aliada à evasão da apoptose. Outra característica importante é a perda da inibição por contato. As células normais, em cultura bidimensional, multiplicam-se formando monocamadas, e param de crescer quando as membranas celulares se tocam. Nesse momento, a cultura de células entra em um estágio de confluência, parando então de se dividir.

Porém, essa inibição por contato é abolida em várias células tumorais cultivadas *in vitro*, onde as células cancerosas continuam se multiplicando mesmo depois de atingirem a confluência. A partir desse momento, começam a formar pilhas de células sobrepostas. Essa alteração apresentada pelas células tumorais pode ser decorrente do processo de tumorigênese (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

As células cancerosas têm uma menor necessidade de soro em relação às células normais, devido à menor necessidade de fatores de crescimento, já que as células cancerosas podem sintetizar alguns de seus próprios fatores de crescimento, além dos receptores correspondentes num mecanismo de estimulação autócrina. Além disso, apresentam independência de ancoragem; células normais em cultura necessitam de uma superfície sólida para crescerem, já as células cancerosas podem se multiplicar em superfície gelatinosa como o ágar mole. As células normais por crescerem bem aderidas ao substrato normalmente têm um formato achatado, já as células malignas, por serem menos aderentes entre si e com o substrato, desprendem-se com maior facilidade e, em geral, são esféricas (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 2011).

Alterações nas vias metabólicas correspondem a importantes características bioquímicas da célula tumoral. O metabolismo da célula cancerosa é dirigido fundamentalmente para a manutenção de sua elevada taxa de divisão celular. Há, além do crescimento autônomo, um ajuste na via de obtenção de energia. As células normais geram energia na glicólise e na fosforilação oxidativa que ocorre nas mitocôndrias, porém, quando em situação de hipóxia, essas células favorecem a glicólise. As células malignas, mesmo em condições favoráveis de oxigênio, podem reprogramar o metabolismo de glicose direcionando-o para a geração de energia em nível de substrato. Ou seja, o metabolismo é direcionado para a glicólise “anaeróbica”.

A menor eficiência na geração de ATP pode ser compensada pelo maior número de receptores para a glicose que as células cancerosas expressam. Essa propriedade pode gerar uma vantagem evolutiva, uma vez que o microambiente tumoral, especialmente o centro do tumor geralmente, é pouco vascularizado, gerando um ambiente hipóxico. Uma maior concentração de lactato nas células malignas gera um ambiente com pH reduzido que pode propiciar uma vantagem ao crescimento do tumor, por exemplo, por induzir síntese de ácido hialurônico e por causar uma desestruturação na arquitetura normal do tecido, o que colabora com o processo de invasividade; e por gerar um ambiente desfavorável à atividade das células de defesa (RUDRABHATLA *et al.*, 2006; McCARTY; WHITAKER, 2010; KUMAR *et al.*, 2010; VASQUEZ *et al.*, 2010; LOCASALE; CANTLEY, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Além disso, as células cancerosas captam com grande avidéz aminoácidos utilizados na síntese de proteínas, e metabólitos intermediários como ácidos graxos (LOCASALE; CANTLEY, 2010).

Pelo exposto, pode-se perceber que as células cancerosas diferem das normais em muitos aspectos importantes, incluindo-se, além da perda de diferenciação, a crescente invasividade, a diminuição da sensibilidade às drogas e as alterações no material genético, tais como perda ou ganho de cromossomos e uma

variedade de outras aberrações cromossômicas. Além de alterações mutacionais, alterações epigenéticas também servem de base às alterações celulares e bioquímicas que contribuem para o fenótipo maligno tanto *in vivo* quanto *in vitro* (HANAHAN; WEINBERG, 2001; LI *et al.*, 2002; KAMB, 2003; SEFTOR *et al.*, 2005; ESTELLER, 2006; MOASSER, 2007).

Histopatologicamente, as neoplasias malignas podem apresentar células desde bem diferenciadas até anaplásicas sendo que, no último caso, ocorre perda completa das características morfológicas das células do tecido de origem. Segundo Stricker e Kumar (2010), geralmente as taxas de crescimento dos tumores se correlaciona com seu nível de diferenciação e, portanto, a maioria dos tumores malignos cresce mais rapidamente do que as lesões benignas. A diminuição da diferenciação frequentemente se correlaciona a alterações morfológicas características das células cancerosas, tais como:

- ✓ Pleomorfismo celular – ocorre uma variação na morfologia tanto na forma, quanto no tamanho da célula. Dentre as células que formam o parênquima tumoral encontram-se desde células grandes até células pequenas;
- ✓ Morfologia nuclear – ocorre também um pleomorfismo nuclear, com núcleos hipercromáticos (cromatina abundante), razão núcleo-citoplasma aumentada, formato nuclear irregular e presença de um ou mais núcleo e nucléolo;
- ✓ Mitoses – Comparativamente aos tumores benignos, os tumores malignos mais indiferenciados normalmente apresentam grande número de mitoses, as assimétricas, onde se podem observar fusos tripolares; e
- ✓ Apoptose – é um processo de morte celular seletivo envolvido no desenvolvimento e manutenção da homeostase de tecidos e órgãos e na eliminação de células que sofreram danos excessivos. O programa de apoptose pode ser deflagrado quando uma célula passa por estresse fisiológico, como ocorre com as células tumorais durante a tumorigênese (níveis elevados de oncoproteínas, danos ao DNA). Porém, as células cancerosas desenvolveram vários mecanismos para limitar ou se evadir da apoptose. Um dos mecanismos mais comuns é a perda do gene supressor de tumor, TP53, o qual culmina com a eliminação de um sensor extremamente importante para a indução da apoptose. Outras células aumentam a expressão de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-x_L), ou ainda diminuem a expressão de reguladores pró-apoptóticos (Bim, Bax).

Em decorrência dessa maior taxa de crescimento, a angiogênese, mesmo aumentada, não é suficiente para suprir a demanda energética da massa tumoral, sendo assim, podem ocorrer degenerações, necroses, hemorragias e ulcerações nos tumores malignos (MOASSER, 2007).

No processo de malignização, alterações na adesividade entre as células (HAASS *et al.*, 2004; MARET *et al.*, 2010), a perda da inibição por contato (HANAHAN; WEINBERG, 2011) e o maior desenvolvimento de seu citoesqueleto permitem que as células malignas tenham uma mobilidade considerável. Como são menos aderentes entre si, as células malignas podem infiltrar os tecidos adjacentes e, por isso, há uma imprecisão dos limites da lesão, o que torna a remoção total do tumor muito difícil. Sendo assim, os tumores malignos podem apresentar recidiva frequente. Alguns fatores envolvidos na menor adesividade das células neoplásicas malignas, segundo Brasileiro Filho *et al.* (2011), são: (1) modificação e irregularidade do mosaico estrutural da superfície da célula tumoral; (2) número escasso (alteração ou ausência) de estruturas juncionais; (3) redução de moléculas de adesão intercelulares, como as caderinas; (4) diminuição da produção de fibronectina, que fixa as células ao interstício; (5) grande eletronegatividade da face externa da membrana plasmática, tornando mais intensa do que o habitual a repulsão eletrostática entre as células; (6) redução do íon Ca^{++} nas células, que, em condições normais, atuam neutralizando as cargas negativas; (7) liberação, pelas células cancerosas, de enzimas proteolíticas que alteram o glicocálice das células vizinhas, enfraquecendo sua adesão; (8) irregularidade da superfície da membrana das células tumorais (presença de microvilosidades irregulares), diminuindo a área de contato entre as células; e (9) aumento do ácido siálico nas proteínas da membrana plasmática, que diminui a adesividade das células ao colágeno e à fibronectina.

As alterações apresentadas pelas células cancerosas as tornam menos aderentes entre si, permitindo-lhes movimentar mais facilmente, *infiltrar* tecidos adjacentes, penetrar nos vasos sanguíneos e linfáticos e, a partir desses, alcançar locais distantes, ou seja, *metastatizar*.

2.2 Metástases

Ao longo do desenvolvimento do tumor surgem subpopulações com características diferentes, resultado da instabilidade genética e do acúmulo de várias mutações em diferentes células. Esse evento é conhecido como heterogeneidade do tumor e influencia o crescimento tumoral, uma vez que as subpopulações capazes de burlar os obstáculos a que forem submetidos são selecionadas ao longo do tempo (STRICKER; KUMAR, 2010).

Durante a progressão tumoral, uma subpopulação de células do tumor primário sofre alterações moleculares que a capacita a separar-se da colônia, sobreviver, proliferar, invadir os tecidos vizinhos normais e frequentemente formar tumores secundários ou metástases (FIDLER, 1978; GUPTA; MASSAGUÉ, 2006).

A invasão das células malignas ocorre quando septos invasivas escapam do tumor primário, penetram a lâmina basal e invadem os tecidos adjacentes. A metástase ocorre quando células do tumor invadem o tecido adjacente ao sítio de crescimento, e se estabelecem em um microambiente que fica distante do tumor primário. Porém, nem todo tumor que é invasivo é também metastático (FIDLER, 2003).

O processo de metástases ocorre em vários passos que compreendem: a perda da adesão celular; o aumento da motilidade e invasividade no tecido adjacente ao sítio de crescimento tumoral; a entrada das células metastáticas nos vasos sanguíneos ou linfáticos, sobrevivência na circulação; e a saída dessas células dos vasos e estabelecimento de uma massa tumoral em um local distante do sítio de crescimento primário (FIDLER, 1978; CHAMBERS *et al.*, 2002; FIDLER, 2003; GUPTA; MASSAGUÉ, 2006; LÄUBLI; BORSIG, 2010; CHAFFER; WEINBERG, 2011). Para que esses passos obtenham sucesso, se faz necessário que o tumor primário disponha de suprimento sanguíneo (angiogênese) suficiente para atender as necessidades metabólicas tumorais. Esses novos vasos formados a partir da estimulação das próprias células tumorais podem servir também como rota de escape das células metastáticas (CHAMBERS *et al.*, 2002; JOYCE; POLLARD, 2009; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Para ocorrer as metástases, as células metastáticas que invadem o tecido adjacente apresentam alterações morfológicas na adesão intercelular e na interação com a matriz extracelular (MEC). O destacamento das células do tumor original se deve, em grande parte, à baixa adesividade entre elas, além de alterações nas classes de moléculas de adesão expressas por essas (LI *et al.*, 2002; HAASS *et al.*, 2004; MARET *et al.*, 2010). Uma vez destacadas da massa tumoral, o deslocamento das células pela matriz extracelular é possível graças à ação de enzimas proteolíticas liberadas pela própria célula tumoral ou pelas células estromais do tecido invadido (em resposta à estimulação tumoral) ou, ainda, por células inflamatórias (FIDLER, 1978; JOYCE; POLLARD, 2009; KUMAR *et al.*, 2010).

Após invadir o tecido adjacente, as células metastáticas alcançam os vasos sanguíneos (principal rota de disseminação), realizam o processo de intravasão e, uma vez dentro dos vasos, precisam sobreviver a vários desafios, tais como o choque mecânico causado pelo atrito com o sangue circulante e o ataque das células do sistema imune. Porém, a interação das células tumorais com as plaquetas circulantes pode aumentar as chances de sobrevivência dessas células. Esse agregado de plaquetas protege as células metastáticas, por exemplo, da lise mediada pelas células matadoras naturais (*natural killer* - NK) (JOYCE; POLLARD, 2009). Uma vez vencidas as barreiras encontradas nos vasos sanguíneos, as células metastáticas realizam a

extravasão em um tecido secundário, onde devem se estabelecer, sobreviver e crescer.

Para que o estabelecimento da metástase seja possível, faz-se necessário que as células do tumor encontrem um microambiente propício, ou seja, apresente condições que permitam que as células metastáticas possam aderir e proliferar (CHAMBERS *et al.*, 2002; FIDLER, 2003; JOYCE; POLLARD, 2009). O próprio tumor primário pode criar um ambiente pré-metastático adequado ao crescimento secundário por liberar fatores angiogênicos e àqueles que contribuem para a invasão, como as metaloproteases (HIRATSUKA *et al.*, 2002). Outro fator que pode auxiliar no processo de estabelecimento das células tumorais em locais distantes é a associação de componentes do estroma do tumor primário (fibroblastos, por exemplo) com as células metastáticas. Quando essa “colônia” sobrevive à circulação sanguínea e ao ataque das células do sistema imune alcançando o órgão-alvo, os fibroblastos podem produzir fatores angiogênicos que, por sua vez, podem auxiliar no estabelecimento do novo tumor (DUDA *et al.*, 2010). A produção de citocinas e seus receptores, em resposta ao crescimento tumoral, também tem sido considerada importante não apenas na progressão do tumor como na determinação e preparação do órgão alvo para as metástases (KIM *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2011).

As metástases são a principal causa da morbidade e mortalidade associadas ao câncer. Sendo assim, o seu estabelecimento antes da detecção do tumor primário torna o tratamento clínico para o tumor pouco eficaz, ao contrário, quando mais precocemente o tumor primário for detectado maiores as chances de um tratamento cirúrgico ou por radioterapia ser eficiente. (FIDLER, 1978; LI *et al.*, 2002; CHAMBERS, *et al.*, 2002; LÄUBLI; BORSIG, 2010; CHAFFER; WEINBERG, 2011)

2.3 Melanoma

O melanoma é uma neoplasia relativamente comum e de alta letalidade, que tem origem nas células produtoras de melanina, os melanócitos, que, por sua vez, são derivados de células pluripotentes da crista neural. Embora preponderantemente o melanoma se origine na pele, outros sítios de origem incluem superfícies de mucosa anogenital, oral, esôfago, meninges, ouvido interno, mucosa oral, nasofaringe e olho (HOUGHTON *et al.*, 2001; GOVINDARAJAN *et al.*, 2007; VILLANUEVA; HERLYN, 2009). Durante a embriogênese, células da crista neural migram para a pele e demais órgãos onde se diferenciam em melanócitos maduros capazes de produzir o pigmento melanina, que funciona como um fator protetor do DNA contra efeitos deletérios causados pela radiação ultravioleta (UV) (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007; RAPOSO; MARKS, 2007; VILLANUEVA; HERLYN, 2009).

Sob condições fisiológicas, os melanócitos formam a “unidade melanina” com queratinócitos na epiderme. Cada melanócito estende seus dendritos para a camada superior na epiderme transportando os melanossomos, contendo melanina, para aproximadamente 35 queratinócitos (BOGIRIEDER *et al.*, 2003). O equilíbrio entre os melanócitos e queratinócitos é mantido por meio de fatores que induzem a divisão dos melanócitos. Durante a proliferação, os melanócitos se desaderem dos queratinócitos, retraem seus dendritos, se dividem e migram pela membrana basal antes de voltarem a se associar com os queratinócitos. O crescimento do melanócito é controlado pelo queratinócito adjacente, utilizando a comunicação extracelular por meio de fatores parácrinos; comunicação intracelular segundo mensageiros e transdução de sinais, e comunicação intercelular por meio de moléculas de adesão célula-célula, célula-MEC e junções tipo *gap*. Uma desregulação nesse processo pode causar um desequilíbrio na proliferação dos melanócitos, o que pode levar ao desenvolvimento de um melanoma (HAASS *et al.*, 2004; 2005).

O melanoma é uma neoplasia que apresenta normalmente um crescimento radial e, quando as células sofrem alterações genéticas, adquirem capacidade de invadir (crescimento vertical), induzir angiogênese e metastatizar, o que leva normalmente a recorrência da lesão e morte do paciente (GOVINDARAJAN *et al.*, 2007).

Embora represente apenas 4% dos tipos de câncer de pele (INCA, 2011), o melanoma é considerado o mais grave devido à sua alta possibilidade metastática. Lesões com poucos milímetros de espessura mostram um alto potencial para metastatizar (JAEGGER *et al.*, 2007). Desse modo, acredita-se que esse potencial do melanoma esteja relacionado ao fato de os melanócitos serem células com alta capacidade de se movimentar (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007).

De acordo com dados da IARC (2011), estima-se que a incidência do melanoma cutâneo seja em torno de 199.000 novos casos por ano. No Brasil, foram estimados para 2010, segundo a Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer do Instituto Nacional do Câncer - INCA (INCA, 2011), que o melanoma cutâneo atingiria quase 6000 novos casos entre homens e mulheres.

O prognóstico desse tipo de câncer pode ser considerado bom se detectado nos estádios iniciais. Nos últimos anos houve uma grande melhora na sobrevivência dos pacientes com melanoma, principalmente devido à detecção precoce do mesmo.

Em termos de estrutura celular, a principal diferença entre células cancerosas de melanoma e não melanoma está no fato de a primeira possuir melanossomos, organelas celulares relacionadas aos lisossomos, adaptadas para a síntese da melanina. Essa organela também está envolvida na eliminação de intermediários

citotóxicos que são produzidos durante a melanogênese (PAK *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2006; 2009).

Os melanossomos formam-se por uma série de estágios definidos morfológicamente pela eletrondensidade de seu conteúdo. Nos dois primeiros estágios de maturação, I e II há falta de pigmento, porém os melanossomos (pré-melanossomos) são caracterizados pela presença de fibrilas proteicas intraluminais que começam a se formar no estágio I e são concluídas no estágio II. Uma vez formadas as fibrilas, começa a ocorrer a síntese de melanina que é depositada naquelas (estágio II). Assim, melanossomos nos estágios III começam a apresentar um espessamento e escurecimento e no estágio IV apresentam maior eletrondensidade caracterizada pela presença de melanina (RAPOSO *et al.*, 2001; RAPOSO; MARKS, 2007; HURBAIN *et al.*, 2008).

O melanoma é uma lesão cuja incidência é crescente e cujo tratamento quimioterápico conta relativamente com poucas opções realmente eficazes devido ao fato de as células do melanoma serem intrinsicamente resistentes a tratamentos, como a radiação e a quimioterapia (LI *et al.*, 2002; GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007; SCHATTON *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009; VILLANUEVA; HERLYN, 2009).

Estudos realizados por Kevin Chen *et al.* (2006; 2009) indicam que a intratabilidade do melanoma por meio de quimioterapia, bem como a resistência a multidrogas que o melanoma apresenta podem estar relacionadas aos melanossomos. Isso porque essa organela tem a propriedade de detoxicação, podendo sequestrar para o seu interior drogas com ação no DNA, como a cisplatina, impedindo o acúmulo da mesma no citoplasma e no núcleo. Esses estudos mostraram que em linhagens de células de melanoma tratadas com cisplatina havia um aumento na melanogênese e no número de melanossomos (CHEN *et al.*, 2006). Enzimas relacionadas à melanogênese, como a proteína 2 relacionada à tirosinase (TYRP2), podem estar associadas à resistência do melanoma ao tratamento por cisplatina, pois a expressão dessa proteína foi encontrada aumentada em células que apresentaram resistência a tratamentos multidrogas (PAK *et al.*, 2004). A superexpressão de inibidores da apoptose também foi relacionada à resistência, pois, além de aumentar a chance de sobrevivência da célula, também aumentaram a resistência a quimioterápicos (SOENGAS; LOWE, 2003; GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007).

2.4 Modelos de Estudo do Melanoma

A utilização de cultura de células como método de estudo tem permitido avanços no conhecimento da biologia da célula normal e alterada, podendo representar uma importante via para se obterem respostas acerca dos mecanismos

que controlam a proliferação celular e, conseqüentemente, o fenômeno neoplásico. As linhagens celulares constituem modelos experimentais adequados para, por exemplo, investigação da tumorigênese, sinalização celular, resposta a tratamentos, regulação gênica e caracterização de padrões de crescimento de células em cultura (VILELA *et al.*, 1995; 1998; MENDES *et al.*, 2001; RUDRABHATLA *et al.*, 2006; McCARTY; WHITAKER, 2010; ALVES; MARTINS, 2010). Modelos animais embora sejam por definição uma aproximação da realidade, são muito úteis em uma ampla variedade de estudos dentre os quais se incluem mutações gênicas, interações proteína-proteína, sensibilidade a compostos farmacológicos, imunoterapia e os processos de invasão de metástases, dentre outros (CULP *et al.*, 2006; TALMADGE *et al.*, 2007).

Existem alguns modelos para o estudo do melanoma, como os murinos, que possibilitam um melhor entendimento dessa neoplasia e de seu desenvolvimento (HA *et al.*, 2005; CULP *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2006; BOLLLOS *et al.*, 2008). As linhagens de melanoma murinho, como B16, K1735, Cloudman S91-M3 e suas sublinhagens, são altamente tumorigênicas e frequentemente usadas como modelos de crescimento tumoral *in vivo*. A linhagem K1735 se desenvolve em camundongos C3H por meio da indução por radiação ultravioleta, a linhagem Cloudman S91-M3 se desenvolve espontaneamente em camundongos DBA/2 e a linhagem B16 cresce espontaneamente em camundongos C57BL/6 (FIDLER, 1973; PETER *et al.*, 2001; ZHAO *et al.*, 2001). A linhagem B16 parece ser menos invasiva que suas sublinhagens e a habilidade de formar metástases aumenta segundo a ordem: B16F0, B16F1 até B16F10 (POSTE *et al.*, 1982; ZHAO *et al.*, 2001; NAKAMURA *et al.*, 2002).

O estudo das várias etapas envolvidas na progressão tumoral pode ser feito utilizando modelos murinos de tumores de pele e apresentam boa similaridade com a neoplasia humana (VAN DYKE; JACKS, 2002; HA *et al.*, 2005). Para estudar as metástases, dois modelos têm sido mais utilizados: metástases experimentais produzidas pela *inoculação endovenosa* de células tumorais em camundongos singenéticos (FIDLER, 1973; 1975; HIRATSUKA *et al.*, 2002); metástases espontâneas que surgem por meio da injeção de células tumorais por *via subcutânea* em camundongos singenéticos. O modelo de metástases espontâneas apresenta maior similaridade com as metástases clínicas, porém o modelo experimental é mais reprodutível e menos tempo é necessário para validar um efeito anti-metastático para agentes químicos (NAKAMURA *et al.*, 2002).

Camundongos geneticamente imunodeficientes, como os NOD/SCID, têm sido utilizados para verificar a capacidade tumorigênica de células melanoma primário e metastático provenientes de transplantes, alogênicos, singênicos e xenogênicos. Transplantes entre animais singênicos são aqueles em que tanto o doador quanto o receptor são geneticamente idênticos (mesma linhagem). Os transplantes entre

animais alogênicos são aqueles em que o animal doador e o receptor são da mesma espécie, mas geneticamente diferentes (linhagens diferentes) e o transplante entre animais xenogênicos ocorre quando estes são de espécies diferentes (JANEWAY *et al.*, 2002). Na presente pesquisa, optou-se pela utilização de um modelo alogênico (BALB/c) para o desenvolvimento de um modelo de estudo do melanoma B16F10 (surgiu espontaneamente em camundongo C57BL/6). Porém, animais transgênicos podem ser usados para devolver melanoma metastático, com lesões que se desenvolvem após um período de latência ou que requerem indução física ou química (LARUE; BEERMANN, 2007).

Embora não se possa extrapolar diretamente para os seres humanos, os modelos murinos constituem ferramentas experimentais importantes que possibilitam, dentre outros, a obtenção de informações acerca da etiologia e progressão do melanoma em relação ao ambiente e a fatores genéticos, e o estudo de novas drogas e novas estratégias terapêuticas que podem fornecer subsídio para um tratamento clínico mais eficaz para essa neoplasia.

2.5 Caracterização de padrões de crescimento

A necessidade de se conhecer com clareza os mecanismos de formação de tumores tem sido justificada pela esperança da utilização desses conhecimentos para aperfeiçoar a prevenção, o diagnóstico, o prognóstico e o tratamento do câncer (LOPES, 2006). O estudo dos padrões de crescimento dos tumores pode fornecer informações sobre as interações entre as células e seu microambiente, bem como sobre os fenômenos de invasão e metástases, que são essenciais para ampliar o conhecimento sobre a biologia do câncer.

Modelos bi e tridimensionais que simulam a dinâmica de crescimento das células cancerosas têm sido desenvolvidos. Esses modelos são baseados em métodos de cinética de agregação e análises de escala. A inclusão de informações sobre subpopulações celulares com capacidades distintas é uma variável possível de ser adicionada ao modelo. Dessa forma, informações clinicamente importantes como as frações de células com habilidade de se dividir, de células não proliferativas, bem como a taxa de crescimento do tumor podem ser simulados (KANSAL *et al.*, 2000). Há modelos que incorporam dados sobre as células tumorais e a rede vascular, assim como a conexão entre ambas (KOHANDEL, 2007; SILVA; GATENBY, 2010). Outro modelo proposto simula a agregação celular, levando-se em conta duas características biológicas importantes para a formação dos agregados, a replicação celular e a motilidade influenciada pela quimiotaxia (ALVES; MARTINS, 2010). Devido ao fato de o crescimento tumoral ser um processo complexo, quanto mais

propriedades biológicas o modelo puder simular, mais características relacionadas à progressão tumoral poderão ser investigadas.

A descrição dos padrões de organização pode ser feita utilizando-se diferentes abordagens matemáticas, incluindo as topológicas, algébricas e geométricas (clássica ou fractal) (VILELA *et al.*, 1998; MENDES *et al.*, 2001; VILELA *et al.*, 2006; 2007; ALVES; MARTINS, 2010). Há fortes razões teóricas para usar a geometria fractal em medidas de sistemas biológicos, e estudos publicados têm mostrado evidências práticas para isso (WEIBEL, 1991; 1994; VILELA *et al.*, 1995; 1998; 2006; 2007; FERREIRA JR. *et al.*, 1998; 1999; MENDES *et al.*, 2001; BRÚ *et al.*, 2003; 2008; KHAIN; SANDER, 2006).

O conceito de dimensão fractal tem encontrado grande aplicabilidade nas ciências naturais, a saber: metalurgia, geologia, química orgânica, ciências dos materiais, botânica e medicina. Portanto, é grande o potencial de uso da geometria fractal na descrição e no entendimento dos organismos biológicos, incluindo seu desenvolvimento e crescimento, seu *design* estrutural e suas propriedades funcionais. Ainda mais, os instrumentos da geometria fractal podem ser estendidos a situações onde ocorrerão alterações associadas a doenças e, portanto, contribuir para o entendimento de processos patológicos em medicina (CROSS *et al.*, 1992).

O câncer é caracterizado por possuir células de formato irregular as quais não encontram uma forma correspondente na geometria Euclidiana, que é baseada em formas suaves tais como a linha, esfera e o cilindro. Ao contrário, a geometria fractal pode descrever um objeto irregular pela análise de características que são comuns entre pequenas partes e o objeto inteiro (BAISH e JAIN, 2000).

A metodologia fractal tem se mostrado eficaz na classificação tumoral (LANDINI *et al.*, 1996a; 1996b; CROSS, 1997), para discriminar o crescimento de células normais e cancerosas em cultura (VILELA *et al.*, 1995; MENDES *et al.*, 2001; VILELA *et al.*, 2007). Por outro lado, Landini *et al.* (1996a) utilizaram a análise fractal na determinação do pleomorfismo nuclear de células normais e carcinomas orais, encontrando uma discriminação de 79% entre células normais e neoplásicas. Esses mesmos autores (LANDINI *et al.*, 1996b) observaram uma dimensão fractal crescente para a interface entre os tecidos epitelial e conectivo em lâminas histológicas da mucosa oral normal, displásica e com lesões malignas. Sedivy *et al.* (1999), utilizando a medida da dimensão fractal de núcleos para determinar a atipia nuclear no epitélio displásico, encontraram dimensões fractais crescentes com o aumento no grau de displasia.

2.5.1 Função de distribuição de tamanhos de agregados

Os mecanismos básicos de crescimento de um sistema (físico ou biológico) podem ser caracterizados quantitativamente. Dois instrumentos quantitativos usados para caracterizar imagens digitalizadas de objetos naturais ou gerados por computador são, a dimensão fractal, D_f , e a função de distribuição de tamanhos de aglomerados, $n_s(t)$ (BAISH; JAIN, 2000; MENDES, 2001).

A função de distribuição de tamanho de aglomerados é um bom discriminante para o crescimento de células em cultura, uma vez que, cada célula pode dividir-se ou, ainda, cada célula ou grupo de células pode mover-se sobre a superfície em que está crescendo, e agregar-se com outras colônias de células formando grandes aglomerados fractais. Os vários aglomerados fractais aumentam não apenas por meio de novas divisões, mas também pela agregação de novas células que se movem em sua direção, e quando esses são suficientemente grandes, pela fusão de aglomerados adjacentes. Como resultado, tanto o número quanto o tamanho dos aglomerados variam no decorrer do tempo (VILELA *et al.*, 1995). É essa dinâmica do processo de formação/desagregação de células em cultura que pode ser medida pela função de distribuição de tamanhos de agregados $n_s(t)$.

A função de distribuição do tamanho de aglomerados $n_s(t)$ é a fração de aglomerados observados no conjunto de todos os aglomerados presentes que, no tempo t , são constituídos de s células. Matematicamente:

$$n_s(t) = \frac{\text{número de agregados com } s \text{ células}}{\text{número total de agregados presentes}} = \frac{N_s(t)}{\sum_{s=1}^{\infty} N_s(t)}$$

A importância da função de distribuição de tamanhos de aglomerados é dupla: em primeiro lugar, $n_s(t)$ exhibe leis de escala características. Em vários fenômenos de crescimento fractal no mundo inorgânico, $n_s(t)$ exhibe um decaimento em lei de potência (VICSEK, 1992).

Em segundo lugar, todas as quantidades físicas macroscópicas, tais como o tamanho médio ou o número total de aglomerados no sistema, podem ser calculados tomando-se médias sobre essa função de distribuição.

As leis de escala para a agregação de células em cultura possuem uma clara implicação biológica: as funções de distribuição de tamanhos de aglomerados $n_s(t)$ devem refletir a dinâmica de como as células se multiplicam em cultura, ou seja, a divisão e o movimento das células, a importância da comunicação química entre elas, a natureza da adesão celular e como eventos ocorridos anteriormente afetam o seu

comportamento futuro, incluindo-se a divisão celular (FERREIRA JR. *et al.*, 1998; 1999; ALVES; MARTINS, 2010).

Os padrões de crescimento de várias linhagens celulares foram caracterizados utilizando a distribuição de tamanhos de agregados celulares, formados a partir do plaqueamento de células isoladas sobre lamínulas de vidro colocadas na base de placas de cultura de células de 24 poços. Os resultados mostraram que células HN-5 (cancerosas) apresentaram tanto em monocamada quanto em gel de colágeno, distribuições regidas por leis de potência, durante todo o tempo que permaneceram em cultura, enquanto que em células MDCK (normais) e HEp-2 (cancerosas) observou-se uma transição de um comportamento exponencial para um regido por uma distribuição em leis de potência. Tal fenômeno foi chamado de transição fenotípica.

Esses resultados sugerem que as transições nos regimes de crescimento de MDCK e HEp-2 podem estar associadas a alterações epigenéticas no controle da replicação ou nos padrões de expressão de moléculas de adesividade celular de junções célula-célula ou célula-matriz extracelular, relacionadas com sinalização intracelular (MENDES *et al.*, 2001; FERREIRA JR. *et al.*, 2003; ALVES; MARTINS, 2010).

Transições fenotípicas consistem de mudanças, permanentes ou não, no fenótipo, que podem surgir de maneira espontânea ou induzida, resultantes de alterações no material genético ou na expressão de genes. Além disso, podem ser caracterizadas pela variação de diferentes propriedades celulares, como taxa de crescimento, padrão de crescimento, formação de produtos especializados, longevidade, tumorigenicidade e expressão diferenciada de proteínas (FRESHNEY, 2000). O estudo de transições fenotípicas poderá permitir a compreensão de mecanismos de transformação celular envolvidos em processos patológicos, como calcificação vascular, fibrose renal e câncer. Uma transição fenotípica pode ocorrer em razão de situações de estresse, como elevado número de células em cultura em um espaço reduzido, ou alterações de pH e constituintes do meio, entre outras possibilidades.

Para entender fenômenos complexos como o câncer, o uso de modelos matemáticos associados com estratégias biológicas pode auxiliar no melhor entendimento a respeito da biologia tumoral. Esse conhecimento pode permitir intervenções em vias metabólicas ou servir de base para o desenvolvimento de programas de computador que auxiliem a encontrar as doses adequadas, horários e a sequência mais apropriada no uso de terapias combinadas para controlar, ou mesmo eliminar o crescimento do tumor (KOHANDEL *et al.*, 2007; HUERGO *et al.*, 2010, LOCASALE; CANTLEY, 2010), bem como auxiliar no entendimento dos mecanismos

de migração celular, dentre outros (STOLARSKA *et al.*, 2011). Sendo assim, um melhor entendimento das características morfológicas e das leis que regem o crescimento de melanomas experimentais podem ser ferramentas úteis no entendimento da biologia dos melanomas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral estabelecer um modelo de crescimento do melanoma murino B16F10 em camundongos não singenéticos (BALB/c) às células B16F10.

3.2 Objetivos específicos

- a) Estabelecer em camundongos BALB/c um modelo de crescimento de tumor subcutâneo B16F10;
- b) Isolar uma sublinhagem de B16F10 a partir de tumores subcutâneos em camundongos BALB/c;
- c) Estabelecer um modelo de crescimento de metástases pulmonares em camundongos BALB/c a partir da inoculação endovenosa das células B16F10;
- d) Isolar sublinhagem celular a partir de metástases em camundongos BALB/c;
- e) Realizar um estudo histopatológico comparativo entre tumores primários subcutâneos e metastáticos crescidos em camundongos BALB/c;
- f) Caracterizar ultra estruturalmente as células B16F10 e B16F10B; e
- g) Determinar a função de distribuição $n_s(t)$ e estudar as leis de escala que governam os padrões de crescimento de linhagens celulares de melanócitos cancerosos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de células

4.1.1 Linhagens celulares

A linhagem celular B16F10 (melanoma murino), bem como sublinhagens dela derivadas denominadas de B16F10B, B16F10M e B16F10BM, foi utilizada no presente estudo.

A linhagem celular B16F10 é derivada de melanoma murino que surgiu espontaneamente em um camundongo C57BL/6. Foi originalmente estabelecida por Fidler (1975) e gentilmente cedida pela Dra. Miriam Galvona Jasiulionis, do Departamento de Imunologia e Farmacologia (INFAR) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

A sublinhagem celular B16F10B é derivada da linhagem B16F10 após uma passagem dessa *in vivo* em camundongos BALB/c, sendo isolada de tumores primários induzidos nesses camundongos.

Já a sublinhagem celular B16F10M é derivada de nódulos metastáticos induzidos em camundongos BALB/c, crescidos a partir da inoculação endovenosa de células B16F10.

Por sua vez, a sublinhagem celular B16F10BM é proveniente da cultura de nódulos metastáticos induzidos em camundongos BALB/c, crescidos a partir da inoculação endovenosa de células B16F10B.

O protocolo de estabelecimento das sublinhagens está descrito no subitem 4.3.3.

4.1.2 Manutenção das linhagens celulares *in vitro*

A linhagem celular B16F10, assim como as sublinhagens derivadas, foi cultivada em meio de cultura completo (MC) ("Dulbecco's Modified Eagles Medium" – DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, em frascos de cultura de poliestireno, em incubadora a 37°C, 5% de CO₂ e 90% de umidade relativa. Quando as culturas atingiam a subconfluência, as células eram dissociadas, replaqueadas e mantidas nas condições acima descritas. As culturas foram periodicamente observadas em microscópio óptico de luz invertido (Leica, modelo DMIL).

4.1.3 Dissociação das células

Culturas de células subconfluentes, após descarte do meio de cultura, foram lavadas três vezes com tampão fosfato de sódio (PBS) e incubadas a 37°C com solução de tripsina 0,25% até que, sob observação microscópica, fosse detectada a dissociação das células entre si, e delas com o substrato. O procedimento era interrompido pela adição de MC. A suspensão celular era coletada, centrifugada (centrífuga Fanem Excelsa Baby II modelo 206-R) a 1500 rpm durante 5 minutos. O *pellet* resultante da centrifugação era ressuscitado em MC e as células contadas (ver 4.1.6). De acordo com a quantidade de células necessárias, a suspensão era dividida em frascos de cultura e mantida conforme as condições descritas no subitem 4.1.2.

4.1.4 Criopreservação

Quando necessário, alíquotas de células foram congeladas após dissociação de culturas subconfluentes. Após a adição de MC e lavagem das células por centrifugação (1500 rpm, 5 minutos), as células eram ressuscitadas em MC contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), e as suspensões celulares acondicionadas em criotubos, que permaneciam cerca de 12 horas à -80°C e eram posteriormente transferidos para o nitrogênio líquido (-196°C).

4.1.5 Descongelamento

Para o descongelamento, criotubos com células da linhagem celular de interesse eram mantidos a 37°C, durante 5 minutos. A suspensão celular era lavada, por centrifugação, em MC a 1500 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente, sendo posteriormente ressuscitadas em MC, após descarte do sobrenadante, e cultivadas em frascos de cultura.

4.1.6 Contagem do número de células viáveis

As contagens das células viáveis foram efetuadas em hemocitômetro de Neubauer após o carregamento de ambas as câmaras com a suspensão celular obtida após ressuspensão da cultura celular desejada. Para a determinação do número de células viáveis foi utilizado o teste de exclusão vital de corante, que consiste na incubação de uma alíquota de células com solução de Azul de Tripán a 0,1%, por dez minutos a 37°C. Células híidas excluem o corante. Para o cálculo da percentagem de células viáveis, utilizou-se a fórmula:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{Número de células viáveis}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

Para os experimentos foram utilizadas somente culturas com viabilidade superior a 95%.

4.1.7 Cinética de crescimento das células em cultura

O tempo de crescimento *in vitro* das células B16F10, B16F10B, B16F10BM e B16F10M foi determinado pela contagem do número total de células em intervalos de 24 horas. A Figura 14 mostra a curva de crescimento das linhagens celulares construídas a partir da média de duas contagens independentes. No dia em que as culturas celulares foram preparadas, denominado t_0 , 1×10^3 células diluídas em MC foram plaqueadas em 24 poços e incubadas em estufa úmida, contendo 5% de CO_2 a 37°C . A cada intervalo regular de 24 horas, 3 poços da placa de cultura foram submetidos ao procedimento de dissociação celular, conforme descrito no subitem 4.1.3. A suspensão celular obtida era ressuspendida em MC para a contagem do número de células viáveis (subitem 4.1.6). O tempo de crescimento foi calculado pela seguinte equação (PATTERSON, 1979 *apud* MANNI *et al.*, 2009):

$$T_d = (t_2 - t_1) * \log(2) / \log(q_2/q_1)$$

onde T_d é o tempo de duplicação; t é o tempo observado; q é a quantidade de células; e \log é o logaritmo na base 10.

4.2 Animais

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com idade entre 4 e 6 semanas, provenientes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa (UFV), foram mantidos no biotério do Departamento de Nutrição da UFV sob temperatura controlada (24°C), com livre acesso à alimentação (ração comercial para camundongos (Labina) e água e ciclos claro/escuro de 12 horas. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno com tampas gradeadas, forradas com serragem esterilizada. Foram mantidos, no máximo, 5 (cinco) animais por caixa.

A linhagem de camundongos BALB/c foi escolhida por estar acessível ao Laboratório do Câncer – DBA, local de desenvolvimento deste estudo, além disso, a linhagem C57BL/6, na época, não se encontrava disponível nos biotérios da UFV. As

fêmeas foram escolhidas por serem de mais fácil manuseio e haver menos atrito entre as mesmas quando ocorre o crescimento tumoral.

4.3 Protocolos dos experimentos

Um dos objetivos deste trabalho era obter tumores primários e metastáticos originados a partir da inoculação de células B16F10 em camundongo BALB/c. Nesse sentido, o trabalho foi dividido em duas etapas. A primeira etapa consistiu no transplante subcutâneo da linhagem B16F10 e a segunda etapa no transplante endovenoso (para indução de metástases) da linhagem de células B16F10 e da sublinhagem B16F10B.

4.3.1 Transplante subcutâneo

Utilizaram-se 10 camundongos fêmeas BALB/c divididas em 2 grupos, cada um contendo 5 animais. Um grupo recebeu inoculação de 4×10^5 células por animal e o outro, 1×10^6 células por animal. A dosagem de células a ser inoculada foi determinada seguindo-se a experiência da autora com a linhagem B16F10 e camundongos C57BL/6, além dos dados coletados na literatura (FREITAS *et al.*, 2004; MENDES *et al.*, 2008).

As células foram inoculadas no dorso do camundongo devido ao fato de que a formação de um tumor sólido nesse local acarreta menores transtornos para o animal como, por exemplo, durante a sua movimentação, além do que impede que o animal se automutila na região do tumor.

Suspensões celulares obtidas conforme descrito no subitem 4.1.3 eram cuidadosamente ressuspendidas em PBS (solução tampão fosfato). Após a contagem das células viáveis, essas eram aliqüotadas nas concentrações desejadas (4×10^5 e 1×10^6 células) e mantidas à 4°C até efetuar-se a inoculação nos animais.

A inoculação da suspensão celular (100 µl) foi realizada no dorso dos animais por via subcutânea, utilizando-se de seringa de 1 ml.

4.3.2 Transplante endovenoso

Um modelo experimental de indução de metástases pulmonares amplamente utilizado é a inoculação endovenosa de células tumorais. Nesse modelo, as células são injetadas endovenosamente na veia caudal lateral de camundongos sendo inicialmente levadas por essa via até o pulmão onde a grande maioria irá se prender, possibilitando, assim, o crescimento tumoral e, conseqüentemente, a formação de metástases pulmonares (SHARON *et al.*, 2003; FUKUMASU *et al.*, 2008). Esse foi o modelo experimental utilizado para a indução de metástases nos camundongos

BALB/c. Vinte camundongos fêmeas foram separadas da seguinte forma: dez camundongos foram divididos em dois grupos de 5 animais cada, onde 4×10^5 células (grupo 1) e 1×10^6 células (grupo 2) foram inoculados endovenosamente com células B16F10 e os outros dez camundongos foram divididos da mesma forma, mas receberam a inoculação de células B16F10B nas concentrações citadas.

Suspensões celulares da linhagem B16F10 e da sublinhagem B16F10B, obtidas conforme descrito no subitem 4.1.3, foram cuidadosamente ressuspendidas em PBS. Após a contagem das células viáveis, essas eram aliqüotadas e mantidas à 4°C para efetuar-se a inoculação das células (100 µl de suspensão celular).

Aos 20, 25 e 30 dias, após a inoculação das células, um animal de cada grupo foi sacrificado para a verificação da presença de metástases. O período de tempo para a análise da formação dos nódulos tumorais pulmonares foi determinado com base na experiência da autora utilizando-se esse modelo experimental com a linhagem B16F10 e camundongos C57BL/6. Após o sacrifício de cada animal, os nódulos metastáticos foram contados e os animais que apresentaram mais de 200 nódulos metastáticos foram considerados como tendo nódulos incontáveis. A opção por padronizar em 200 o número de nódulos metastáticos para que o pulmão fosse considerado com nódulos coalescentes ocorreu devido ao fato de que pulmões com número superior a 200 nódulos tinham a sua contagem muito dificultada, uma vez que os nódulos por vezes se fundiam, dificultando a individualização dos mesmos.

4.3.3 Estabelecimento das sublinhagens celulares

Após a eutanásia dos camundongos, os mesmos passavam por uma antisepsia com álcool a 70% antes de serem colocados na capela de fluxo laminar para a excisão do tumor primário (em camundongos que sofreram transplante subcutâneo) ou para a retirada dos pulmões contendo os nódulos metastáticos (em camundongos que sofreram transplante endovenoso).

Para o estabelecimento da sublinhagem B16F10B abriu-se a pele na região próxima ao tumor subcutâneo e, com auxílio de pinça e uma tesoura, fez-se a divulsão da pele para alcançar a neoplasia que era retirada por inteiro. Uma vez realizada a excisão do tumor, esse era acondicionado em uma placa de Petri contendo MC, onde eram retirados vasos sanguíneos, a pseudocápsula e demais tecidos extratumorais. A seguir, o tumor era então acondicionado em uma nova placa de Petri contendo MC para ser fragmentado utilizando lâmina de bisturi. Os fragmentos do tumor foram macerados utilizando-se o êmbolo de uma seringa de 10 ml após a incubação com solução de tripsina 0,25% por 5 minutos. O material resultante, constituído por células

e elementos do estroma tumoral (células e resíduos teciduais) foi plaqueado em frascos de cultura de células de 25 cm² contendo meio de cultura completo.

Para o estabelecimento das sublinhagens metastáticas, B16F10M e B16F10BM, com o animal em decúbito dorsal, um pequeno orifício era feito na altura do esterno, a partir de onde era realizada a divulsão da pele. Logo após, a caixa torácica era exposta para a retirada dos pulmões, que ficavam acondicionados em placa de Petri contendo MC. Os nódulos metastáticos eram contados com auxílio de lupa (Olympus modelo SZ40). Posteriormente, alguns nódulos metastáticos eram retirados com auxílio de pinça e bisturi, transferidos para outra placa de Petri contendo MC e solução de tripsina 0,25% (para auxiliar na dissociação das células) e incubados a 37°C, por 5 minutos. O processo de tripsinização era interrompido com adição de MC e os nódulos eram macerados com auxílio de um êmbolo de seringa. A suspensão resultante era plaqueada em frascos de cultura de células de 25 cm² para estabelecimento da sublinhagem celular derivada de metástases.

O principal objetivo dessa etapa do trabalho era obter sublinhagens de células puras provenientes do parênquima tumoral e dos nódulos metastáticos. Após as culturas primárias atingirem a subconfluência e sofrerem de 4 a 6 repiques, as mesmas passaram pelo processo de dissociação celular e foram submetidas à técnica de diluição limitante até que se obtivesse a concentração de 1 (uma) célula por 25µl de MC. A suspensão celular era plaqueada cuidadosamente no centro de cada poço da placa de 24 poços que ficava 2 horas em incubadora a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade, tempo mínimo para a adesão das células. Após esse período, eram adicionados 2 ml de MC em cada poço. Os poços que apresentavam mais de uma célula no período de 8h após o plaqueamento inicial eram descartados. O acompanhamento dos agregados celulares formados necessariamente por crescimento clonal era feito diariamente por observação microscópica. Dessa forma, quando as culturas celulares atingiam a subconfluência realizava-se o procedimento descrito no subitem 4.1.3 para a expansão das sublinhagens celulares.

4.3.4 Medida do volume tumoral

As dimensões do tumor subcutâneo foram obtidas utilizando-se um paquímetro (Novatrone). A medição era realizada de maneira externa ao tumor, de 48h em 48h a partir de sua detecção inicial (Figura 1). O cálculo do volume tumoral realizado baseou-se em um provável crescimento elipsoide do tumor, com um diâmetro menor (D1) que se repete em duas dimensões, e um eixo maior (D2), utilizando-se a seguinte fórmula (TOMAYKO; REYNOLDS, 1989):

$$V= (D1)^2 \times D2 /1000 \times 0,52$$

A unidade utilizada foi cm³. Foi estabelecido que quando os tumores atingissem 1,5 cm³ de volume, os animais seriam eutanasiados para se evitar maiores transtornos aos camundongos, bem como necrose associada ao tumor. Além disso, não era objetivo deste trabalho acompanhar a sobrevivência dos animais portadores de tumor.

Figura 1 – Melanoma subcutâneo (tumor primário) em camundongo BALB/c induzido pela inoculação subcutânea de 1x10⁶ células B16F10 (39 dias). A medição do tumor com auxílio de paquímetro.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.5 Análise histopatológica

Uma parte do tumor primário e dos pulmões contendo nódulos metastáticos foi reservada para os procedimentos de estabelecimento das sublinhagens celulares (descrito no subitem 4.3.3). O material restante dos tumores primários, dos pulmões com nódulos metastáticos e órgãos como fígado e pulmões dos animais controle, foram processados para análise histopatológica em microscopia óptica e eletrônica.

Os tumores e os órgãos destinados para análise em microscopia óptica foram cortados em pequenos fragmentos e fixados em formol tamponado a 10% por 24h e processados conforme protocolo de rotina (TOLOSA *et al.*, 2003). Os fragmentos foram desidratados em séries crescentes de etanol, diafanizados em xilol, incluídos em parafina para obtenção de cortes seriados de 5 µm de espessura e corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE), onde foram utilizadas a hematoxilina de Harris e eosina *yellowish*. Após o procedimento os fragmentos foram examinados ao microscópio óptico Olympus BX41.

Uma caracterização adicional das estruturas dos agregados, bem como dos fragmentos do tumor, foi realizada utilizando microscopia eletrônica de varredura e de

transmissão. Para a análise em microscopia eletrônica de transmissão e varredura o material foi fixado em glutaraldeído 2,5%/tampão cacodilato 0,1M e processado como descrito nos subitens 4.3.6 e 4.3.7, respectivamente.

4.3.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para caracterizar ultraestruturalmente as linhagens e sublinhagens celulares, bem como as células do tumor primário e dos nódulos pulmonares metastáticos, foi utilizada a microscopia eletrônica de transmissão.

Para a análise dos fragmentos de tecidos, após a fixação em glutaraldeído: tampão cacodilato, os mesmos foram embebidos em gelatina 2% e cortados, com auxílio de lâmina de bisturi, em fragmentos de aproximadamente 0,5 cm. Esses pedaços de tecidos voltavam para o fixador antes de serem processados como a seguir.

Para a análise das células crescidas *in vitro*, foi seguido o protocolo de plaqueamento descrito no subitem 4.3.7.

As lamínulas e os fragmentos de tecidos foram submetidas a pós-fixação com 1% de tetróxido de ósmio (glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7.2, por 15 minutos) e contrastados *en bloc* com acetato de uranila 1% (em álcool a 10%) por 12h. Em seguida, as amostras foram submetidas à desidratação em soluções crescentes de etanol e, posteriormente, foram embebidas em resina Spurr. Para que as células cultivadas *in vitro* pudessem ficar aderidas na resina soltando-se da lamínula na qual estavam aderidas, cortou-se a região cônica do eppendorf de 0,5mL que foi preenchido com resina até a metade e então vertido sobre a lamínula, preferencialmente em uma região onde houvesse uma maior concentração de agregados celulares. Esse sistema foi montado no verso de moldes de silicone, pois os mesmos proviam uma região lisa e antiaderente. Após a polimerização da resina, as lamínulas foram retiradas do tubo eppendorf, encostando-se a lamínula em nitrogênio líquido para a dissociação do eppendorf da lamínula. Posteriormente, com auxílio de uma lâmina de aço, os resíduos de vidro foram cuidadosamente retirados com auxílio de lupa (Olympus, SZ40).

Os cortes foram realizados em ultramicrotomo de modo que a espessura obtida fosse aquela em que depois de esticados os cortes tivessem a coloração dourado/cinza ou cinza. Os cortes foram contrastados com citrato de chumbo e analisados em microscópio eletrônico de transmissão, ZEISS (modelo EM 109) acoplado a um dispositivo de captura digital de imagens Mega View III no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV.

4.3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Células B16F10 e as da sublinhagem B16F10B foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro estéreis (Glass Técnica – Brasil) de 13 mm de diâmetro, que foram depositadas individualmente nos poços de placas de 24 poços, cujo diâmetro do poço é de 16 mm, numa densidade de 10 células/cm². Após permanecerem em estufa a 37°C, 5% de CO₂ por tempos variados (48-120h), as lamínulas correspondentes (triplicata) a cada tempo foram retiradas (intervalos de 24h) do poço com auxílio de pinça de ponta fina e lavadas com MC e, posteriormente, fixadas em uma solução 1:1 de glutaraldeído 2,5%: tampão cacodilato 0,1M por 2h à temperatura ambiente, sendo, em seguida, mantidos a 4°C no mesmo fixador até o processamento que seguiu o protocolo: “*Preparation of Chromosomes for Scanning Electron Microscopy*” com modificações (SUMMER *et al.*, 1994), conforme descrito a seguir.

As amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M por 3X com duração de 15 minutos cada lavagem. A seguir foi aplicado o método **OTOTO** que consiste de tratamentos intercalados de **Ósmio** e **Tiosemicarbazida**. Entre as aplicações dos mesmos foram realizadas lavagens exaustivas das amostras em água destilada. Posteriormente à pós-fixação com tetróxido de **ósmio** 1% (em água destilada) por 15 minutos seguidos de tratamento com **tiosemicarbazida (TSC)** 0,5% (em água destilada) por 15 minutos, (2X) houve o terceiro tratamento das amostras com tetróxido de **ósmio** 1% por mais 15 minutos, seguido de uma lavagem abundante em água destilada. As células foram desidratadas com banhos subsequentes de 10 minutos com etanol 30, 50, 70, 80, 90 e 100% (sendo este último por três vezes). As lamínulas contendo as células foram transferidas para recipiente apropriado, separadas uma da outra e submetidas à desidratação total (ponto crítico) (Crytical point dryer BAL-TEC, CPD030). As lamínulas foram posteriormente metalizadas com banho de ouro em equipamento Blazers Union (FL9496, SCD030) e analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), LEO (modelo VP1430) no NMM da UFV.

4.3.8 Plaqueamento das células em lamínulas

Como um dos objetivos do presente trabalho era observar células crescendo de modo a constituírem colônias a partir de células isoladas, as células B16F10 foram plaqueadas em densidades muito baixas (10 células/cm²), de modo a permitir uma distribuição de células primordialmente isoladas. Essas células isoladas multiplicam-se por mitoses e começam a formar pequenos agregados. Ao mesmo tempo, células migram e se agregam a outras células e agregados. Como resultado desse processo, os agregados não só aumentam de tamanho por meio de divisões celulares, mas

também pela agregação de novas células que se movem em sua direção, e pela união de agregados adjacentes.

As diferentes linhagens de células foram plaqueadas em 24 poços de 16 mm de diâmetro. Na base de cada poço foi colocada uma lamínula de vidro (Knittel®), de diâmetro igual a 13 mm (previamente esterilizada), sobre a qual foram plaqueadas as células, que foram incubadas com meio completo à 37°C, 5% de CO₂ e 90% de umidade relativa. Após 4 horas de plaqueamento, necessários para que as células atingissem por gravidade a superfície das lamínulas e aderissem às mesmas, três lamínulas foram retiradas por sorteio, lavadas em solução tampão (PBS) e fixadas em álcool metílico gelado (4°C). Essas lamínulas foram convencionalmente denominadas de tempo zero (t_0), correspondendo ao tempo inicial. A partir do t_0 , três lamínulas foram removidas em intervalos regulares de 24 horas, por um período de até 168 horas. As lamínulas correspondentes a cada tipo celular e a cada tempo, após fixação, foram coradas pela técnica de HE (Hematoxilina de Harris e Eosina yellowish) e montadas em Entellan.

4.3.9 Método de contagem das células

Utilizando-se um microscópio (Biotec Studar E) sob uma mesa com tampo de vidro transparente (Figura 2), as lamínulas (subitem 4.3.8) foram projetadas em uma folha de papel vegetal e analisadas em um aumento de 130x, observando-se em cada lamínula o número de células presentes em cada agregado celular. As células foram individualizadas por meio da visualização de seus núcleos, que se coraram intensamente de roxo e o citoplasma, nesse método de observação, fica com coloração rósea. Um agregado celular foi definido, de acordo com Mendes (2001), como qualquer conjunto interconectado de células (ou mesmo uma única célula) que esteja fisicamente isolado de qualquer outro grupo de células. Para minimizar erros relacionados com as contagens, as mesmas foram realizadas somente pela autora.

Figura 2 – Esquema do sistema usado para a análise das lamínulas. O microscópio ficava sob uma mesa com tampo de vidro transparente onde as lamínulas eram projetadas. Uma folha de papel vegetal era usada como anteparo para as projeções das lamínulas.
 Fonte: desenhado por Pedro Ribeiro - NMM- UFV.

As análises foram realizadas fazendo-se varredura das lamínulas (Figura 3), ou seja, contava-se o número de agregados celulares e o número de células, presentes em cada um deles, em cada campo. Esse sistema de contagem de células também foi utilizado por Queiroz (1996) e Mendes (2001).

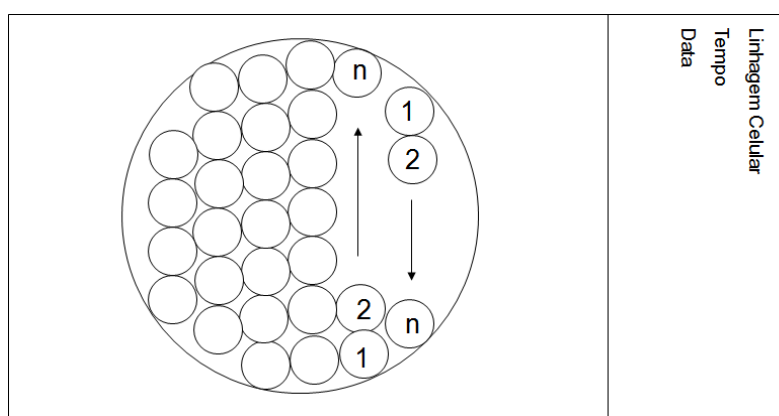


Figura 3 – Contagem dos agregados celulares. A lamínula onde as células foram plaqueadas continha em média 72 campos (círculos). O sentido da contagem dos aglomerados nos campos microscópicos está indicado pelas setas.
 Fonte: Elaborado pela autora

4.3.10 Quantificação e estabelecimento do regime de crescimento das células B16F10 e das sublinhagens derivadas

Os resultados obtidos por meio da utilização das contagens realizadas nos diferentes tempos de cultivo (intervalos de 24 horas) foram registrados em planilha contendo a fração $n_s(t) \times S$ (frequência de ocorrência do aglomerado de S células em função do tempo pelo número de células no aglomerado). A função de distribuição de tamanhos de agregados, $n_s(t)$ é definida como sendo a fração de agregados celulares consistindo de s células em um tempo t . Os dados obtidos foram analisados pelo Dr. Marcelo Lobato Martins, do Departamento de Física da UFV.

Para a variável $n_s(t)$ foram calculados as médias, os desvios-padrão e o coeficiente, posteriormente utilizados para a obtenção dos gráficos correspondentes aos padrões de crescimento, usando-se o programa Grapher (2-D Graphing System, Golden Software, Inc).

As curvas e os expoentes obtidos por meio dos gráficos caracterizam os padrões de crescimento das linhagens celulares analisadas. As distribuições observadas se expressaram sob forma de decaimento exponencial e leis de potência. Nesse ponto, faz-se necessário esclarecer como foram feitas as análises dessas curvas. Em um primeiro estágio, construiu-se o gráfico linear $n_s(t) \times S$. Se a curva resultante não era uma reta, em uma primeira tentativa, transformava-se o gráfico $n_s(t) \times S$ em um gráfico semilogarítmico ($\log n_s(t) \times S$). Nesse caso, dois resultados eram possíveis: (1) o gráfico continuar sendo uma curva, isso indicando que o decaimento não era exponencial, ou (2) se tornar uma reta, isso indicando que a lei que a regia era de decaimento exponencial.

Para se verificar quantitativamente se as curvas (do gráfico semilogarítmico) eram ou não retas, fazia-se uma regressão linear na região linear da curva e calculava-se o coeficiente de correlação, R^2 . Se o coeficiente obtido era igual ou superior a $R^2 \geq 0,98$, então se assumia que se tratava de uma reta, ou seja, a lei que regia o padrão de crescimento analisado era a de decaimento exponencial.

Quando a primeira tentativa falhava, então se traçava um gráfico duplo-logarítmico dos dados ($\log n_s(t) \times \log S$). Se as curvas desse gráfico se apresentassem sob forma de retas (testadas pela regressão linear com $R^2 > 0,98$), então a lei que regia a dinâmica de crescimento era uma lei de potência. Caso as curvas do gráfico duplo-logarítmico não fossem retas, ter-se ia que testar outras funções para se descobrir qual função ou lei regiam os padrões de crescimento analisados. Porém, em nenhuma das curvas observadas obteve-se esse tipo de resultado, ou seja, os padrões ou eram regidos por decaimento exponencial ou por lei de potência.

Finalmente, cabe ressaltar que, de fato, os dois ajustes (exponencial ou em lei de potência) foram sempre testados para cada curva e que a escolha entre eles teve como critério principal o maior valor de R^2 .

4.3.11 Registro Fotográfico

As lamínulas utilizadas para a análise do regime de crescimento, bem como aquelas contendo material para análise histopatológica, foram fotografadas no microscópio óptico Olympus AX70 utilizando o programa SPOT no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV. As fotografias das culturas de células foram feitas com câmera digital Sony (modelo DSCP41) acoplada manualmente a ocular de microscópio óptico de luz invertida (Leica DMIL).

5 RESULTADOS

5.1 Tumor primário

Em cada um dos dois grupos experimentais onde foram inoculadas subcutaneamente células B16F10, obtiveram-se dois camundongos com crescimento tumoral, sendo que o surgimento dos tumores ocorreu em tempos diferentes nos animais de cada grupo.

No grupo 1, o primeiro nódulo perceptível foi observado 19 dias e o segundo, 24 dias após a inoculação das células. Nos animais do grupo 2 que receberam uma maior dosagem de células os tumores surgiram mais tardiamente quando comparados aos animais do grupo 1. Os nódulos foram observados nos dias 21 e 30 após a inoculação das células. Até o final do experimento (105 dias após a inoculação das células), não foram observados tumores nos demais animais de cada grupo experimental.

Macroscopicamente, os tumores primários com contorno bem delimitado, apresentaram uma “pseudocápsula”, coloração enegrecida e consistência que variava de gelatinosa a sólida. Uma vascularização exuberante (angiogênese) pode ser observada em associação aos tumores (Figura 4A). As características da linhagem celular derivada do tumor primário serão descritas nas subseções: 5.3.1, 5.4.1 e 5.5.4.



Figura 4 – Melanoma subcutâneo em camundongo BALB/c do grupo em que foram inoculadas 1×10^6 células B16F10 por via subcutânea (39 dias). (A) Tumor subcutâneo, apresentando extensa vascularização (angiogênese), indicada pelas setas. (B) Tumor primário após excisão. Fonte: elaborada pela autora.

5.2 Metástases Pulmonares

Aos 20, 25 e 30 dias após a inoculação das células, um animal de cada um dos dois grupos que recebeu inoculação endovenosa foi sacrificado. O número de nódulos metastáticos variou entre os indivíduos do mesmo grupo e entre os dois grupos, conforme pode ser visto nas Tabelas 1 e 2, porém, todos os animais desenvolveram metástases.

5.2.1 Metástases pulmonares derivadas da inoculação endovenosa de células B16F10

Em ambos os grupos experimentais houve variação no número de nódulos metastáticos observados (Tabela 1), sendo que tanto macro (Figura 5) quanto microscopicamente somente foram observados nódulos melanóticos. A Tabela 1 resume as informações a respeito dos grupos experimentais que receberam inoculação endovenosa de células B16F10. Um animal do grupo 1 morreu antes de ser eutanasiado (†).

Tabela 1 – Número de nódulos metastáticos pulmonares após inoculação endovenosa de células B16F10 em camundongos BALB/c.

Número de células	Animal	Tempo (dias) após inoculação das células	Número de nódulos metastáticos observados
4×10^5 (Grupo 1)	1	20	3
	2	25	> 200
	3	30	5
	4	30	80
	5	†	-
1×10^6 (Grupo 2)	1	20	92
	2	25	60
	3	25	> 200
	4	30	60
	5	30	> 200

Fonte: elaborada pela autora.

A

B

Figura 5 - Metástases pulmonares em camundongo BALB/c que recebeu inoculação de 1×10^6 células B16F10 por via endovenosa. Em A, vista interna do camundongo, passados 25 dias do desafio. A seta aponta um nódulo metastático no pulmão. (B) Pulmões preparados para a contagem dos nódulos tumorais (setas).

Fonte: elaborada pela autora.

5.2.2 Metástases pulmonares derivadas da inoculação endovenosa de células B16F10B

Houve uma grande diferença entre o número de nódulos metastáticos encontrados nos pulmões nos grupos experimentais de camundongos BALB/c em que foram inoculadas endovenosamente 4×10^5 e 1×10^6 células da linhagem B16F10B. Diferentemente dos grupos em quem foram inoculadas células B16F10, houve representantes do grupo que receberam 1×10^6 células em que não foram observados nódulos metastáticos. A Tabela 2 resume as informações a respeito dos grupos experimentais que receberam inoculação endovenosa de células B16F10B. Um animal do grupo 1 morreu antes de ser eutanasiado (†). Na Figura 6 pode-se observar o aspecto macroscópico dos nódulos tumorais.

Tabela 2 – Número de nódulos metastáticos pulmonares após inoculação endovenosa de células B16F10B em camundongos BALB/c.

Número de células	Animal	Tempo (dias) após inoculação das células	Número de nódulos metastáticos observados
4×10^5 (Grupo 1)	1	20	> 200
	2	25	3
	3	30	180
	4	30	> 200
	5	†	-
1×10^6 (Grupo 2)	1	20	0
	2	20	0
	3	25	> 200
	4	30	0
	5	30	5

Fonte: elaborada pela autora.

Figura 6 – Metástases pulmonares em camundongo BALB/c que recebeu inoculação de células B16F10B por via endovenosa. Na figura são mostrados os pulmões de camundongo após 25 dias da inoculação das células (1×10^6 células B16F10B). As setas indicam nódulos metastáticos.

Fonte: elaborada pela autora.

5.3 Sublinhagens derivadas de B16F10

Obtiveram-se três sublinhagens celulares após uma passagem *in vivo* em camundongos BALB/c. A sublinhagem resultante dos tumores primários induzidos pela inoculação subcutânea de células B16F10 foi denominada B16F10B. A partir de metástases induzidas em camundongos BALB/c duas sublinhagens foram obtidas. As sublinhagens B16F10M e B16F10BM derivadas de metástases pulmonares induzidas pela inoculação endovenosa de células B16F10 e a sublinhagem B16F10B, respectivamente. A morfologia das linhagens celulares quando cultivadas em monocamada apresentam padrões variáveis em função da densidade celular na cultura.

5.3.1 Análise morfológica e descrição do comportamento *in vitro* das sublinhagens derivadas de B16F10

✓ Sublinhagem B16F10B

As células B16F10B provenientes de tumor primário mostraram-se bem adaptadas às condições de crescimento *in vitro*, como pode ser visto na Figura 7. Desde as primeiras horas em cultura um grande número de células pode ser observado no entorno dos explantes tumorais (fragmentos do tumor), demonstrando a migração das células do tumor em direção ao substrato (frascos de cultura).

A partir da observação das células B16F10B crescidas *in vitro* percebeu-se que, nas primeiras horas mantidas em cultura, algumas células dessa sublinhagem cresceram formando pequenos agregados celulares e, outras, cresceram de forma isolada. O processo de dissociação das células (separação das células umas das outras e delas com o substrato) era mais demorado quando comparado ao das outras sublinhagens. As células B16F10B apresentaram morfologia bastante variável (pleomorfismo), porém semelhante ao da linhagem original, B16F10 (Figura 8), com células poligonais quando em agregados maiores e morfologia fibroblastoide quando sozinhas ou em agregados menores. Em condições de subcultivo e quando corado por HE, as células B16F10B mostraram grânulos acastanhados em seu citoplasma indicativos da presença de melanossomos (Figura 9A). Em cultura, cresceram aderidas ao substrato como pode ser observado nas Figuras 7 e 9. A morfologia observada nessa sublinhagem se manteve após todos os repiques celulares, bem como após o descongelamento. O *pellet* formado após a centrifugação das células mostrava-se com uma coloração que variava de um tom acinzentado a preto, dependendo do número de células e do tempo que elas estavam sendo cultivadas.

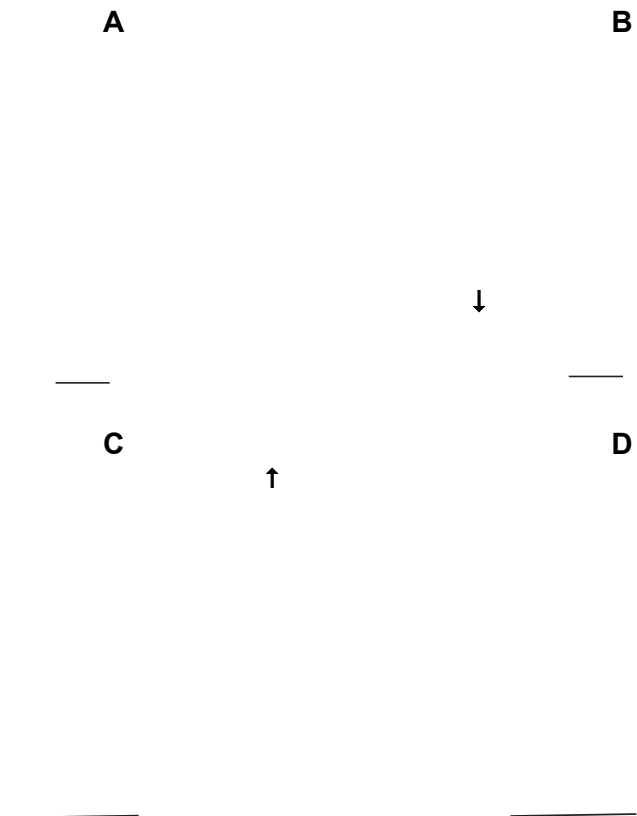


Figura 7 – Cultura de células B16F10B (sublinhagem celular derivada de melanoma subcutâneo B16F10 após uma passagem in vivo em camundongos BALB/c) microscópio invertido. De A a D são mostradas fotografias a partir de 48h do início da cultura evidenciando diferentes estágios de crescimento da mesma. (A) Células migrando do explante tumoral (exp). (B) Podem ser vistas células em divisão celular (seta). (C) Células em subconfluência e (D) células em semiconfluência. A seta aponta uma célula contendo grânulos de melanina. (A=48h, B=96h, C=144h e D=192h). As barras nas figuras de A a D correspondem a 50 μ m.

Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 8 – Células B16F10 cultivadas sobre lamínula de vidro. (A) e (B) mostram a morfologia das B16F10 em cultura quando coradas por HE. As setas mostram o pleomorfismo celular característico dessa linhagem. A seta branca mostra uma célula pequena e a vermelha, uma célula com citoplasma amplo e núcleo apresentando vários nucléolos. (A e B= 120h). Barras (A) – 100 μ m e (B) – 50 μ m.

Fonte: Elaborada pela autora.

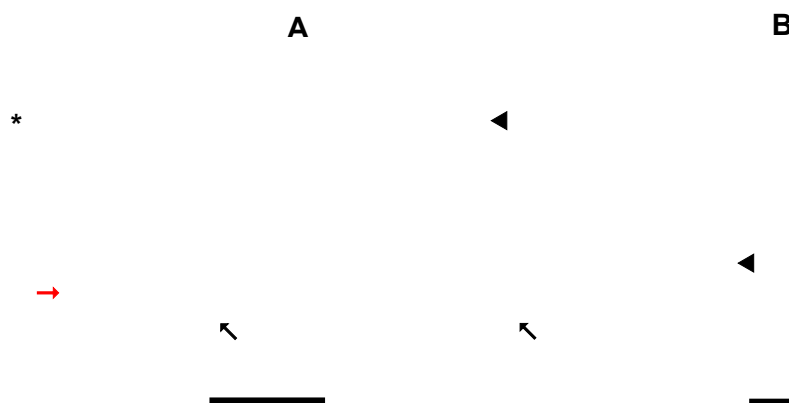


Figura 9 – Células B16F10B cultivadas sobre lamínulas de vidro. Coloração HE. (A e B) Cultura celular em semiconfluência, mostrando o pleomorfismo celular (célula fibroblastoide; seta vermelha); células poligonais (seta preta); células gigantes (cabeça de seta). O asterisco mostra uma célula contendo grânulos de melanina. (A e B =96h). Barras, (A e B) – 100µm. Fonte: Elaborada pela autora.

✓ Sublinhagem B16F10BM

A sublinhagem celular derivada a partir de metástases originadas de células B16F10B em camundongos BALB/c foi denominada B16F10BM. As células B16F10BM apresentaram morfologia variável, dependendo da densidade celular. De modo geral, a morfologia dessas células é semelhante a da linhagem original, B16F10, apresentando células desde poligonais a células com formato fibroblastoide que crescem aderidas ao substrato, como pode ser observado na Figura 10. Foi possível observar células com citoplasmas amplos (Figura 11) e às vezes apresentavam mais de um núcleo com vários nucléolos bem evidentes.

Em condições de cultura sub a semiconfluente, ou seja, com baixa densidade celular, as células B16F10BM adotavam formas variadas, emitindo, muitas vezes, prolongamentos citoplasmáticos de extensão variável. À medida que a cultura se tornava semiconfluente ou confluyente, as células passavam a ter uma morfologia mais uniforme adotando, na maioria das vezes, uma forma poligonal sem a presença de prolongamentos (Figura 11). A partir da observação das células em cultura observou-se que algumas células cresceram justapostas com as vizinhas, estabelecendo vários pontos de comunicação por meio de projeções de membrana. Por outro lado, algumas células cresceram isoladas. Quando cultivadas, as células B16F10B mostraram grânulos acastanhados em seu citoplasma indicativos da presença de melanina (Figura 10).

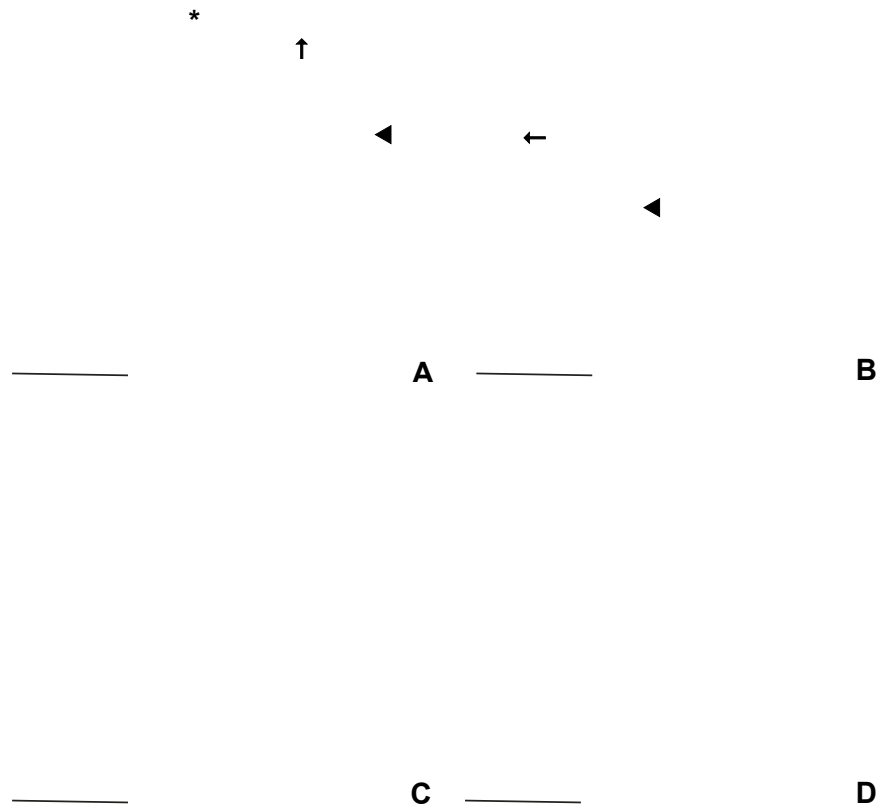


Figura 10 - Cultura de células B16F10BM (sublinhagem celular derivada de nódulos metastáticos crescidos em camundongos BALB/c após inoculação endovenosa de células B16F10B). De A a D, são mostradas fotografias a partir de 48h do início da cultura evidenciando diferentes estágios de crescimento da mesma. Em A, observa-se pleomorfismo celular evidenciado pela presença de células poligonais (seta) e células com formato fibroblastoide (cabeça de seta). O asterisco (*) denota a presença dos grânulos acastanhados no citoplasma celular. (B), a seta mostra os prolongamentos celulares. É possível perceber a refringência nas células (cabeça de seta), sinal de divisão celular. (C) A maioria das células possui formato fibroblastoide e mostra grande interação intercelular. (D) Cultura em confluência. Nesse estágio as células são praticamente todas poligonais e não se percebem prolongamentos citoplasmáticos. (A= 48h, B= 72h, C= 120h, D= 192h em cultura). As barras de A a D correspondem a 100 μ m.

Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 11 – Células B16F10BM cultivadas sobre lamínulas de vidro. (A) Células apresentam núcleos com nucléolos evidentes (seta). (B) Observar o pleomorfismo celular. (A e B = 120h). As barras (A e B) correspondem a 50 μ m.

Fonte: Elaborada pela autora.

✓ Sublinhagem B16F10M

A sublinhagem celular derivada a partir de metástases pulmonares originadas de células B16F10 em camundongos BALB/c foi denominada B16F10M. As células B16F10M apresentaram células com morfologia uniforme, sendo grande parte delas com formato arredondado, porém, além disso, apresentaram células poligonais e fibroblastoides. Embora não tenham sido medidas, pode-se observar que elas são menores que as células das demais sublinhagens. As B16F10M crescem aderidas, porém a taxa de crescimento é mais lenta quando comparada às demais linhagens (subitem 5.3.2). Ao contrário das demais sublinhagens, as células B16F10M crescem mais isoladas, tendo sido observada pouca interação intercelular (Figuras 12 e 13).

Quando coradas com HE, as características citadas tornam-se mais facilmente observáveis (Figura 13) tais como, quando essa cultura celular alcança a semiconfluência ou confluência, as células apresentavam-se muito homogêneas com menor variabilidade de formas, mostrando-se, em sua grande maioria, arredondadas e desprovidas de prolongamentos citoplasmáticos. A maioria das células apresentou somente um núcleo, sendo que esse ocupava grande parte do citoplasma e raramente foram observados nucléolos (Figura 13).

Assim como as demais sublinhagens, a B16F10M apresentou muitos grânulos de melanina em seu citoplasma. Quando em cultura, as células secretavam esse pigmento mudando a cor do meio de cultura, que normalmente é rosa avermelhado, para acastanhado ou acinzentado.

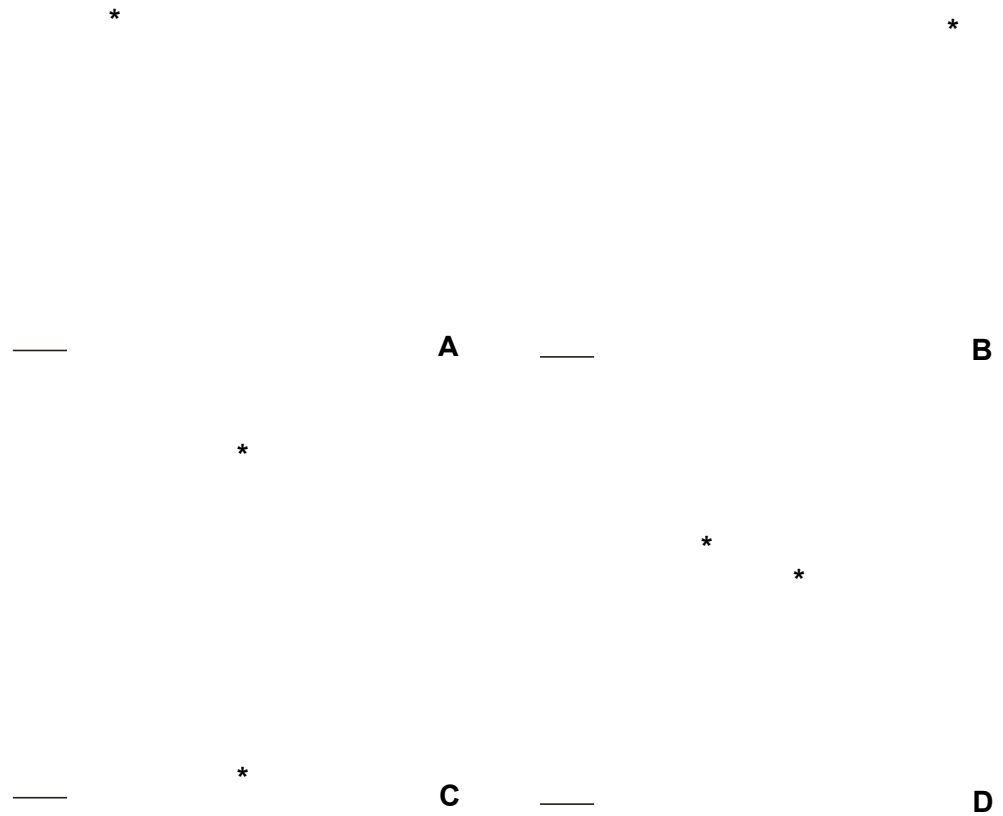


Figura 12 – Cultura de células B16F10M (sublinhagem celular derivada de nódulos metastáticos crescidos em camundongos BALB/c após inoculação endovenosa de células B16F10). De A a E, são mostradas fotografias a partir de 24h do início da cultura evidenciando diferentes estágios de crescimento da mesma, sendo possível observar a grande quantidade de grânulos de melanina presentes no citoplasma celular (*). (A= 24h, B= 48h, C= 120h, D= 144h). As barras correspondem, de A a D a 50 μm .

Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 13 – Células B16F10M cultivadas em lamínulas de vidro e coradas por HE. (A) Cultura celular semiconfluyente evidenciando a quase ausência de contatos intercelulares. (B) Campo selecionado de (A), visto em maior aumento (A e B = 120h). Barras, (A) – 300 μm e (B) - 100 μm .

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.2 Cinética de crescimento da linhagem B16F10 e das sublinhagens derivadas in vitro

As sublinhagens apresentaram formação de agregados celulares, quando plaqueadas em baixa densidade, até alcançarem a confluência. Em algumas sublinhagens esses agregados eram mais compactos e, em outros, como os formados pelas células B16F10M, menos compactos. Como se pode observar na Figura 14, a linhagem B16F10 possui uma fase logarítmica de crescimento celular que começa 24 horas após o plaqueamento e se estende até as 120 horas. Para as sublinhagens B16F10B e B16F10BM, a curva de crescimento exibe uma fase log de crescimento celular que se estende desde as 48 horas após o plaqueamento até às 144 horas. Da mesma forma, para as células B16F10M, a fase de crescimento exponencial inicia-se após as 48 horas e se estende até as 120 horas. Após esse período observa-se uma diminuição na taxa de crescimento. A partir dessas curvas de crescimento (Figura 14) foi possível calcular os tempos de duplicação das células para a linhagem B16F10 e as sublinhagens B16F10B, -BM e -M que foram estimados em média em 28, 19, 24 e 37 horas respectivamente. Faz-se necessário explicar que a linhagem celular B16F10, nos dois experimentos realizados, apresentou às 144h de cultivo uma porcentagem de células viável menor que 5%, razão pela qual na Figura 14 o número de células apresentado foi o contabilizado até as 120h de cultivo. Os gráficos com as curvas de crescimento de cada linhagem individual podem ser vistos no anexo I.

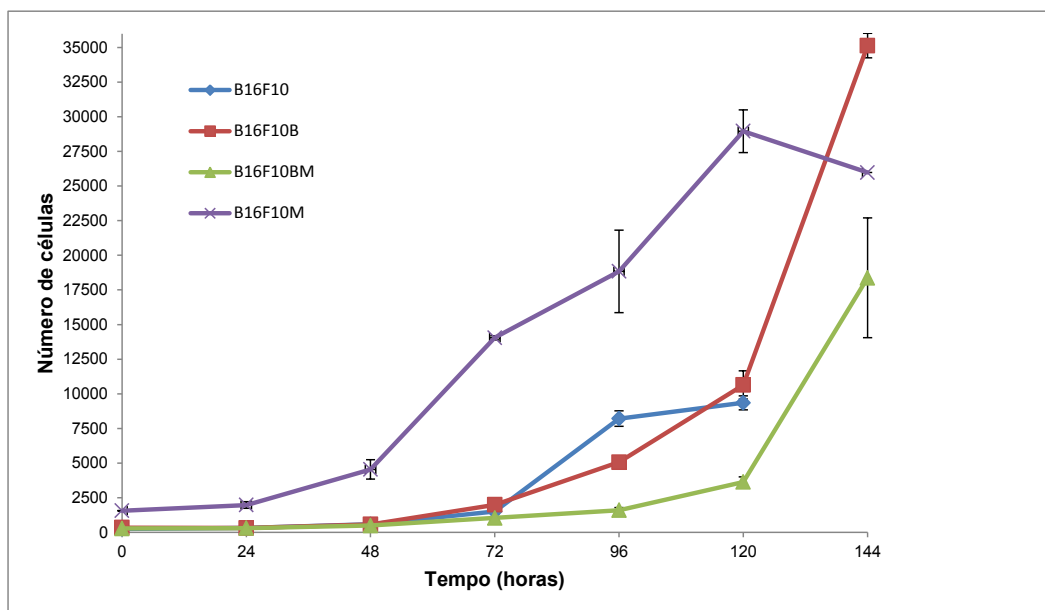


Figura 14 – Curvas de crescimento da linhagem celular B16F10 e das sublinhagens celulares B16F10B, -BM e -M cultivadas em monocamada. O número inicial de células plaqueadas foi de 1000 células.

Fonte: elaborada pela autora.

5.4 Análise Histopatológica

5.4.1 Tumor primário

Microscopicamente a lesão tumoral apresentou uma “pseudocápsula” vascularizada, com infiltrado inflamatório perivascular (Figura 15A). O parênquima tumoral apresentou-se constituído por ninhos de células que formavam nódulos concêntricos em conjunção com vasos sanguíneos (Figura 15B). Entre os ninhos de células, encontraram-se áreas de necrose (Figura 15C) que apresentavam característica acidófila e núcleos picnóticos, em cariorrexe e cariólise. As células do parênquima tumoral eram pleomórficas, hipercromáticas e heterogêneas com relação à pigmentação melânica.

As células que apresentavam o pigmento melanina possuíam dois padrões de distribuição do pigmento (Figura 15D). Em algumas células a melanina estava disposta preferencialmente próxima ao limite celular. Em outras, o pigmento encontrava-se disperso no citoplasma, porém em maior concentração próximo ao limite celular. Observou-se que as células tumorais mais próximas aos vasos sanguíneos produziam maior quantidade de melanina. As células tumorais parenquimatosas apresentavam formato poligonal e citoplasma vacuolizado. Observaram-se pleomorfismo nuclear sendo que, em sua maioria, as células eram mononucleadas e apresentavam muitas figuras de mitose, normais e anômalas. Todos os núcleos apresentavam mais de um nucléolo (Figura 15E).

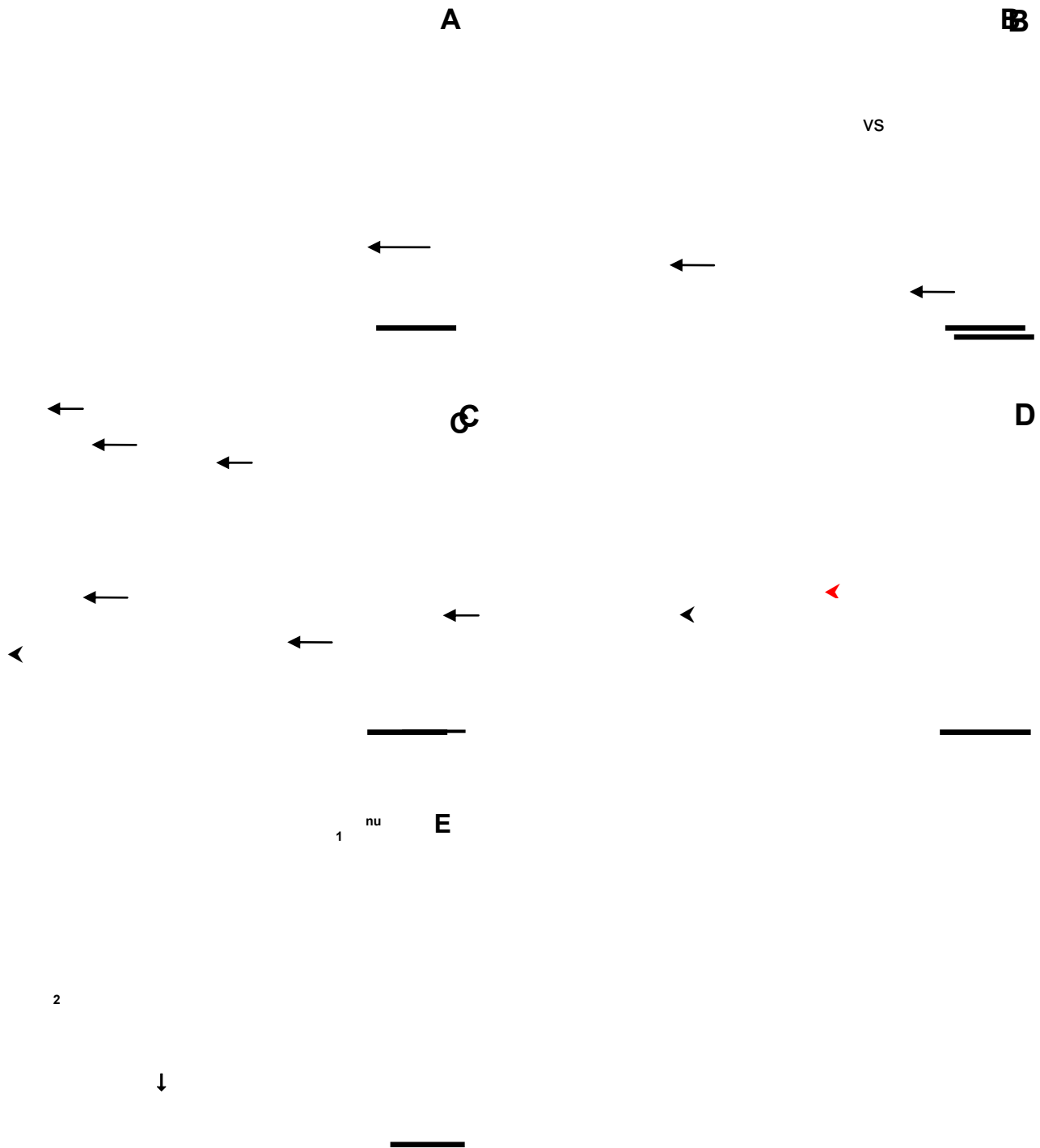


Figura 15 - Aspectos histopatológicos de tumor subcutâneo crescido em camundongo BALB/c a partir da inoculação de células B16F10. Em A, pseudocápsula (seta) com infiltrado inflamatório. (B) Células tumorais em torno de vaso sanguíneo (vs). (C) Áreas de necrose no parênquima tumoral (setas). Em D, as cabeças de seta mostram células com diferentes padrões de distribuição do pigmento melanina. A cabeça de seta preta mostra uma célula com a melanina dispersa no citoplasma, e a vermelha mostra célula com melanina dispersa de forma mais densa próximo ao limite celular. (E) Podem-se notar características das células tumorais, tais como presença de múltiplos nucléolos (nu), aumento da relação núcleo/citoplasma, pleomorfismo celular (células com tamanhos variados - 1 e 2). A seta mostra célula em mitose. As barras equivalem a 100 μm (A, B, C e D); 50 μm (E). Coloração por HE.
Fonte: elaborada pela autora.

5.4.2 Metástases pulmonares

A arquitetura dos bronquíolos terminais, bem como dos alvéolos do pulmão de um camundongo controle que não recebeu inoculação de células tumorais, apresentou-se bem preservado (Figura 16 A).

Macroscopicamente os pulmões dos camundongos que receberam inoculação de células tumorais apresentavam múltiplas lesões metastáticas, formando massas nodulares com coloração enegrecida. Por vezes essas lesões se fundiam, impossibilitando a individualização das mesmas (Figura 6). A presença dos nódulos metastáticos não alterou a consistência do órgão.

Microscopicamente os pulmões, tanto dos camundongos que receberam inoculação de células B16F10 (Figura 16B) quanto dos que receberam inoculação de células B16F10B (Figura 16C), apresentaram bronquíolos com alteração da arquitetura; nódulos metastáticos peribronquiais e perivasculares. As células metastáticas apresentaram as mesmas características já descritas para o tumor primário, tais como: pleomorfismo celular e nuclear (nucléolos evidentes), hiper cromasia celular e necrose. Nos pulmões analisados observou-se um aparente tropismo das células metastáticas pela região pleural.

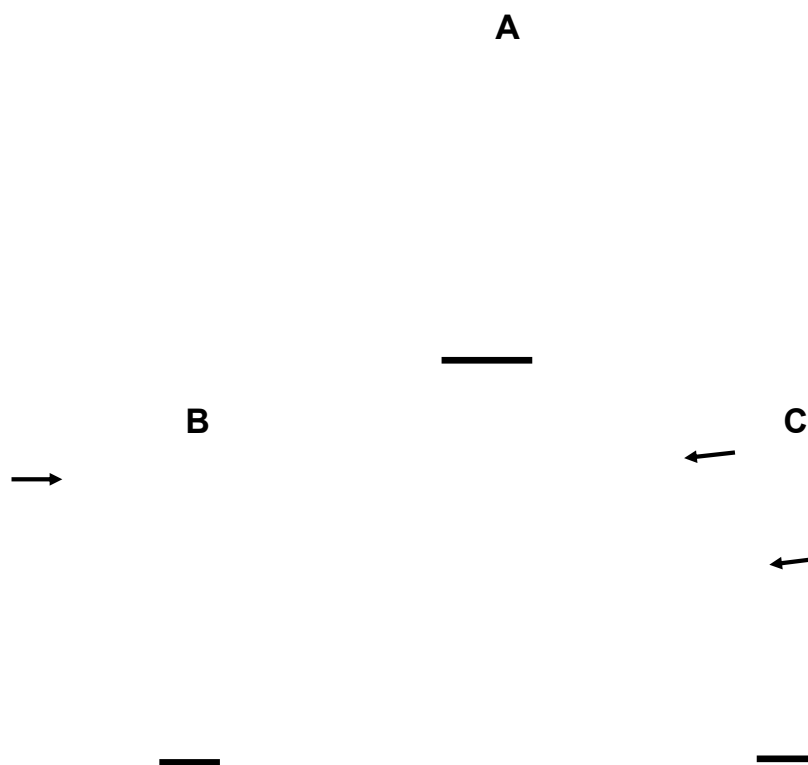


Figura 16 – Cortes histológicos de pulmões de camundongos BALB/c corados por HE. (A) Pulmão de camundongo controle, evidenciando arquitetura preservada do pulmão. (B) e (C), aspectos histopatológicos de metástases pulmonares induzidas em camundongos BALB/c a partir da inoculação de células tumorais. (B) Pulmão de camundongo que recebeu inoculação de células B16F10, a seta evidencia nódulo metastático na região pleural. (C) Pulmão de camundongo que recebeu inoculação de células B16F10B, as setas evidenciam nódulos metastáticos na região pleural. Barras - 100 μ m (A) e 300 μ m (B e C).
Fonte: Elaborado pela autora.

5.4.3 Fígado

A análise macroscópica das vísceras, incluindo-se baço, intestinos e fígado, bem como a análise microscópica realizada no fígado de cada camundongo dos grupos experimentais submetidos à inoculação subcutânea e/ou endovenosa de células B16F10 ou de células B16F10B, não revelou a presença de metástases (Figura 17).

A

B

vc

Figura 17 – Cortes histológicos de fígado de camundongo BALB/c que recebeu a inoculação de células tumorais por via endovenosa. (A) Vista panorâmica de corte histológico de fígado, onde se observa que a arquitetura do órgão foi preservada e não houve colonização de células metastáticas. (B) Cordões de hepatócitos, intercalados por capilares sinusoides que drenam em direção à veia centro lobular (vc). Barras -100 μ m (A e B). Coloração por HE.
Fonte: Elaborado pela autora.

5.5 Análise ultraestrutural - Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Durante análise ultraestrutural das células B16F10 e B16F10B cultivadas *in vitro* sobre lamínulas de vidro, observou-se além das características a seguir descritas, a presença de partículas virais intracisternas do tipo A. Esses resultados foram compilados sob forma de um artigo intitulado “INTRACISTERNAL VIRAL PARTICLES A OBSERVED IN MURINE TUMOR CELL LINE, B16F10 AND SUBLINE DERIVED B16F10B”, que foi submetido para publicação pela revista *Archives of Virology* (Anexo II).

5.5.1 Células B16F10 cultivadas *in vitro*

As células B16F10 apresentavam núcleo eucromático com a presença de um ou dois nucléolos, e algumas vezes foram observadas projeções nas membranas plasmáticas, sendo possível por vezes a observação de projeções filiformes longas. O citoplasma das células B16F10 apresentava RER e Golgi bem desenvolvidos e pôde-se observar uma abundância de polissomos livres (Figura 18B). As células se tocavam, mas não houve evidência de zonas de adesão, junções tipo *gap* ou desmossomos. Os melanossomos foram observados com uma baixa frequência (Figura 18C).

A análise ultraestrutural das células B16F10 revelou partículas virais que morfologicamente são comparáveis às partículas intracisternas do tipo A ou IAP (do inglês *Intracisternal Viral Particles A*). As IAPs (Figura 18B) foram observadas dentro de cisternas do retículo endoplasmático por todo o citoplasma celular e próximo a algumas organelas, tais como o retículo endoplasmático, mitocôndrias e melanossomos. Como

mencionado, maiores detalhes sobre as IAPs nas células B16F10 podem ser encontrados no Anexo II.

5.5.2 Células B16F10B cultivadas in vitro

As células B16F10B possuíam núcleo polimórfico e os nucléolos quando visíveis apresentavam-se únicos ou duplos com região granular e fibrilar aparentes. No citoplasma numerosas mitocôndrias foram observadas bem como melanossomos nos estágios I, II, III e IV de maturação (Figuras 19A e B). Os melanossomos apresentam-se dispersos. Houve sugestão de filamentos do citoesqueleto, embora as fibras se apresentassem dispersas. Retículo endoplasmático rugoso e Golgi bem desenvolvidos também foram observados. O contorno celular por vezes se mostrou irregular, apresentando projeções para o meio externo. Foi possível observar pontos de contato intercelular embora estes não evidenciassem complexos juncionais (Figura 19C). Houve a presença no citoplasma de corpos mielínicos membranosos.

A análise ultraestrutural das células B16F10B revelou IAPs (Figura 19C) dentro de cisternas do retículo endoplasmático por todo o citoplasma celular e próximo a algumas organelas, tais como o retículo endoplasmático, as mitocôndrias e os melanossomos. Mais detalhes sobre as IAPs nas células B16F10B podem ser encontrados no Anexo II.

Figura 18 – MET de células B16F10 cultivadas in vitro por 120h. (A) Célula de melanoma mostrando abundância de retículo endoplasmático rugoso (RER). Presença de núcleo eucromático (n) onde se pode ver um nucléolo (nu). (B). IAPs (setas) são visualizadas dentro de cisternas do RER. Notar a abundância de ribossomos livres (cabeça de seta). (C) Melanosomos tipos II e IV. (D) Ponto de contato intercelular (seta). Grande número de ribossomos livres no citoplasma (cabeça de seta). G – Golgi; m – mitocôndria. Barras - 0,8 μm (A e C); 0,4 μm (B) e 0,5 μm (D).
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 19 – MET de células B16F10B cultivadas in vitro. (A) Três células são mostradas, mantendo contato (cabeças de seta). Há a presença de melanossomos isolados nos quatro estágios de maturação (I, II III e IV). A célula central apresenta várias projeções citoplasmáticas (seta). (B) Melanossomos nos estágios III e IV. (C) IAPs (setas). Contato intercelular, (cabeça de seta). (D) As células B16F10B possuem um Golgi (G) bem desenvolvido e núcleo eucromático (n). m – mitocôndria; nu - nucléolo. Barras - 0,8 μm (A e C); 0,4 μm (B) e 0,5 μm (D).
Fonte: Elaborado pela autora.

5.5.3 Tumor subcutâneo derivado da inoculação das células B16F10

As células do parênquima tumoral apresentavam no citoplasma RER bem desenvolvido, bem como polissomos livres e Golgi em abundância. As mitocôndrias apresentam-se inchadas com indícios de lise das cristas mitocondriais, principalmente em células presentes na região mais central do tumor, o que pode indicar que as mesmas estavam em processo degenerativo, e em alguns casos já havia ultrapassado

sua capacidade de adaptação e essas alterações poderiam ser indicativas do processo de morte celular (Figura 20). Os numerosos melanosomas apresentavam-se ora dispersos, ora formando agregados, sendo que a maioria deles encontrava-se nos estágios III e IV, embora se tenham observado grânulos em estágios I e II. O núcleo celular era central, eucromático, polimórfico e apresentava um ou dois nucléolos. Foi possível observar pontos de contato intercelular, embora estes não evidenciassem complexos juncionais (Figura 20B). Macrófagos ativados puderam ser observados no estroma tumoral.

Figura 20 – MET de tumor primário crescido em camundongos BALB/c a partir da inoculação de células B16F10. (A) As células do parênquima tumoral apresentaram grande número de melanosomos, que ora estavam dispersos (cabeça de seta), ora em aglomerados (seta) (B) Região de contato intercelular mostrando maior eletrondensidade (cabeça de seta). Notar a abundância de ribossomos livres (seta). (C). Melanócito com grande quantidade de melanosomos em todos os estágios de maturação (I a IV) Os melanosomos nos estágios III e IV formaram um aglomerado. (D) Melanosomos em maior aumento. Mitocôndrias túrgidas (m). n - núcleo. Barras – 3,0 μm (A); 0,5 μm (B); 0,8 μm (C) e 0,4 μm (D).
Fonte: Elaborado pela autora.

5.5.4 Pulmão controle

O material selecionado apresentou o parênquima, o estroma pulmonar e a região pleural bem preservada. Foi possível observar uma eletrondensidade diferencial em algumas células, tais como macrófagos e pneumócitos II, os quais se mostraram levemente mais eletrondensas (Figura 21).

O mesotélio era formado por epitélio pavimentoso típico cujas células apresentavam em sua superfície microvilosidades curtas e citoplasma com múltiplas vesículas de pinocitose. A lâmina basal do mesotélio está fundida com a lâmina basal do tecido parenquimatoso pulmonar.

O parênquima pulmonar era formado por células pavimentosas (pneumócitos I) e por células globulares/cúbicas (pneumócitos II), geralmente observadas na junção septo-alveolar. A lâmina basal deste epitélio também se encontrava fundida com a lâmina basal do endotélio da extensa rede de capilares presentes no estroma pulmonar. Os pneumócitos I apresentavam superfície apical lisa e maior extensão celular formada por uma delgada camada citoplasmática. Os pneumócitos II geralmente apresentavam microvilosidades curtas que se projetavam da superfície celular em direção ao lúmen alveolar. O citoplasma destas células possuíam retículo endoplasmático rugoso (RER) e Golgi bem desenvolvidos (envolvidos na produção e secreção de surfactante pulmonar). Foram identificados pneumócitos II pela presença de vesículas ou corpos multilamelares pleomórficos, que estavam revestidos de membrana, e continham o surfactante (Figura 21A).

O estroma interalveolar apresentava-se espessado com tecido de sustentação caracterizado principalmente por fibroblastos e macrófagos. Os macrófagos também puderam ser encontrados no espaço interalveolar e foram facilmente reconhecidos pela grande quantidade de vacúolos eletrontransparentes e lisossomos. A superfície celular dos macrófagos ativos apresentava-se muito irregular. A matriz extracelular era basicamente formada por agrupamentos de fibras colágenas (colágeno III/ reticular) conspícuas e por pequenas porções que indicavam a presença de fibras elásticas (Figura 21C). No interior dos vasos sanguíneos foram identificadas hemáceas, eosinófilos e plaquetas (Figura 21A).

Figura 21 – MET de pulmão de camundongo BALB/c controle. (A). Interface entre os vasos sanguíneos (vs) onde se podem ver hemácias (h) e macrófago (ma) e os espaços alveolares (ea); pneumócitos tipo I (I) no parênquima pulmonar com vesículas citoplasmáticas; fibroblastos (F); pneumócitos tipo II (II) com corpos lamelares contendo surfactante (seta). (B) Fusão lâmina basal entre as células do parênquima e endotélio (seta). (C). Pneumócito I evidenciando as vesículas citoplasmáticas e fibras de colágeno (C) no estroma pulmonar. (D) A seta evidencia um desmosomo entre dois pneumócitos I. Barras - 1,6 μm (A); 0,5 μm (B e C) e 0,4 μm (D).
Fonte: Elaborado pela autora.

5.5.5 Metástases pulmonares derivadas de B16F10 – Células B16F10M

As células B16F10M possuíam núcleo polimórfico, eucromático e os nucléolos quando visíveis apresentavam-se únicos ou duplos com região granular e fibrilar aparentes. No citoplasma numerosas mitocôndrias foram observadas, bem como melanossomos nos estágios I, II, III e IV de maturação (Figura 22). Os melanossomos apresentavam-se dispersos ou em agregados. Retículo endoplasmático rugoso e Golgi bem desenvolvidos também foram observados. O contorno celular, por vezes, se mostrou irregular, apresentando projeções para o meio externo. Foi possível observar pontos de contato intercelular embora estes não evidenciassem complexos juncionais (Figura 22). Além disso, foram observadas células de melanoma exibindo múltiplos lamelipódios no espaço alveolar, sugerindo que essas células tem alta capacidade de se movimentar (Figura 22D).

5.5.6 Metástases pulmonares derivadas de B16F10B – Células B16F10BM

As células B16F10BM apresentaram núcleo eucromático com a presença de um ou dois nucléolos, e, algumas vezes, foram observadas projeções nas membranas plasmáticas, sendo possível a observação de projeções filiformes longas. Foram observadas células de melanoma exibindo múltiplos lamelipódios no espaço alveolar, o que sugere que essas células tem alta capacidade de se movimentar (Figuras 23A e B). Os melanossomos foram observados principalmente formando agregados (Figura 23C). O citoplasma das células B16F10 apresentava RER e Golgi bem desenvolvidos e pode-se observar uma abundância de polissomos livres (Figura 23D). As células se tocavam, mas não houve evidência de zonas de adesão, junções tipo *gap* ou desmosomos.

Figura 22 – MET de metástases pulmonares em camundongos BALB/c a partir da inoculação de células B16F10. (A). Células metastáticas apresentando melanossomos (cabeça de seta); (B) Parênquima pulmonar apresentando melanossomos dispersos (cabeça de seta e em aglomerados (seta), em estágios variados de maturação (I, II e IV). (C) Células metastáticas exibindo RER bem desenvolvido, núcleo eucromático e melanossomos nos estágios I, II e IV. (D) Célula metastática no espaço alveolar (ea), apresentando melanossomos em todos os estágios de maturação (I-IV). m – mitocôndria; n – núcleo; nu – nucléolo. Barras – 3,0 μm (A); 2,6 μm (B, C e D).

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 23 – MET de metástases pulmonares em camundongos BALB/c a partir da inoculação de células B16F10B. (A). Parênquima pulmonar apresentando células metastáticas facilmente reconhecíveis pela quantidade de melanossomos (Mel). Uma célula menor é vista no espaço alveolar. (B). Célula metastática emitindo inúmeras projeções. (C) Os melanossomos nesse tipo de células se dispõem normalmente em grupos. Barras – 3,0 μm (A); 0,5 μm (B); 2,6 μm (C) e 0,8 μm (D).

Fonte: Elaborado pela autora.

5.6 Análise ultraestrutural – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

5.6.1 Células B16F10

As células B16F10 cultivadas *in vitro*, quando analisadas pela MEV, apresentaram agregados celulares que por vezes se mostraram formados por células bem próximas entre si (agregados compactos) (Figuras 24A e B), células isoladas (Figura 24C), e agregados menos compactos. Por vezes, as células apresentaram bolhas na membrana e muitos filopódios. Células em mitose também puderam ser observadas (Figura 24D). O grau de agregação entre as células pode ser mais bem percebido nos aumentos maiores, onde agregados que em aumentos menores pareciam ser compactos, se mostraram constituídos por células com baixa interação intercelular. Ou o mesmo agregado apresentava células bem coesas entre si e outras mais frouxamente aderidas; essas últimas, muitas vezes na periferia do agregado (Figuras 24E e F). Reforçando o que foi observado à microscopia óptica, as B16F10 apresentaram pleomorfismo celular, com células com citoplasma amplo e outras com morfologia fibroblastoide. Foram observadas áreas de contato intercelular que, por vezes, abrangeram grande extensão das regiões laterais das células. Essa interação também ocorreu por meio de projeções citoplasmáticas (Figuras 24G e H).

Figura 24 – MEV das células B16F10 cultivadas in vitro. (A e B) Agregados celulares (A- 48h e B-72h). (C) Uma célula com citoplasma amplo (96h). (D) Um grupo de células em divisão celular (seta) pode ser observado, bem como a presença de inúmeros filopódios na superfície das células (120h). Barras – 20 μm (A, B); 30 μm (C); 10 μm (D).
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 24 – MEV das células B16F10 cultivadas in vitro. (E e F) Agregados celulares representativos das interações celulares onde podem ser observadas células mais coesas entre si e células com menor grau de interação apresentando morfologia poliédrica e fibroblastoide. Essa última normalmente relacionada com fenótipo migratório (E – 96h e F - 120h). (G) As células se conectam por projeções, (96h) e/ou por contatos que abrangiam uma maior superfície celular (H). Barras – 30 μ m (E e F) e 100 μ m (G e H).
Fonte: Elaborado pela autora.

5.6.2 Células B16F10B

De maneira semelhante às células das quais se originaram, as B16F10B apresentaram pleomorfismo celular e múltiplos filopódios na membrana celular (Figuras 25 A e D). Houve presença de células poligonais, com formato fibroblastoide e células gigantes (Figura 25G). Os contatos intercelulares foram realizados por meio de projeções citoplasmáticas, bem como por regiões extensas de contato célula-célula (Figuras 25B, 25G, 25J e 25K).

As células B16F10B apresentaram agregados celulares menos compactos e menos bolhas na superfície celular quando comparados às células B16F10, em tempos correspondentes em cultura. Foram observadas algumas células com flutuações de membrana (Figura 25H).

Observaram-se agregados de células crescendo umas sobre as outras (empilhamento), mesmo quando havia espaço disponível no substrato (Figuras 25A, 25G e 25L). Células em divisão foram observadas com frequência mesmo em tempos extensos em cultura (120h, Figura 25M).

Figura 25 – MEV das células B16F10B cultivadas in vitro. (A) Agregados vistos em menor aumento. As células B16F10B apresentam interação celular por meio de projeções citoplasmáticas (B e C) e há inúmeros filopódios em sua superfície (D, detalhe de C – 48h). (A a D – 48h). Barras – 100 μm (A); 10 μm (B, C e D).
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 25 – MEV das células B16F10B cultivadas in vitro. De E a G é possível observar o pleomorfismo celular, com células poliédricas, fibroblastoides (E e F – 72h; G -96h) e células gigantes (citoplasma amplo) como a célula mostrada pela seta (G -96h). (H) Contato intercelular. A célula da esquerda apresenta inúmeros filopódios. Barras – 100 μm (E); 30 μm (F); 200 μm (G) e 2 μm (H).

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 25 – MEV das células B16F10B cultivadas *in vitro*. De I a K - sobreposição das células e pleomorfismo dos agregados. Em M (detalhe) - grande número de células em divisão. (i, j e K - 96h; L e M-120h. Barras – 20 μm (I, J e M); 100 μm (K e L); 10 μm (detalhe da M).
Fonte: Elaborado pela autora.

5.7 Padrões de crescimento

A morfologia da linhagem celular B16F10 e das sublinhagens celulares B16F10B, B16F10BM e B16F10M, quando cultivadas em monocamada sobre lamínulas de vidro, encontra-se no subitem 5.3.1.

O número de células por agregado celular ($n_{(s)}$) e o número total de agregados (s) dessas culturas foram contados manualmente (subitem 4.3.9) e utilizados para determinar as funções de distribuição de tamanho de agregados correspondentes.

As análises das funções de distribuição dessas células mostraram que para a linhagem B16F10 e para as sublinhagens B16F10BM e B16F10M é a lei de potência que rege o crescimento dessas células em todos os tempos analisados (Figuras 26, 28 e 29). A sublinhagem B16F10B apresentou no tempo $t=48h$ uma curva indicativa de um decaimento exponencial. A partir desse tempo, $t>48h$, passou a exibir um decaimento que segue leis de potência. Portanto, para a sublinhagem B16F10B há indícios de que houve uma transição nas leis que regem o crescimento, ou seja, as funções de distribuição passaram de um decaimento exponencial até 48 horas de cultura para exibir um decaimento que segue leis de potência (Figura 27). Entretanto, em tempos inferiores a 48h, pelo fato de só haver dois pontos não há como afirmar que essas curvas correspondem a um decaimento exponencial.

Para facilitar a visualização dos resultados, optou-se por apresentar nos gráficos, $n_{(s)}$ em função de s , que mostra as funções de distribuição de tamanho de agregados somente alguns dos tempos analisados para cada linhagem celular. No Anexo III podem-se encontrar os gráficos contendo todos os intervalos para todas as culturas analisadas.



Figura 26 – A função de distribuição de tamanhos de agregados n_s da linhagem B16F10, cultivada em diferentes tempos de observação, foi traçada em gráfico duplo logaritmo. Observar que as curvas correspondentes aos tempos 4, 24 e 48 horas apresentam decaimento em leis de potência (retas). O eixo das ordenadas representa ($n_{(s)}$) número de células por agregado celular e o eixo das abscissas, o número total de agregados (s).

Fonte: Elaborado por Marcelo Lobato Martins.

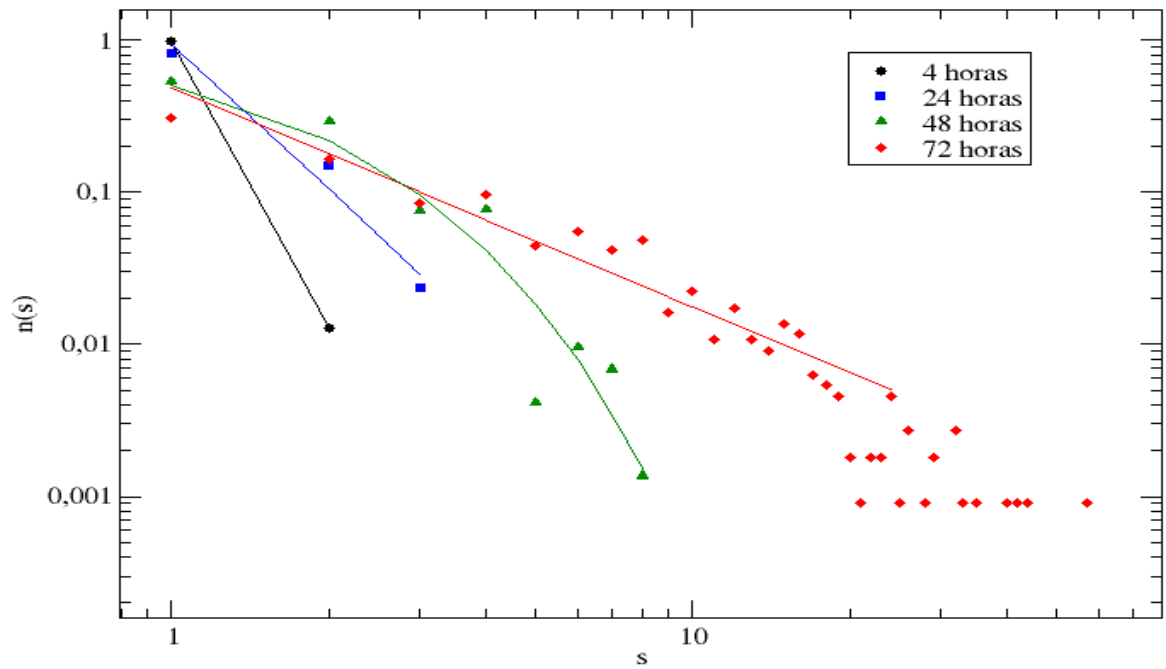


Figura 27 – A função de distribuição de tamanhos de agregados $n(s)$ da sublinhagem B16F10B, cultivada em diferentes tempos de observação, foi traçada em gráfico duplo logarítmico. Observar que as curvas correspondentes ao tempo $t = 48$ horas apresenta decaimento exponencial (curva). A partir desse tempo e as demais curvas apresentam decaimento em leis de potência (retas). O eixo das ordenadas representa $n(s)$ número de células por agregado celular e o eixo das abscissas, o número total de agregados (s).

Fonte: Elaborado por Marcelo Lobato Martins.

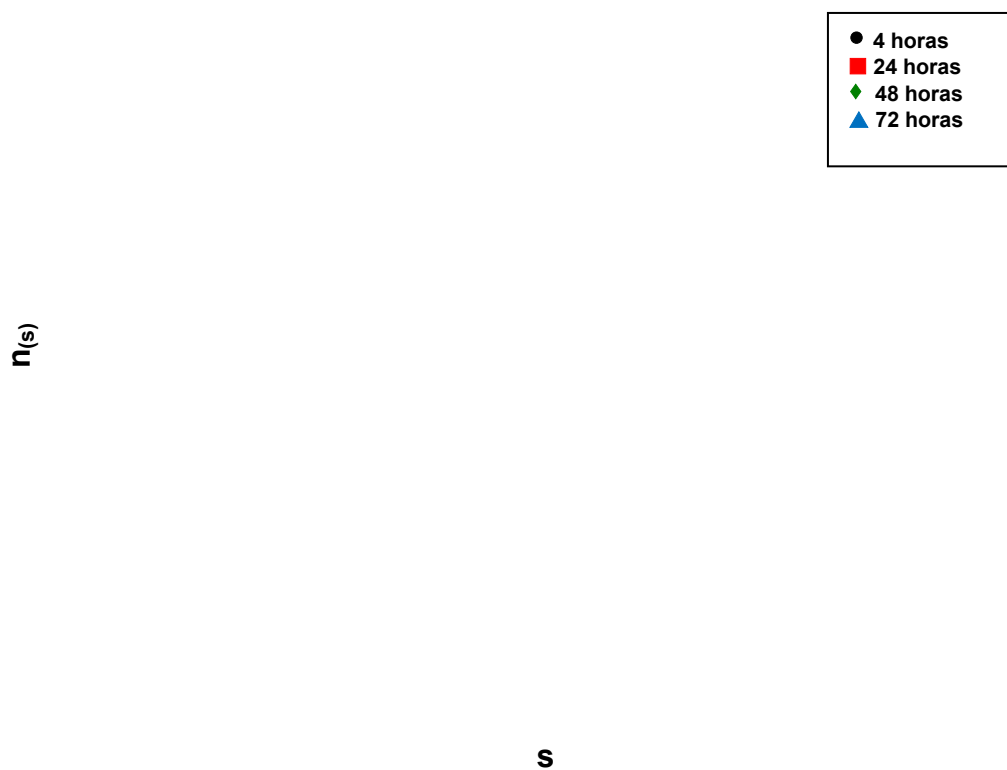


Figura 28 – A função de distribuição de tamanhos de agregados $n_{(s)}$ da sublinhagem B16F10BM, cultivada em diferentes tempos de observação, foi traçada em gráfico duplo logaritmo. Observar que as curvas correspondentes a todos os tempos apresentaram decaimento em leis de potência (retas). O eixo das ordenadas representa ($n_{(s)}$) número de células por agregado celular e o eixo das abscissas, o número total de agregados (s).
Fonte: Elaborado por Marcelo Lobato Martins.

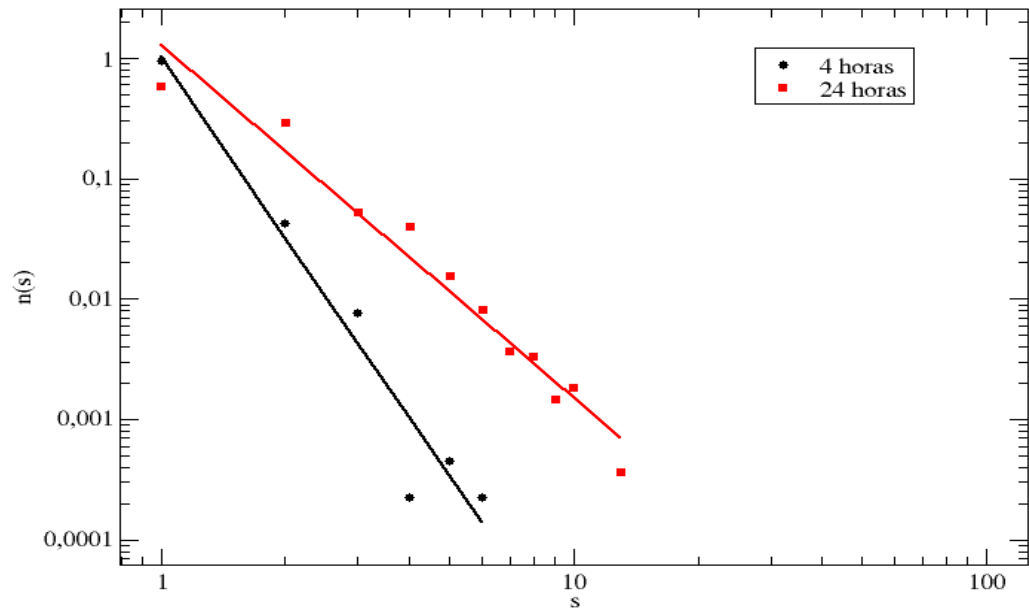


Figura 29 – A função de distribuição de tamanhos de agregados $n_{(s)}$ da sublinhagem B16F10M, cultivada em diferentes tempos de observação, foi traçada em gráfico duplo logarítmico. Observar que as curvas correspondentes a todos os tempos apresentaram decaimento em leis de potência (retas). O eixo das ordenadas representa ($n_{(s)}$) número de células por agregado celular e o eixo das abscissas, o número total de agregados (s).

Fonte: Elaborado por Marcelo Lobato Martins.

6. DISCUSSÃO

6.1 Estabelecimento das sublinhagens e características morfológicas *in vivo* e *in vitro*

Apesar de se tratar de um organismo alogênico, foram obtidos tumores primários e metastáticos do melanoma B16F10 em camundongos BALB/c. As neoplasias malignas são frequentemente compostas de subpopulações de células heterogêneas que podem ser caracterizadas, dentre outras propriedades, pela capacidade de propagar o tumor em modelos murinos (HELD *et al.*, 2010). Apesar de apenas uma fração de células do tumor ter o potencial de proliferação, alguns estudos mostram que a tumorigênese não é algo tão incomum. Quintana *et al.* (2008) induziram melanoma humano em camundongos NOD/SCID a partir da coinjeção de uma célula tumoral, não cultivada, com Matrigel. Porém, a frequência de células tumorigênicas varia muito e tem sido relacionada a características como o modelo e o tipo de tumor; a inabilidade de algumas células de crescerem em organismos alogênicos/xenogênicos (KELLY *et al.*, 2007; QUINTANA *et al.*, 2008; DICK, 2009; ALISON *et al.*, 2010); ao papel da resposta imunológica do hospedeiro (QUINTANA *et al.*, 2008) e a via de inoculação das células tumorais (PRETLOW *et al.*, 1991).

A heterogeneidade fenotípica e comportamental do tumor não é gerada somente pelas células tronco tumorais capazes de se autogerar e gerar células com diferentes potenciais de proliferação. Além disso, a heterogeneidade também pode ser gerada por variações dentro de diferentes partes do tumor com respeito a sua proximidade com a rede vascular e microambiente gerado por células não tumorais, como células inflamatórias, fibroblastos, dentre outras, que podem influenciar o comportamento do tumor e facilitar processos como invasão e metástases (ALISON, 2010; RAMBOW; LARUE, 2010; QUINTANA *et al.*, 2010; CHAFFER; WEINBERG, 2011).

É provável que as células provenientes do tumor primário, ou das metástases sejam pouco imunogênicas. Isso porque, para essas células se estabelecerem, elas evadiram-se de mecanismos de apoptose, venceram barreiras imunológicas além de estimularem a angiogênese em um organismo não singenético. Portanto, o fato de os animais transplantados com células B16F10 terem desenvolvido o tumor aliado a fatores como o estabelecimento de metástases, mostra a baixa imunogenicidade dessas células. A baixa regulação ou a falta de expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade tipo I (MHCI), é um dos principais mecanismos de evasão da resposta imune utilizados pelas células tumorais, e estudos tem mostrado que as células B16F10 expressam poucas moléculas de MHCI em sua superfície e

não expressam MHCII (LEVITSK *et al.*, 1994; SELIGER *et al.*, 2001; FREITAS *et al.*, 2004; RODRIGUÉZ *et al.*, 2007).

Outros estudos publicados já haviam relatado o fato de haver crescimento de melanoma B16 e de sublinhagens derivadas em camundongos BALB/c (FREITAS *et al.*, 2004; MENEGUELO, 2007; QIN, *et al.*, 2011), porém, esses estudos utilizaram a linhagem BALB/c para testar a atividade antitumoral de substâncias e a heterogeneidade tumoral. No presente estudo, caracterizaram-se morfológicamente as células provenientes de passagens *in vivo* na linhagem BALB/c, bem como seus regimes de crescimento.

Os tumores primários foram obtidos em tempos diferentes entre os dois grupos experimentais. O crescimento do tumor é influenciado por alguns fatores, dentre eles: a velocidade do crescimento das células tumorais, a angiogênese e a heterogeneidade das células tumorais. Muitas vezes, atribui-se a alta velocidade de crescimento do tumor ao encurtamento do ciclo celular, mas essa ideia é errônea, pois isso não ocorre. A velocidade de crescimento do tumor está associada ao número de células produzidas em relação ao número de células perdidas (mortas), ou seja, produzem-se mais células no tumor porque a maioria delas evade-se dos mecanismos de apoptose. A angiogênese de um tumor também influencia em seu crescimento, uma vez que se essa capacidade for aumentada faz com que a nutrição do tumor seja otimizada; o que possibilita ao tumor crescer mais.

Com relação ao modelo experimental de produção de metástases, obteve-se um menor número de nódulos metastáticos pulmonares em um dos grupos que recebeu a inoculação de células B16F10B isso talvez esteja relacionado a dificuldade inerente a realização da técnica de inoculação. Nesse caso, algum(s) animal(is) talvez não tenha recebido as células (grupo 2). Aliado a esse fato, outro fator importante diz respeito à concentração de células inoculadas, pois uma menor concentração de células (menor quantidade de antígenos tumorais) seria menos perceptível ao sistema imune ou capaz de ativá-lo. Sendo assim, haveria uma maior probabilidade de as células tumorais do grupo que recebeu menor quantidade de células (grupo 1) prosperarem quando comparado com o grupo que recebeu uma maior concentração de células (grupo 2).

Embora o número de células inoculadas não seja o fator mais importante para determinar se haverá ou não crescimento tumoral, acredita-se que na verdade ele só influencia a velocidade do crescimento. No caso de metástases, por exemplo, o tamanho dos êmbolos tumorais formados no leito vascular e a homogeneidade das células do êmbolo é que vão influenciar o desenvolvimento das lesões, uma vez que de 90-95% das células que entram na circulação morrem (FIDLER, 1973; KELLY, *et al.*, 2007; RAMBOW; LARUE, 2010).

Porém, como houve crescimento de metástases em número satisfatório em um dos animais do grupo e em todos os do outro grupo experimental, e sendo o objetivo principal o estabelecimento das células metastáticas em cultura, e não a determinação de uma concentração ótima para indução de lesões pulmonares, não houve repetição do experimento. Entretanto, ao se comparar o número de metástases entre os animais que receberam 4×10^5 células B16F10 e B16F10B, percebe-se que a partir da sublinhagem B16F10B surgiu um maior número de lesões metastáticas.

O desenvolvimento de uma metástase é dependente da interação entre fatores do hospedeiro e características intrínsecas das células tumorais. O processo de metástase é altamente seletivo, e a lesão metastática representa o evento final de muitos eventos destrutivos a que somente algumas células podem sobreviver (FIDLER, 1978). Nakamura *et al.* (2002) mostraram que o alto potencial maligno e formador de metástases pulmonares da B16F10 não se correlaciona, necessariamente, com o número de passagens *in vivo*, e mostrou que mesmo com *uma passagem* é possível selecionar células com alta capacidade de induzir metástases *in vivo*.

As sublinhagens celulares estabelecidas apresentaram características comuns e diferenciais entre si. Parâmetros como, capacidade de gerar metástases, aparentemente maior nas células B16F10B (embora não conclusiva pelos resultados apresentados), taxa de proliferação celular, presença de partículas virais, que ocorreu somente para a linhagem original, B16F10, e para a sublinhagem B16F10B quando em cultura, apresentaram-se de maneira diferencial entre as linhagens. A instabilidade genética e as pressões seletivas podem ter propiciado variações clonais, tendo como resultado a heterogeneidade que foi vista entre as sublinhagens. As passagens *in vivo* e *in vitro* a que essas células foram submetidas podem ter contribuído para gerar essa heterogeneidade. Porém, mesmo com a diversidade fenotípica observada, as sublinhagens derivadas da B16F10 mostraram que as pressões de seleção não alteraram alguns parâmetros que são comuns a todas as linhagens, tais como, pleomorfismo celular (menos perceptível nas células B16F10M) e presença de pigmentação melânica.

Os resultados ora encontrados, indicam que assim como a linhagem B16F10, as sublinhagens derivadas contêm subpopulações de células heterogêneas nas características analisadas, mas que essas não são capazes de induzir metástases em nenhuma das duas vias de inoculação utilizadas, uma vez que não foram encontradas lesões em outros órgãos, quando realizadas as análises macroscópicas, nem células tumorais quando foram analisados microscopicamente os fígados dos animais dos grupos experimentais.

Nas metástases experimentais, nas quais as células são injetadas diretamente no leito vascular, o inóculo consiste de células sozinhas, não agregadas. Sendo assim, espera-se que cada lesão formada seja homogênea, com comportamentos e características distintas, como velocidade de crescimento, propriedades antigênicas e comportamento invasivo. Porém, a capacidade das células tumorigênicas de recuperar a heterogeneidade fenotípica das células parentais após o estabelecimento do tumor é considerada uma característica intrínseca às células tronco tumorais. Essa propriedade pode ser uma sugestão de que as células sofrem uma mudança reversível na expressão de alguns marcadores quando *in vivo* (QUINTANA *et al.*, 2010).

Apesar de não quantificada, as sublinhagens celulares B16F10B, -BM e -M apresentaram mais melanossomos que a linhagem original, B16F10. A heterogeneidade fenotípica caracterizada por uma variedade de parâmetros biológicos, tais como a capacidade das subpopulações de células tumorais de formarem metástases, a sensibilidade diferencial a drogas exibida por células dentro do mesmo tumor e a expressão diferencial de moléculas de adesão podem explicar as diferenças na distribuição de melanossomos observada nas células B16F10 e nas sublinhagens derivadas (STACKPOLE, 1983; ELLER *et al.*, 1996; FREITAS *et al.*, 2004). Além disso, de acordo com Eller *et al.* (1996), o estresse pode afetar a melanogênese estimulando-a quando há danos ao DNA. Assim, o estresse a que as células B16F10B, -BM e -M foram submetidas em diferentes momentos, como por exemplo, a sobrevivência no hospedeiro após a inoculação *in vivo*, ativação dos mecanismos de escape para conseguir se estabelecer como tumor, dissociação das células do tumor primário para se estabelecer uma cultura e adequação às novas condições de cultivo *in vitro*, podem ter contribuído para estas sublinhagens produzirem mais melanossomos quando comparadas com as células B16F10. Essa diferença na quantidade de melanossomos produzida pode também ser explicada pela propriedade chamada “mudança fenotípica” (WELCH *et al.*, 1984a; 1984b) que demonstra que certas características, tais como a morfologia celular, a taxa de crescimento, cariótipo e ploidia são consistentemente alteradas durante o crescimento *in vitro*. É importante ressaltar que essa diferença foi analisada de uma maneira apenas qualitativa e nenhum estudo quantitativo foi realizado.

A análise ultraestrutural em MET revelou que as células de melanoma apresentaram núcleo eucromático, RER e Golgi desenvolvidos, assim como abundância de polissomos livres, características típicas de células com intensa atividade metabólica. Pré-melanossomos (estágios I e II) bem como melanossomos maduros (estágios III e IV) foram observados nas três sublinhagens e na linhagem original, B16F10. As mitocôndrias normalmente numerosas mostraram-se com

morfologia regular a não ser em áreas mais centrais do tecido tumoral, onde apresentaram indícios de cristólise, o que se acredita ser um sinal de lesões celulares reversíveis como degeneração hidrópica, decorrente da baixa disponibilidade de oxigênio e nutrientes que normalmente ocorre no centro do tumor e/ou morte celular.

A análise ultraestrutural em MET para as células da linhagem B16F10 e da sublinhagem B16F10B revelou a presença de partículas virais morfologicamente comparáveis a partículas intracisterna tipo A (IAP). As IAPs são encontradas em várias linhagens de camundongos, tecidos normais e tumorais, bem como em linhagens de células normais e cancerosas (BIBBY; SMITH, 1975; PIKÓ *et al.*, 1984; RIBET *et al.*, 2008b; STOCKING; KOZAK, 2008; QIN *et al.*, 2010). Nas linhagens de melanoma B16F10 e B16F10B as IAPs foram observadas no interior de cisternas expandidas distribuídas por todo o citoplasma e próximo a organelas celulares como mitocôndrias, RER e melanossomos, o que corrobora com estudos realizados para as linhagens celulares B16F10 e BL6, onde além de IAPs foram observadas partículas virais tipo C (LI *et al.*, 1996; MUSTER *et al.*, 2003). Sucessivas passagens *in vitro* e manipulação excessiva das linhagens celulares, podem alterar a expressão gênica e promover infecção horizontal, sendo assim esses mecanismos podem facilitar a expressão de partículas virais. Além disso, a propriedade chamada deriva fenotípica pode explicar as alterações no fenótipo celular (morfologia celular, taxa de crescimento, cariótipo) que ocorrem em células mantidas em cultura (WELCH *et al.*, 1984a; 1984b; RAISCH *et al.*, 1998; GOFF, 2004; WEISS, 2010).

Apesar de terem sido observados pontos de contato intercelulares nas células de melanoma em cultura e nos tecidos (tumor primário e metástases pulmonares), não houve evidência de zonas de adesão, junções tipo *gap* ou desmosomos entre as mesmas. Os tumores sólidos desenvolvem-se em um microambiente formado por células tumorais, células não tumorais e componentes da matriz extracelular. Durante a progressão tumoral, a presença e a quantidade desses constituintes, bem como a dinâmica de expressão de proteínas celulares, sofrem alterações (LI *et al.*, 2001; CULP *et al.*, 2006; SCHMITT *et al.*, 2007). Muitas proteínas estão envolvidas nas estruturas tumoral e tecidual, bem como na lise dos tecidos durante processos, como invasão e metástase. À microscopia eletrônica de transmissão foi possível a identificação de pontos de contato celular no tecido tumoral, as células ficavam muito próximas umas das outras, mas complexos juncionais intercelulares não foram identificados. À microscopia eletrônica de varredura, a interação entre as células também pode ser observada. Os agregados celulares se mostraram muito heterogêneos em todas as culturas, tanto em relação à morfologia celular quanto ao grau de compactação do agregado (Figuras 24 e 25). Um mesmo agregado celular apresentava regiões com células que estavam mais próximas entre si, com interações

que ocupavam grande parte de suas membranas laterais e outras regiões com células que se conectavam apenas por finas projeções citoplasmáticas. A maior parte das células menos justapostas ocorreu na periferia do agregado, o que pode indicar uma mobilidade maior desse grupo de células (Figuras 24G e 24L).

Observaram-se células crescendo umas sobre as outras (empilhamento), mesmo quando havia espaço disponível no substrato (Figuras 24A, 24G e 24L). Essa característica pode ser explicada pela perda da inibição do crescimento por contato que é uma propriedade intrínseca às células tumorais e pode ser observada nas células B16F10 e B16F10B, tanto à microscopia óptica quanto à MEV (Figuras 24 e 25). Células em divisão também foram observadas com frequência mesmo em tempos extensos em cultura.

A heterogeneidade celular mostrada à microscopia óptica também foi evidente nas análises pela ultramicroscopia. À exceção das células B16F10M, que se mostraram mais homogêneas com relação à morfologia, as demais células mostraram-se pleomórficas. Essa sublinhagem também mostrou ter baixa interação intercelular, emitindo poucos prolongamentos celulares.

Na pele normal, melanócitos expressam predominantemente a E-caderina, e em menor quantidade a P-caderina. As caderinas são glicoproteínas, que formam uma superfamília de moléculas de adesão cálcio-dependentes, que desempenham um papel crucial na adesão celular e, conseqüentemente, na organização e manutenção tecidual e poderiam estar, como outras moléculas de adesividade celular, sendo expressas de forma alterada ou diferenciada nos diferentes estágios do crescimento celular (JOUNEAU *et al.*, 2000; BACHMANN *et al.*, 2005). Muitos estudos têm demonstrado uma troca no padrão de expressão dessas caderinas nas células melanocíticas durante a progressão do melanoma. A perda de expressão de E- e P-caderinas e o ganho de expressão de N-caderina facilita a associação das células do tumor com células do estroma circundante, vasos sanguíneos e linfáticos que promove o aumento da capacidade invasiva das células tumorais (HSU *et al.*, 1996; LI *et al.*, 2001b; HAAS, *et al.*, 2004; SCHMITT *et al.*, 2007). As conseqüências funcionais das alterações no padrão de expressão de proteínas como as caderinas clássicas e desmossômicas têm sido descritas. Li *et al.* (2001a) sugerem que as proteínas caderina-E, desmogleína -1 (Dsg-1) e placoglobina presentes nos melanócitos normais formem um complexo que atua regulando a adesão intercelular. Esse complexo, por sua vez, pode ser regulado negativamente pelo fator de crescimento de hepatócito (HGF) no melanoma o que pode levar *in vivo* a uma diminuição da expressão das proteínas do complexo e conseqüentemente, a uma menor adesividade entre as células, além da perda do controle dos queratinócitos sobre os melanócitos. Uma vez

que as estruturas de adesão e/ou moléculas de adesão célula-célula estejam alteradas, as células malignas podem migrar e metastatizar.

Jouneau *et al.* (2000) analisaram a expressão de caderinas e cateninas em linhagens celulares derivadas de melanoma murino, dentre as quais a B16F10, e reportaram que essa linhagem expressava a proteína N-caderina, além de apresentar transcritos de E-caderina. Marçal (2010) estudou o padrão de expressão das caderinas E-, -P e -N na linhagem B16F10 e nas sublinhagens B16F10B e B16F10M, porém essas proteínas não foram detectadas pelo método de *western blotting*, na concentração proteica utilizada. HSU *et al.* (1996) demonstraram que a quantidade de E- e P-caderinas em linhagens melanocíticas em cultura diminui gradativamente com o número de repiques a que as células são submetidas, o que pode ter ocorrido com as linhagens analisadas por Marçal (2010). Portanto, embora sejam perceptíveis os pontos de contatos intercelulares nas linhagens celulares aqui apresentadas (subitens 5.5 e 5.6), outras análises são necessárias para se caracterizar as moléculas de adesão envolvidas na interação célula-célula.

6.2 Regimes de crescimento

Os resultados obtidos para a função de distribuição de tamanho de agregados mostraram que as linhagens analisadas B16F10, -BM e -M sempre exibiram um comportamento de lei de potência. Além disso, há um indicativo de que, para as células B16F10B, as funções de distribuição sofrem uma transição de um decaimento exponencial para um que segue lei de potência.

Um decaimento que segue lei de potência é típico de aglomerados que não possuem um tamanho característico, ou seja, apresentam uma propriedade fractal. Do ponto de vista biológico, esse comportamento pode estar relacionado a alterações nos mecanismos de controle da divisão celular. Outro fator que pode ser responsável por esse comportamento é a estabilidade dos aglomerados celulares formados. As células B16F10, segundo Jouneau *et al.* (2000), expressam N-caderina e possuem transcritos de E-caderina. As N-caderinas medeiam interações homotípicas entre células de melanoma e heterotípicas entre melanoma e fibroblastos ou células do endotélio vascular (LI *et al.*, 2001b). Durante a migração das células precursoras dos melanócitos da crista neural para a epiderme, passam a diminuir a expressão de N-caderina e passam a expressar E-caderina. Na progressão tumoral essa plasticidade novamente é ativada, sofrendo uma inversão, as células passam a expressar N-caderina ao invés de E-caderina. Essa troca é frequentemente relacionada à capacidade invasiva e metastática das células tumorais (MONIER-GAVELLE; DUBAND, 1997; KRENGEL *et al.*, 2004). Sendo assim, o fato de as células B16F10

expressarem N-caderina as capacita a serem mais invasivas, mas essas moléculas de adesão também estão presentes nas adesões intercelulares do melanoma. Para as sublinhagens B16F10BM e B16F10M, o único estudo relacionado com análise de suas moléculas de adesão foi realizado por Marçal (2010) e nas condições em que foram realizados os experimentos não foram detectadas as E-, N- e P- caderinas. Outras análises envolvendo a expressão de moléculas de adesão para as linhagens estudadas se fazem necessárias para que se possa ter uma explicação conclusiva a respeito do regime de crescimento apresentado por essas células.

Como pode ser visto na Figura 27, a linhagem B16F10B exibe um comportamento que indica ser uma transição, que ocorre cerca de 48 horas após o plaqueamento, período no qual as funções de distribuição de tamanho de agregados decaem exponencialmente. Terminada essa transição, a $n_s(t)$ para a linhagem B16F10B passa a ser descrita por leis de potência. Nesse ponto faz-se necessário chamar novamente a atenção para o fato de que os tempos anteriores a 48 horas, 4 e 24 horas, serem representados apenas por dois pontos, o que impossibilita a demonstração de que esses tempos sejam regidos por um regime de crescimento exponencial. Um decaimento exponencial implica a existência de um tamanho característico para os agregados celulares. A mudança na dinâmica de crescimento para um decaimento que segue lei de potência (típico de aglomerados que não possuem um tamanho característico) sugere que o crescimento contínuo em cultura pode exercer forças seletivas as quais, provavelmente, alteram a regulação de mecanismos como dependência de ancoragem, inibição por contato célula-célula e crescimento dependente de densidade. Corroborando com esses resultados estão os trabalhos que Chow *et al.* (1994), Rubin *et al.* (1994a; 1994b) e Yao *et al.* (1994) obtiveram estudando as células NIH 3T3 (fibroblastos de camundongo). Eles mostraram que, quando essas células eram mantidas em cultura em alta densidade celular, adquiriam a capacidade de gerar focos transformados. Uma vez que essa alteração do comportamento celular aparece apenas quando as células atingem a confluência, ou seja, sua taxa de divisão está reduzida, esses autores sugeriram que a densidade populacional, não o número total de divisões celulares, seria a força condutora dessa transformação.

Se a adesividade celular é baixa, a estabilidade de grandes aglomerados de células B16F10B também é baixa e, conseqüentemente, é esperada a existência de tamanhos característicos pequenos para esses aglomerados celulares e funções de distribuição exponenciais decrescentes. Então, após um tempo em cultura, parece que as células B16F10B sofrem alteração no padrão de expressão de moléculas de adesividade celular, tornando-se capazes de formar agregados maiores e mais estáveis regidos por lei de potência para as funções de distribuição de tamanhos de

agregados. Essa transição provavelmente está associada a mudanças na expressão das moléculas de adesividade celular.

É importante ressaltar que transições fenotípicas ocorrem em vários fenômenos biológicos, como durante o desenvolvimento embrionário, por exemplo, nos processos de histogênese do coração e sistema esquelético, e em certas situações patológicas. No caso de carcinomas ocorre uma transição epitélío-mesenquimal (TEM). As células de carcinomas, de origem epitelial, passam a expressar genes tipicamente expressos por células de tecido conjuntivo. Dessa forma, as células deixam de apresentar uma morfologia epitelioide, menos migratória, e passam a apresentar uma morfologia fibroblastoide, mais migratória (THIERY, 2002; 2003). Alterações moleculares que fazem com que uma célula epitelial adquira características mesenquimais são a perda ou desregulação na expressão de moléculas de adesão, como a E-caderina (THIERY, 2002). Outra característica é a expressão de proteínas específicas de tecidos mesenquimais, como a fibronectina. Esse padrão de expressão proteica está associado a mudanças no padrão de organização do citoesqueleto e com perda de polaridade das células (HAY, 2005). Outro processo no qual ocorre transição fenotípica é durante a progressão do melanoma, na qual um melanócito normal se torna, por meio de desregulações nos processos de crescimento e diferenciação, nevo displásico e mutações adicionais os transformam em um melanoma, inicialmente com crescimento radial que progride para um crescimento vertical e finalmente se torna um melanoma metastático (GAGGIOLI; SAHAI, 2007). Nesse caso, durante a progressão ocorre uma transição epitelial-mesenquimal para uma mesenquimal-epitelial.

As transições fenotípicas relacionados com a dinâmica de agregação de células em cultura, como observado para as células B16F10B e para as células de carcinoma de mama, MCF-7 (VILELA *et al.*, 2007), para as células MDCK (células normais de rim de cão) e células de carcinoma de laringe humana, Hep-2 (MENDES *et al.*, 2001), não são universais. Em algumas linhagens de células, uma das etapas de transformação é desencadeada pelo aumento das condições inibitórias para o crescimento e envolve a modulação de mecanismos celulares de adesão célula-célula e célula-substrato. No entanto, esta resposta pode ocorrer por meio de mecanismos completamente diferentes. Para as células MCF-7, a transição leva ao aumento das migrações por meio de um fenótipo menos adesivo, enquanto que para as células B16F10B, MDCK e HEp-2 o comportamento da função de distribuição do tamanho de agregados $n_{(s)}$ sugere que os fenótipos mais fortemente adesivos são selecionados após a transição (VILELA *et al.*, 2007). Essas respostas diversas são indicativas da complexidade das transições fenotípicas. Portanto, para melhor entender como ocorre o fenômeno da transição são necessários mais estudos sobre a dinâmica de

agregação das células *in vivo* e *in vitro*, bem como uma comprovação por meio de análises da integridade genômica que possam explicar como ocorre essa possível mudança genética, seja ela por mutação ou por mecanismos epigenéticos.

7 CONCLUSÕES

- ✓ A partir da inoculação de células B16F10 em camundongos alogênicos, BALB/c, obteve-se crescimento de tumor subcutâneo, o qual deu origem a uma sublinhagem celular denominada B16F10B;
- ✓ Estabeleceu-se um modelo de crescimento de metástases pulmonares em camundongos BALB/c a partir da inoculação endovenosa das células B16F10 e B16F10B;
- ✓ Foram estabelecidas as sublinhagens celulares B16F10M e B16F10BM a partir das metástases pulmonares induzidas pela inoculação das células B16F10 e B16F10M, respectivamente;
- ✓ A análise histopatológica do tumor subcutâneo mostrou que o mesmo era bem vascularizado, apesar de apresentar áreas de necrose. Uma heterogeneidade celular pode ser observada e os melanócitos tumorais apresentarem, por exemplo, dois padrões de distribuição de melanina. Em algumas células a melanina estava disposta preferencialmente próxima ao limite celular e, em outras, o pigmento encontrava-se disperso no citoplasma e próximo ao limite celular;
- ✓ A análise histopatológica das metástases pulmonares apresentaram características comuns às células do tumor primário, tais como pleomorfismo celular e nuclear, hiper cromasia celular e necrose;
- ✓ O estudo histopatológico, bem como as análises utilizando MEV e MET, mostrou que a linhagem celular B16F10 e as sublinhagens dela derivadas apresentam algumas características em comum, como pleomorfismo celular e pigmentação melânica, além de características diferenciais, como taxa de proliferação celular e presença de partículas virais tipo A (B16F10 e B16F10B) *in vitro*;
- ✓ A análise ultraestrutural à MEV e à MET revelou regiões de contato célula-célula, porém à MET não foi possível caracterizá-las como zonas de adesão, tais como desmossomo ou junção tipo *gap*;
- ✓ A linhagem celular B16F10, bem como as sublinhagens B16F10BM e B16F10M, desde o início de seu crescimento até atingir a confluência, exibe funções de distribuição $n_s(t)$ que decaem de acordo com leis de potência; e
- ✓ A função de distribuição de tamanhos de agregados para B16F10B mostra dois comportamentos distintos, embora outros experimentos sejam necessários para melhor caracterizar a transição fenotípica sugerida para essa sublinhagem.

8 PERSPECTIVAS

Após a realização do presente estudo surgem novas perspectivas para estudos futuros, como por exemplo:

- ✓ Análise da expressão de moléculas de adesão intercelular, na linhagem de melanoma B16F10, bem como em suas sublinhagens B16F10B, -BM e -M;
- ✓ Correlacionar a expressão das moléculas de adesão às leis de escala que regem o crescimento da linhagem celular B16F10 e suas sublinhagens;
- ✓ Verificar, por meio de técnicas de citogenética, a integridade genômica da linhagem B16F10 e compará-la a das sublinhagens dela derivadas; e
- ✓ Avaliar o efeito citotóxico de compostos quimioterápicos *in vitro* em células das linhagens B16F10 e nas sublinhagens dela derivadas, bem como avaliar o efeito *in vivo* desses compostos em tumores primários e em metástases induzidas a partir da inoculação das células de melanoma murino.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALISON, M. R.; ISLAM, S.; WRIGHT, N. A. Stem cells in cancer: instigators and propagators? **J Cell Sci.**, v.123, p.2357-2368, 2010.

ALVES, S. G.; MARTINS, M. L. Cluster-cluster aggregation with particle replication and chemotaxy: a simple model for the growth of animal cells in culture. **J Stat Mech.**, P09012, 2010. Doi:10.1088/1742-5468/2010/09/P0901.

BACHMANN, I.; STRAUME, O.; PUNTERVOLL, H. E.; KALVENES, M. B.; AKSLEN, L. A. Importance of P-Cadherin, B-Catenin, and Wnt5a/Frizzled for Progression of Melanocytic Tumors and Prognosis in Cutaneous Melanoma. **Clin Cancer Res.**, v.11, n.24, p.8606-8614, 2005.

BAISH, J. W.; JAIN, R. K. Fractals and Cancer. **Cancer Res.**, v.60, p.3683-3688, 2000.

BIBBY, M. C.; SMITH, G. M. Increase BALB/c in type A virus particles induced in mouse epidermis during chemical carcinogenesis. **Br J Cancer**, v.32, p.660-666, 1975

BOGIRIEDER, T.; ELDER, D. E.; HERLYN, M. Molecular and Cellular biology *in: Cutaneous Melanoma*, p.713-751. Edited by BALCH, C. M.; HOUGHTON, A. N.; SOBER, A. J.; SOONG, S. 4. ed. Quality Medical Publishing, Inc., 2003.

BOLLOS, R. H.; NAKAMURA, M. U.; LAPCHICK, V. B. V.; BEVILACQUA, E. M. A. F.; CORREA, M.; DAHER, S.; ISHIGAI, M. M. S.; JASIULIONIS, M. G. Metastatic melanoma positively influences pregnancy outcome in a mouse model: could a deadly tumor support embryo life? **Clin Exp Metastasis.**, v.25, p.65-73, 2008.

BRASILEIRO FILHO, G.; PEREIRA, F. E. L.; GUIMARÃES, R. C. Distúrbios da proliferação e diferenciação celulares. In: **Bogliolo Patologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

BRÚ, A.; ALBERTOS, S.; SUBIZA, J. L.; GARCÍA-ASENJO, J. L.; BRÚ, I. The Universal Dynamics of Tumor Growth. **Biophys J.**, v.85, p.2948-2961, 2003.

BRÚ, A.; CASERO, D.; FRANCISCIS, S.; HERRERO, M. A. Fractal analysis and tumour growth. **Math Comp Mod.**, v.47, p.546-559, 2008.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. **Science.**, 331, p.1559-1564, 2011.

CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nat Rev Cancer**, v.2, p.563-572, 2002.

CHEN, K. G.; VALENCIA, J. C.; LAI, B.; ZHANG, G.; PATERSON, J. K.; ROUZAUD, F.; BERENS, W.; WINCOVITCH, S. M.; GARFIELD, S. H.; LEAPMAN, R. D.; HEARING, V. J.; GOTTESMAN, M. M. Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas. **Proc Natl Acad Sci.**, v.103, n26, p.9903-9907, 2006.

CHEN, K. G.; LEAPMAN, R. D.; ZHANG, G.; LAI, B.; VALÊNCIA, J. C.; CARDARELLI, C. O.; VIEIRA, W. D.; HEARING, V. J.; GOTTESMAN, M. M. Influence of Melanosome Dynamics on Melanoma Drug Sensivity. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.101, p.1259-1271, 2009.

CHOW, M.; YAO, A.; RUBIN, H. Cellular epigenetics: topochronology of progressive "spontaneous" transformation of cells under growth constraint. **Proc Natl Acad Sci.**, v.91, p.6619-6623, 1994.

COLLADO, M.; BLASCO, M. A.; SERRANO, M. Cellular Senescence in Cancer and Aging. **Cell.**, v.130, p.223-233, 2007.

COLLADO, M.; SERRANO, M. Senescence in tumors: evidence from mice and humans. **Nat Rev Cancer.**, v.10, p.51-57, 2010.

CROSS, S. S.; COTTON, W. K. The fractal dimension maybe a useful morphometric discriminant in histopathology. **J Pathol.**, v.166, p.409-411, 1992.

CROSS, S. S. Fractals in pathology. **J Pathol.**, v.182, p.1-8, 1997.

CULP, W.D.; NEAL, R.; MASSEY, R.; EGEVAD, L.; PISA, P.; GARLAND, D. Proteomic analysis of tumor establishment and growth in the B16-F10 mouse melanoma model. **J Proteome Res.**, v.5, p.1332-1343, 2006.

DICK, J. E. Looking ahead in cancer stem cell research. **Nat biotechnol.**, v.27, n.1, p.44-46, 2009.

DUDA, D. G.; DUYVERMANA, A. M. M. J.; KOHNOA, M.; SNUDERLB, M.; STELLERA, E. J. A.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. **Proc Natl Acad Sci.**, v.107, n.50, p.21677-21682, 2010.

ELLER, M. S.; OSTROM, K.; GILCHREST, B. A. DNA damage enhances melanogenesis. **Proc Natl Acad Sci.**, v.93, p.1087-1092, 1996.

ESTELLER, M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. **Br J Cancer.**, v.94, p.179-183, 2006.

FERREIRA JR., S. C.; MARTINS, M. L.; VILELA, M. J. A growth model for primary cancer. **Phys A.**, v.261, p.569-580,1998.

FERREIRA JR., S. C.; MARTINS, M. L.; VILELA, M. J. A growth model for primary cancer (II). New rules, progress curves and morphology transitions. **Phys A.**, v.272, p.245-256,1999.

FERREIRA JR., S. C.; MARTINS, M. L.; VILELA, M. J. Morphology transitions induced by chemotherapy in carcinomas *in situ*. **Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.**, v.67 (5 Pt 1):051914, 2003.

FIDLER, I. J. Selection of Successive Tumour Lines for Metastasis. **Nat New Biol.**, v.241, p.148-149, 1973.

FIDLER, I. J. Biological Behavior of Malignant Melanoma Cells Correlated to Their Survival *in vivo*. **Cancer Res.**, v.35, p.218-224, 1975.

FIDLER, I. J. Tumor Heterogeneity and the Biology of Cancer Invasion and Metastasis. **Cancer Res.**, v.38, p.2651-2660, 1978.

FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited. **Nat Rev Cancer.**, v.3, p.453-458, 2003. Doi:10.1038/nrc1098

FREITAS, Z. F.; RODRIGUES, E. G.; OLIVEIRA, V.; CARMONA, A. K.; TRAVASSOS, L. R. Melanoma heterogeneity: differential, invasive, metastatic properties and profiles of cathepsin B, D and L activities in subclones of the B16F10-NEX2 cell line. **Melanoma Res.**, v.14, n.5, p.333-344, 2004.

FRESHNEY, R. I. Transformation. In: **Culture of animal cells: a manual of basic techniques**. Ed. Wiley-Liss, 4. ed, p.269-283, 2000.

FUKUMASU, H.; AVANZO, J. L.; NAGAMINE, M. K.; BARBUTO, J. A.; RAO, K. V.; DAGLI, M. L. Z. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Braz J Med Biol Res.**, v.41, p.305-310, 2008.

GAGGIOLI, C.; SAHAI, E. Melanoma invasion – current knowledge and future Directions. **Pigment Cell Res.**, v.20, p.161-172, 2007.

GOFF, S. P. Retrovirus restriction factors. **Mol Cell.**, v.16, p.849-859, 2004.

GOVINDARAJAN, B.; SLIGH, J. E.; VINCENT, B. J.; LI, M.; CANTER, J. A.; NICKOLOFF, B. J.; RODENBURG, R. J.; SMEITINK, J. A.; OBERLEY, L.; ZHANG Y.; SLINGERLAND, J.; ARNOLD, R. S.; LAMBETH, J. D.; COHEN, C.; HILENSKI, L.;

GRIENGLING, K.; MARTINEZ-DIEZ, M.; CUEZVA, J. M.; ARBISER, J. L. Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. **J Clin Invest.**, v.117, n.3, p.719-729, 2007.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v.445, p.851-857, 2007. Doi:10.1038/nature05661.

GUPTA, G. P.; MASSAGUÉ, J. Cancer Metastasis: Building a Framework. **Cell**, v.127, p.670-695, 2006.

HA, L.; NOONAN, F. P. D. E.; FABO, E. C.; MERLINO, G. Animal Models of Melanoma. **J Invest Dermatol Symp Proc.**, v.10, n.2, p.86-88, 2005.

HAASS, N. K.; SMALLEY, K. S. M.; HERLYN, M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. **J Mol Histol.**, v.35, p.309-318, 2004.

HAASS, N. K.; SMALLEY, K. S. M.; LI, L.; HERLYN, M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Res.**, v.18, p.150-159, 2005.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v.144, p.646-674, 2011.

HAY, E. D. The Mesenchymal Cell, Its Role in the Embryo, and the Remarkable Signaling Mechanisms That Create It. **Devel Dynam.**, v.233, n.3, p.706-720, 2005.

HELD, M. A.; CURLEY, D. P.; DANKORT, D.; McMAHON, M.; MUTHUSAMY, V.; BOSENBERG, M. W. Characterization of Melanoma Cells Capable of Propagating Tumors from a Single Cell. **Cancer Res.**, v.70, p.388-397, 2010.

HIRATSUKA, S.; NAKAMURA, K.; IWAI S.; MURAKAMI, M.; ITOH, T.; KIJIMA, H.; SHIPLEY, J. M.; SENIOR, R. M.; SHIBUYA, M. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. **Cancer Cell.**, v.2, p.289-300, 2002.

HOUGHTON, A. N.; GOLD, J. S. BLACHER, N. E. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. **Curr Opin Immunol.**, v.13, p.134-140, 2001.

HSU, M.; WHEELLOCK, M. J.; JOHNSON, K. R.; HERLYN, M. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. **J Invest Dermatol Symp.**, v.1, p.188-194, 1996.

HUERGO, M. A. C.; PASQUALE, M. A.; BOLZÁN, A. E.; ARVIA, A. J. Morphology and dynamic scaling analysis of cell colonies with linear growth fronts. **Phys Rev E.**, v.82, p.31-903, 2010. Doi: 10.1103/PhysRevE.82.031903.

HURBAIN, I.; GEERTS, W. J. C.; BOURDIER, T.; MARCO, S.; VERKLEIJ, A. J.; MARKS, M. S.; RAPOSO, G. Electron tomography of early melanosomes: Implications for melanogenesis and the generation of fibrillar amyloid sheets. **Proc Natl Acad Sci.**, v.105, n.50, p.19726-19731, 2008.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>>. Acesso em: 27 maio 2011.

INTERNATIONAL AGENCY RESEARCH ON CANCER. – IARC. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/>>. Acesso em: 21 maio 2011.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia – O sistema imune na saúde e na doença**. 5. ed. 2002.

JAEGER, J.; KOCZAN, D.; THIESEN, H.; IBRAHIM, S. M.; GROSS, G.; SPANG, R.; KUNZ, M. Gene Expression Signatures for Tumor Progression, Tumor Subtype, and Tumor Thickness in Laser-Microdissected Melanoma Tissues. **Clin Cancer Res.**, v.13, n.3, p.806-815, 2007.

JOUNEAU, A.; YU, Y.; PASDAR, M.; LARUE, L. Plasticity of Cadherin-Catenin Expression in the Melanocyte Lineage. **Pigment Cell Res.**, v.13, p.260-272, 2000.

JOYCE, J.; POLLAR, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nat Rev. Cancer.**, v.9, p.247-252, 2009. Doi:10.1038/nrc2618.

KANSAL, A. R.; TORQUATO, S.; HARSHIVA, G. R.; CHIOCCAEB, E. A.; DEISBOEC, T. S. Simulated Brain Tumor Growth Dynamics Using a Three-Dimensional Cellular Automaton. **J. theor. Biol.**, v.203, p.367-382, 2000.

KELLY, P. N.; DAKIC, A.; ADAMS, J. M.; NUTT, S. L.; STRASSER, A. Tumor Growth Need Not Be Driven by Rare Cancer Stem Cells. **Science.**, v.337, p.343, 2007.

KHAIN, E.; SANDER, L. M. Dynamics and Pattern Formation in Invasive Tumor Growth. **Physical Rev Lett.**, v.96, p.188103, 2006. Doi: 10.1103/PhysRevLett.96.188103.

KIM, S.; TAKAHASHI, H.; LIN, W.; DESCARGUES, P.; GRIVENNIKOV, S.; KIM, Y.; LUO, J.; KARIN, M. Carcinoma Produced Factors Activate Myeloid Cells via TLR2 to Stimulate Metastasis. **Nature**, v.457, n.7225, p.102-106, 2009.

KOHANDEL, M.; MILOSEVIC, M.; SIVALOGANATHAN, S. Dynamics of tumor growth and combination of anti-angiogenic and cytotoxic therapies. **Phys. Med. Biol.**, v.52, p.3665-3677, 2007.

KOZAK, C. A. Retroviruses as chromosomal genes in the mouse. **Adv Cancer Res.**, v.44, p.295-336, 1985.

KRENGEL, S.; GROTELÜSCHEN, F.; BARTSCH, S.; TRONNIER, D. M. Cadherin expression pattern in melanocytic tumors more likely depends on the melanocyte environment than on tumor cell progression. **J Cutan Pathol.**, v.31, p.1-7, 2004.

LANDINI, G.; RIPPIN, J. W. Quantification of nuclear pleomorphism using an asymptotic fractal model. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, v.18, n2, p.167-176, 1996a.

LANDINI, G.; RIPPIN, J. W. How important is tumour shape? Quantification of epithelial-connective tissue interface in oral lesions using local connected fractal dimension analysis. **J. Pathol.**, v.179, p.210-217, 1996b.

LARUE, L.; BEERMANN, F. Cutaneous melanoma in genetically modified animals. **Pigment Cell Res.**, v.20, p.485-497, 2007.

LÄUBLI, H.; BORSIG, L. Selectins as Mediators of Lung Metastasis. **Cancer Microenviron.**, v.3, p.97-105, 2010. Doi 10.1007/s12307-010-0043-6.

LAZAR-MOLNAR, E.; HEGYESI, H.; TOTH, S.; FALUS A. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. **Cytokine**, v.12, n.6, p.547-554, 2000.

LEE, S. What tumor vessels can tell us. **Pigment Cell Melanoma Res.**, v.23, p.309-311, 2010. Doi:10.1111/j.1755-148X.2010.00706.x.

LEVITSKY, H. I.; LAZENBY, A.; HAYASHI, R. J.; PARDOL, D. M. In: Vivo Priming of Two Distinct Antitumor Effector Populations: The Role of MHC Class I Expression. **J Exp Med.**, v.179, p.1215-1224, 1994.

LI, M.; MULLER, J.; RAO, V.; HEARING, V.; LUEDERS, K.; GORELIK, E. Loss of intracisternal A-type retroviral particles in BL6 melanoma cells transfected with MHC class I genes. **J Gen Virol.**, v.77, p.2757-2765, 1996.

LI, G.; SCHAIDER, H.; SATYAMOORTHY, K.; HANAKAWA, Y.; HASHIMOTO, K.; HERLYN, M. Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. **Oncogene.**, v.20, p.8125-8135, 2001a.

LI, G.; SATYAMOORTHY, K.; HERLYN, M. N-cadherin-mediated Intercellular Interactions Promote Survival and Migration of Melanoma Cells. **Cancer Res.**, v.61, p.3819-3825, 2001b.

LI, G.; SATYAMOORTHY, K.; HERLYN, M. Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development. **Crit Rev Oral Med.**, v.13, n.1, p.62-70, 2002.

LOCASALE, J. W.; CANTLEY, L. C. Altered metabolism in cancer. **BMC boil.**, v.8, n.88, 2010. Doi: 10.1186/1741-7007-8-88.

MARKS, M.; SEABRA, M. C. The melanosome: membrane dynamics in black and white. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v.2, p.1-11, 2001.

MARÇAL, L. N. **Análise da expressão de caderinas clássicas em linhagens celulares derivadas de melanoma murino b16f10 primário e metastático, induzidos em camundongo balb/c.** 43f. (Monografia de conclusão de curso) - Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, 2010.

MARET, D.; GRUZGLIN, E.; SADR, M. S.; SIU, V.; SHAN, W.; KOCH, A. W.; SEIDAH, N. G.; DEL MAESTRO, R. F.; COLMAN, D. R. Surface Expression of Precursor N-cadherin promotes Tumor Cell Invasion. **Neoplasia**, v.12, n.12, p.1066-1080, 2010.

McCARTY, M. F.; WHITAKER, J. Manipulating Tumor Acidification as a Cancer Treatment Strategy. **Altern Med Rev.**, v.15, n.3, p.264-272, 2010.

MENDES, R. L.; SANTOS, A. A.; MARTINS, M. L.; VILELA, M. J. Cluster size distribution of cell aggregates in culture. **Phys A.**, v.298, p.471-487, 2001.

MENDES, P.F.P.; XANDER, P.; BRITO, R. R. N.; MORTARA, R. A.; JASIULIONIS, M. G.; LOPES, J. D. A cell surface 230 kDa protein from murine melanoma involved with tumor malignancy. **Cancer Lett.**, v.262, p.276-285, 2008.

MENEGUELO, R. **Efeitos antiproliferativos e apoptóticos da fosfoetanolamina sintética no melanoma B16F10.** Dissertação de Mestrado - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, USP, 2007.

MOASSER, M. M. Capítulo 5 Neoplasia pp75-97 em **Fisiopatologia da Doença – Uma Introdução à Medicina Clínica.** Editores: Stephen J, McPhee e William F. Ganong. McGraw Hill, 5. ed, 2007.

MONIER-GAVELLE, F.; DUBAND, J. L. Cross Talk between Adhesion Molecules: Control of N-cadherin Activity by Intracellular Signals Elicited by and Integrins in Migrating Neural Crest Cells. **J Cell Biol.**, v.137, n.7, p.1663-1681, 1997.

MUSTER, T.; WALTENBERGER, A.; GRAUSSER, A.; HIRSCH, S.; CUCIG, P.; ROMIRER, I.; FÖDINGER, D.; SEPPELE, H.; SCHANAB, O.; MAGIN-LACHMANN, C.; LÖWER, R.; JANSEN, B.; PEHAMBERGER, H.; WOLFF, K. An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells. **Cancer Res.**, v.63, p.8735-8741, 2003.

NAKAMURA, K.; YOSHIKAWA, N.; YAMAGUCHI, Y.; KAGOTA, S.; SHINOZUKA, K.; KUNITOMO, M. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. **Life Sci.**, v.70, p.791-798, 2002.

PAK, B. J.; LEE, J.; THAI, B. L.; FUCHS, S. Y.; SHAKED, Y.; RONAI, Z.; KERBEL, R.; BEN-DAVID, Y. Radiation resistance of human melanoma analysed by retroviral insertional mutagenesis reveals a possible role for dopachrome tautomerase. **Oncogene**, v.23, p.30-38, 2004.

PATTERSON JR., M. K. Measurement of growth and viability of cells in culture. In: JAKOBY, W. B.; PASTAN, I. H. (Eds.). **Cell culture. Methods in Enzymology**, v.58, p.141-152, Academic Press, New York *apud* MANNI, I.; ARTUSO, S.; CARECCIA, S.; RIZZO, M.G.; BASERGA, R.; PIAGGIO, G.; SACCHI, A. The microRNA miR-92 increases proliferation of myeloid cells and by targeting p63 modulates the abundance of its isoforms. **FASEB J.**, v.23, p.1-19, 2009.

PETER, I.; MEZZACASA, A.; LEDONNE, P.; DUMMER, R.; HEMMI, S. Comparative analysis of immunocritical melanoma markers in the mouse melanoma cell lines B16, K1735 and S91-M3. **Melanoma Res.**, v.11, p.21-30, 2001.

PIKÓ, L.; HAMMONS, M. D.; TAYLOR, K. D. Amounts, synthesis, and some properties of intracisternal a particle-related RNA in early mouse embryos. **Proc Natl Acad Sci.**, v.81, p.488-492, 1984.

POSTE, G.; DOLL, J.; BROWN, A. E.; TZENG, J.; ZELDMAN, I. Comparison of the Metastatic Properties of B16 Melanoma Clones Isolated from Cultured Cell Lines, Subcutaneous Tumors, and Individual Lung Metastases **Cancer Res.**, v.42, p.2770-2778, 1982.

PRETLOW, T. G.; DELMORO, C. M.; DILLEY, G. G.; SPADAFORA, C. G.; PRETLOW, T. P. Transplantation of Human Prostatic Carcinoma into Nude Mice in Matrigel. **Cancer Res.**, v.51, p.3814-3817, 1991.

QIN, Y.; HAN, Y.; CAO, C.; REN, Y.; LI, C.; WANG, Y. Melanoma B16-F1 cells coated with fusion protein of mouse calreticulin and virus G-protein coupled receptor induced the antitumor immune response in Balb/C mice. **Cancer Biol Ther.**, v.11, n.6, p.574-580, 2001.

QIN, C.; WANG, Z.; SHANG, J.; BEKKARI, K.; LIU, R.; PACCHIONE, S.; MCNULTY, K. A.; NG, A.; BARNUM, J. E.; STORER, R. D. Intracisternal A particle genes: distribution in the mouse genome, active subtypes, and potential roles as species-

specific mediators of susceptibility to cancer. **Mol Carcinogenesis**, v.49, p.54-67, 2010.

QUEIROZ, D. S. **Características anatómicas, químicas e digestibilidade *in vitro* de três gramíneas forrageiras**. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, UFV, 1996.

QUINTANA, E.; SHACKLETON, M.; SABEL, M. S.; FULLEN, D. R.; JOHNSON, T. M.; MORRISON, S. J. Efficient tumor formation by single human melanoma cells. **Nature**, v.456, n.7222, p.593-598, 2008. Doi:10.1038/nature07567.

QUINTANA, E.; SHACKLETON, M.; FOSTER, H. R.; FULLEN, D. R.; SABEL, M. S.; JOHNSON, T. M.; MORRISON, S. J. Phenotypic Heterogeneity among Tumorigenic Melanoma Cells from Patients that Is Reversible and Not Hierarchically Organized. **Cancer Cell**, v.18, p.510-523, 2010.

RAISCH, K. P.; KUSHNARYOV, V. M.; GROSSBER, S. E.; CAHDOLLAR, L. W. Constitutive production of a murine retrovirus in the human b-lymphoblastoid cell line, DG-75. **Virology**, v.250, p.135-139, 1998.

RAMBOW, F.; LARUE, L. The quest for the melanoma stem cell: still more questions than answers. **Pigment Cell Melanoma Res.**, v.23, p.307-309, 2010. Doi: 10.1111/j.1755-148X.2010.00713.x.

RAPOSO, G.; TENZA, D.; MURPHY, D. M.; BERSON, J. F.; MARKS, M. S. Distinct Protein Sorting and Localization to Premelanosomes, Melanosomes, and Lysosomes in Pigmented Melanocytic Cells. **J Cell Biol.**, v.152, n.4, p.809-823, 2001.

RAPOSO, G.; MARKS, M. S. Melanosomes - dark organelles enlighten endosomal membrane transport. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v.8, p.786-797, 2007.

RIBET, D.; HARPER, F.; DUPRESSOIR, A.; DEWANNIEUX, M.; PIERRON, G.; HEIDMANN, T. An infectious progenitor for the murine IAP retrotransposon: emergence of an intracellular genetic parasite from an ancient retrovirus. **Genome Res.**, v.18, p.597-609, 2008.

RODRIGUÉZ, T.; MÉNDEZ, R.; CAMPO, A. D.; JIMÉNEZ, P.; APTSIAURI, N.; GARRIDO, F.; RUIZ-CABELLO, F. Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines. **BMC Cancer**, v.7, p.34-44, 2007.

RUBIN, H. Cellular epigenetics: control of size, shape and spatial distribution of transformed foci by interactions between the transformed and nontransformed cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.91, p.1039-1043, 1994a.

RUBIN, H. Experimental control of neoplastic progression in cell populations: Foulds' rules revisited. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.91, p.6619-6623, 1994b.

RUDRABHATLA, S. R.; MAHAFFEY, C. L.; MUMMERT, M. E. Tumor Microenvironment Modulates Hyaluronan Expression: The Lactate Effect. **J Invest Dermatol**, v.126, p.1378-1387, 2006. Doi:10.1038/sj.jid.5700255.

SCHATTON, T.; MURPHY, G. F.; FRANK, N. Y.; YAMAURA, K.; WAAGA-GASSER, A. M.; GASSER, M.; ZHAN, Q.; JORDAN, S.; DUNCAN, L. M.; WEISHAUPT, C.; FUHLBRIGGE, R. C.; KUPPER, T. S.; SAYEGH, M. H.; FRANK, M. H. Identification of cells initiating human melanomas. **Nature**, v.451, p.3453-3549, 2008.

SCHMITT, C. J.; FRANKE, W. W.; GOERDT, S.; FALKOWSKA-HANSEN, B.; RICKELT, S.; PEITSCH, W. K. Homo- and Heterotypic Cell Contacts in Malignant Melanoma Cells and Desmoglein 2 as a Novel Solitary Surface Glycoprotein. **J Invest Dermatol.**, v.127, p.2191-2206, 2007.

SEDIVY, R.; WINDISCHBERGER, C. H.; SVOZIL, K.; MOSER, E.; BREITENECKER, G. Fractal Analysis: An Objective Method for Identifying Atypical Nuclei in Dysplastic Lesions of the Cervix Uteri. **Gynecol Oncol.**, v.75, p.78-83, 1999.

SEFTOR, E. A.; BROWN, K. M.; CHIN, L.; KIRSCHMANN, D. A.; WHEATON, W. W.; PROTOPOPOV, A.; FENG, B.; BALAGURUNATHAN, Y.; TRENT, J. M.; NICKOLOFF, B. J.; SEFTOR, R. E. B.; HENDRIX, M. J. C. Epigenetic Transdifferentiation of Normal Melanocytes by a Metastatic Melanoma Microenvironment. **Cancer Res.**, v.65, n.22, p.10164-10169, 2005.

SELIGER, B.; WOLLSCHIED, U.; MOMBURG, F.; BLANKENSTEIN, T.; HUBER, C. Characterization of the Major Histocompatibility Complex Class I Deficiencies in B16 Melanoma Cells. **Cancer Res.**, v.61, p.1095-1099, 2001.

SERRANO, M.; LIN, A. W.; LOWE, S. W. Oncogenic *ras* Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. **Cell**, v.88, p.593-602, 1997.

SHARON, A. V.; POSTENKA, C. O.; CHAMBERS, A. F. Estrous Cycle Influences Organ-specific Metastasis of B16F10 Melanoma Cells; **Cancer Res.**, v.63, p.4763; 2003.

SILVA, A. S.; GATENBY, R. A. A Theoretical quantitative model for evolution of cancer chemotherapy resistance. **Biol Direct.**, v.5, p.25, 2010.

SOENGAS, M. S.; LOWE, S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v.22, p.3138-3151, 2003.

SOUZA, W. O cultivo de células e seu impacto na medicina. **Jornal do Comércio**, v.22, n.2, 2005.

STACKPOLE, C. W. Generation of Phenotypic Diversity in the B16 Mouse Melanoma Relative to Spontaneous Metastasis. **Cancer Res.**, v.43, p.3057-3065, 1983.

STOCKING, C.; KOZAK, C. A. Murine endogenous retroviruses. **Cell Mol Life Sci**, v.65, p. 3383-3398, 2008.

STOLARSKA, M. A.; KIM, Y.; OTHMER, H. G. Multi-scale models of cell and tissue dynamics. **Phil Trans R Soc A.**, n.367, p.3525-3553, 2009. Doi: 10.1098/rsta.2009.0095.

STRICKER, T. P.; KUMAR, V. Neoplasia em: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. **Robbins & Cotran – Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 8. ed. Elsevier. Saunders, 2010.

SUMMER, A. T.; ROSS, A. R.; GRAHAM, E. Chap. 4 - Preparation of chromosomes for scanning electron microscopy pg 48 In: **Chromosome Analysis Protocols**. Edited by R. Gosden. Humana Press Totowa, New Jersey, 1994.

TALMADGE, J. E.; SINGH, R. K.; FIDLER, I. J; RAZ, A. Murine Models to Evaluate Novel and Conventional Therapeutic Strategies for Cancer. **Am J Pathol.**, v.170, n.3, p.793-804, 2007.

THIERY, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. **Nat Rev Cancer.**, v.2, p.442-454, 2002.

THIERY, J. Epithelial–mesenchymal transitions in development and pathologies. **Curr Opin Cell Biol.**, v.15, p.740-746, 2003.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A; FREITAS-NETO, A. G. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. 2. ed. Manole, São Paulo, 2003.

TOMAYKO, M. M.; REYNOLDS, C. P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.24, p.148-154, 1989.

VAN DYKE, T.; JACKS, T. Cancer modelling in the modern era: progress and challenges. **Cell**, v.108, p.135-144, 2002.

VANTYGHM, S. A.; POSTENKA, C. O.; CHAMBERS, A. F. Estrous Cycle Influences Organ-specific Metastasis of B16F10 Melanoma Cells, **Cancer Res.**, v.63, p.4763-4765, 2003.

VASQUEZ, A.; LIU, J.; ZHOU, Y.; OLTVAI, Z. N. Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: The Warburg effect revisited. **BMC Systems Biol.**, v.4, n.58, 2010. Doi: 10.1186/1752-0509-4-58.

VICSEK, T. **Fractal growth phenomena**. 2. ed. World Scientific, Singapore, 483p, 1992.

VILELA, M. J.; MARTINS, M. L.; BOSCHETTI, S. R. Fractal Patterns for Cells in Culture. **J. Pathol.**, v.177, p.103-107, 1995.

VILELA, M. J.; MARTINS, M. L.; BRAGA, J. L. Câncer: biologia, fractais e inteligência artificial. **Ciência Hoje**, v.24, n.141, p.16-25, 1998.

VILELA, M. J., MARTINS, M. L. 1/f Ruffle oscillations in plasma membranes of amphibian epithelial cells under normal and inverted gravitational orientations. **Phys Rev E.**, v.74, p.41-903, 2006.

VILELA, M. J.; MARTINS, M. L.; CAZARES, L.; LATTANZIO, F.; WARD, M.; SEMMES, O. J. Proteomic and fractal analysis of a phenotypic transition in the growth of human breast cells in culture. **J. Stat. Mech.** P12006, 2007. Doi:10.1088/1742-5468/2007/12/P12006.

VILLANUEVA, J.; HERLYN, M. Melanoma. **Encyclopedia of Life Sci.** Doi: 10.1002/9780470015902.a0001894.pub2.

WEIBEL, E. R. Fractal geometry: a design principle for living organisms. **Am J Physiol.**, v.261, p.361-369, 1991.

WEIBEL, E. R. The significance of fractals for biology and medicine. In: **Fractals in biology and medicine**. Eds. NONNENMACHER, T.F.; LOSA, A. G.; WEIBEL, E. R. (Birkhäuser Verlag), Basel.p.2-7, 1994.

WEINBERG, R. A. How cancer arises. **Sci Am.**, v.275, n.3, p.32-40, 1996.

WEISS, R. A. A cautionary tale of virus and disease. **BMC Biolog.** Doi: 10.1186/1741-7007-8-124, 2010.

WELCH, D. R.; KRIZMAN, D. B.; NICOLSON, G. L. Multiple phenotypic divergence of mammary adenocarcinoma cell clones. I. *In vitro* and *in vivo* properties. **Clin Exp Metastasis**, v.2, p.333-355, 1984a.

WELCH, D. R.; EVANS, D. P.; TOMASOVIC, S. P.; MILAS, L.; NICOLSON, G. L. Multiple phenotypic divergence of mammary adenocarcinoma cell clones. II. Sensitivity to radiation, hyperthermia and FUdR. **Clin Exp Metastasis**, v.2, p.357-371, 1984b.

WELLER, M.; FONTANA, A. The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumor-derived TGF-beta, T-cell apoptosis, and the immune privilege of the brain. **Brain Res News.**, v.21, p.128-151,1995a.

WELLER, M.; MALIPIERO, U.; AGUZZI, A.; REED, J. C.; FONTANA, A. Protooncogene bcl-2 gene transfer abrogates Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of human malignant glioma cells and confers resistance to chemotherapeutic drugs and therapeutic irradiation. **J Clin Invest.**, v.95, p.2633-2643,1995b.

ZHANG, H.; STEPHENS, L. C.; KUMAR, A. Metastasis Tumor Antigen Family Proteins during Breast Cancer Progression and Metastasis in a Reliable Mouse Model for Human Breast Cancer. **Clin Cancer Res.**, v.12, n.5, p.1479-1486, 2006.

ZHANG, H.; FU, T.; MCGETTIGAN, S.; KUMAR, S.; LIU, S.; SPEICHER, D.; SCHUCHTER, L.; XU, X. IL8 and Cathepsin B as Melanoma Serum Biomarkers. **Int J Mol Sci.**, v.12, p.1505-1518, 2011. Doi: 10.3390/ijms12031505.

ZHAO, W; LIU, H.; XU, S.; ENTSCHLADEN, F.; NIGGEMANN, B.; ZANKER, K. S.; HAN, R. Migration and metalloproteinases determine the invasive potential of mouse melanoma cells, but not melanin and telomerase. **Cancer Lett.**, v.162, p.49-55, 2001.

ANEXO I

Curva de Crescimento da linhagem celular B16F10 cultivada em monocamada. O número inicial de células plaqueadas foi de 1000 células.
Fonte: elaborada pela autora.

Curva de Crescimento da sublinhagem celular B16F10B cultivadas em monocamada. O número inicial de células plaqueadas foi de 1000 células.
Fonte: elaborada pela autora.

Curva de Crescimento da sublinhagem celular B16F10BM cultivadas em monocamada. O número inicial de células plaqueadas foi de 1000 células.
Fonte: elaborada pela autora.

Curva de Crescimento da sublinhagem celular B16F10B cultivadas em monocamada. O número inicial de células plaqueadas foi de 1000 células.
Fonte: elaborada pela autora.

ANEXO II

Editorial Manager(tm) for Archives of Virology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: INTRACISTERNAL VIRAL PARTICLES A OBSERVED IN MURINE TUMOR CELL LINE, B16F10 AND
SUBLINE DERIVED B16F10B

Article Type: Brief Report

Corresponding Author: Rosemairy Mendes, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Vale do São Francisco

First Author: Rosemairy Mendes, Ph.D.

Order of Authors: Rosemairy Mendes, Ph.D.;Adilson Zacaro, Ph.D.;Marcelo Vilela, Ph.D.

Abstract: Intracisternal A particles (IAPs) has been found in a wide variety of cell lines. We report ultrastructural analysis of B16F10 murine melanoma and B16F10B subline cells, during which it was observed IAPs inside cisternae of endoplasmic reticulum and near other organelles. The tumor from which it was selected cells of the subline B16F10B did not show the presence of virus particles (VPs). The absence of IAPs in tumor tissues may be related to instability of tumor cells maintained in culture since passages in vitro may facilitate the expression of these VPs.

**INTRACISTERNA VIRAL PARTICLES AS OBSERVED IN MURINE TUMOR CELL LINE,
B16F10 AND SUBLINE DERIVED B16F10B**

R.L. MENDES^{1,2}

A.A. ZACARO¹

M.J. VILELA³

⁽¹⁾ Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Departamento de Biologia Geral (DBG), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

⁽²⁾ Colegiado de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Tel.: + 55 87 2101 6862; fax: + 55 87 2101 6757; corresponding author e-mail address: rosemary.mendes@univasf.edu.br

⁽³⁾ UFV, Departamento de Biologia Animal, Laboratório de Cultura de Células, in memoriam, 23/07/1950 - 16/10/2009, Cancer Research Team Leader.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Abstract

Intracisternal A particles (IAPs) has been found in a wide variety of cell lines. We report ultrastructural analysis of B16F10 murine melanoma and B16F10B subline cells, during which it was observed IAPs inside cisternae of endoplasmic reticulum and near other organelles. The tumor from which it was selected cells of the subline B16F10B did not show the presence of virus particles (VPs). The absence of IAPs in tumor tissues may be related to instability of tumor cells maintained in culture since passages in vitro may facilitate the expression of these VPs.

Keywords: retrovirus, IAP, morphology, melanoma.

Introduction

The majority of strains of laboratory mice have proved to contain endogenous retrovirus (ERV) sequences in their genomes [1-4]. About 10% of mouse genome is comprised of ERV [4-5]. These sequences encode retrovirus (RV) particles morphologically classified as type A, B, C or D [6-10]. The B-type RV group includes as infectious agents only the mouse mammary tumor viruses (MMTVs). The B-type RV assemblage initiates in the cytoplasm before their transport to the plasma membrane, where budding and maturation take place [4,11]. The C-type RV assemble their genomes at the plasma membrane, with the concurrent formation of an immature viral core and acquisition of the envelope. They are relatively abundant in the placentas of primates and in human teratocarcinomas [3-4,12]. The D-type RV, alike the Mason-Pfizer Monkey Virus (MPMV), a simian D-type RV found in Old World monkeys which causes immunodeficiency syndrome [12], have a spherical core and their assemblage occurs in the cytoplasm before budding and maturation on the membrane [4,13].

A-Type RVs are known as intracisternal A particles (IAPs) and they assemble their genomes at the endoplasmic reticulum (ER) cytosolic surface. The budding process occurs towards the luminal space of the ER and there they remain as immature particles and are not observed as extracellular viral particles [12-15]. The IAPs are dark rigid double-walled annular structures, about 60-90 nm in diameter [9,12].

A mouse contains about 1,000 copies of IAP proviral elements per haploid genome [10,16], but the IAPs are rare or seen less frequently in normal tissues, nevertheless it has been regularly observed in mouse placenta, mouse oocytes and in mouse early embryos [15,17-20]. Also, IAPs are abundant in some malignant cells such as plasmacytomas, neuroblastomas, and teratocarcinomas [12,14,19,21-23]. Some strains of mice (i.e. C3H, BALB/c and C57BL/6) can produce virus like particles (VLPs) spontaneously and reports have shown that B16 cells and their subline B16F10 express both A- and C-type VLPs [1,11,14,23-24]. The B16 cell line, which was originated from C57BL/6 mice, has been widely used to study melanoma. Aiming to develop a study model using murine melanoma, B16F10 cells was inoculated subcutaneously into BALB/c mice. A cell subline derived from subcutaneous tumors induced in BALB/c mouse was named B16F10B, as a reference strain of mice in which the cell line was passed in vivo. Here, we report the transmission electron microscopy (TEM) analysis of viral particles observed in the B16F10 and B16F10B cells grown in vitro on glass cover-slips.

Materials and Methods

B16F10 cell line is syngeneic in C57BL/6 mice and it was kindly donated by Dr. M. G. Jasiulionis (Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brazil). The subline B16F10B was obtained by subcutaneous inoculation of B16F10 cells on BALB/c mice to induce primary tumors. BALB/c mice were inoculated with 4.5×10^4 viable B16F10 cells and killed 20 days later. Their primary tumors were removed aseptically and their tumor parenchyma was macerated after mild enzymatic digestion with trypsin (Sigma, St. Louis, MO, USA) solution (0.25%, 5 minutes). The resulting tumor cell suspension and the B16F10 cell line were cultured in vitro in DMEM medium, pH 7.2, (Sigma, St. Louis, MO, USA), containing 10% fetal calf serum (FCS; Cultilab, Campinas, SP, Brazil) at 37°C with 5% of CO₂. After confluence of tumor cell culture, the cells were trypsinized and cloned by limiting dilution. For TEM analysis, the cells were cultured on glass cover-slips in 24-well plates. After 120 hours of culture, the cover-slips were immersed in fixative solution (glutaraldehyde 2.5% in cacodylate buffer 0.1M pH 7.2). The cover-slips were then submitted to osmium tetroxide post-fixation (1% in the same buffer, 15 minutes), en bloc uranyl acetate (1%) contrastation, ethanol dehydration and Spurr resin embedding. Final embedding was performed using inverted eppendorfs containing Spurr resin. Thin sections of

selected areas were contrasted with lead citrate. TEM analysis was performed using a ZEISS 109 TEM coupled with digital image capture device MegaView III.

Results

The TEM analysis of B16F10 cells grown in vitro have showed irregular surface, euchromatic nucleus with the presence of one or two nucleoli. The cytoplasm showed developed rough endoplasmic reticulum (RER), Golgi and abundant free ribosomes. The melanosomes (Mel) of different stages of maturation were observed grouped near the cell membrane. The cells touched each other but there was no evidence of zones of adhesion, gap junctions or desmosomes (Fig.1).

The B16F10B cultured cells possess polymorphic nuclei with one or two nucleoli. The cytoplasm has numerous mitochondria, cytoskeletal filaments, developed Golgi and a great number of Mels in all stages of maturation (I, II, III and IV), almost always nearby the cell membrane, some of them isolated and others forming clusters (Fig.2). The surface of B16F10 and B16F10B cells at some extent show filiform projections.

Both cultures of B16F10 and B16F10B grown in vitro revealed IAPs formed by two concentric electron-dense rings and the most external diameter has about 77nm. In B16F10, they were observed inside expanded cisternae of tubular ER, in the perinuclear cytoplasm, near mitochondria and RER. Budding IAPs were neither detected in the cell surface in both cell lines nor free in the extracellular space (Fig.1). The analysis of B16F10B cells evidenced IAPs distributed throughout the cytoplasm near Mels, nucleus and tubular ER (Fig.2). Also, both cell lines grown in vitro did not show any morphological evidence of exocytosis of vesicles containing virus particles (VPs).

No VPs were observed TEM analysis of normal lung parenchyma and tumor tissue (Fig.3). The lung parenchyma of control mice is formed by type I and II pneumocytes. Typical basal lamina fusion was observed in the alveolar wall between pneumocytes as well as between these cells and the endothelium ones. The type I pneumocytes have smooth apical surface and a large flat region having cytoplasm with few organelles and many micropinocytotic vesicles. The type II pneumocytes usually have apical short microvilli. The cytoplasm of these cells has RER and well developed Golgi, respectively, involved in the production and secretion of pulmonary surfactant (Fig.3). The parenchyma tumor cells present a central and polymorphic nucleus highly euchromatic with one or two nucleoli, well developed RER and Golgi, and abundant free ribosomes. Some swollen mitochondria were observed in cells of the inner central region of the tumor, probably indicating cell degeneration or death. Numerous Mels were also observed scattered in the cytoplasm of tumor lung cells. They sometimes appeared in clusters and most of them at stages III and IV of maturation [25-26]. Some intercellular contacts between tumor cells were observed although they could not provide any morphological evidence to be part of junctional complexes.

Discussion

The IAPs are widely distributed in several strains of mice, normal and tumor tissues as well as in normal and cancerous cell lines [4,10,18,20,23]. The TEM analysis of B16F10 and B16F10B cells revealed VPs that morphologically are comparable to the IAPs. The observed IAPs inside expanded cisternae throughout to the cytoplasm and near to the cellular organelles such as mitochondria, ER and Mels corroborates the reports of B16F10 and BL6 cell lines, in which it was described the expression of IAPs and C-type VPs [14,24]. Our morphological analysis have indicated that the C-type VPs and budding were not detected on cell surface of B16F10 and B16F10B cells, being in agreement with the reports suggesting no direct precursor-product relationship between IAPs and extracellular virus of the C-type [19,21,23].

The analysis of subcutaneous tumor induced did not show any VPs or VLPs either in the parenchymal cells or in stromal tumor. In many mouse tumors, IAP expression can again be activated and appears to be a stable property of the transformed cells [19]. Expression of IAP elements in normal cells appears to be under genetic control, since variations in total IAP's RNA levels and different size transcripts were found in different cell populations such as in thymus [27] and pancreatic beta cells [30]. Is it also known that tumor cell lines are unstable in vitro. We observed less IAPs in the B16F10B cell subline when compared with the original one. We believe that IAPs expression might be more efficient in a system that was not submitted to in vivo passages. Mice are protected by the innate and acquired immune systems, but have also developed antiviral factors, which may act blocking the various stages of the RV replication cycle. The antiviral factors, such as the block interaction system between the receptor

1 binding to host cell and the ligand on the surface of the viral envelope, prevent the budding of new VPs in
2 the cell membrane [4,29]. Successive passages in vitro may facilitate the expression of VLPs, because the
3 cell lines are used in experimental animals and besides they are exposed to excessive manipulation, which
4 also can alter gene expression and provide horizontal infection [30-32].

5 The phenotypic heterogeneity expresses a variety of biological parameters such as capacity of
6 tumor cells subpopulations to undergo metastasis, the different drug sensitivity exhibited by cells within
7 the same tumor and different expression of adhesion molecules, which may explain the differences in the
8 Mels distribution observed in B16F10 and B16F10B cells [33-35]. Therefore, stress can affect positively
9 melanogenesis when there is DNA damage [36]. Thus, the stress on B16F10B cells (survival in host
10 after inoculation in vivo, activation of escape mechanisms for tumor establishment, breakdown of these
11 cells of primary tumor to grow in culture, and suitability to new growth conditions in vitro) may have
12 contributed to produce more Mels.

13 The property called phenotypic drift can explain this B16F10B phenotype, that is, certain
14 properties (cell morphology, growth rate, karyotype and ploidy) consistently change during in vitro
15 growth [37-38].

16 **Acknowledgements**

17 We thank to Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural (Departamento de
18 Biologia Geral, UFV, Viçosa-Minas Gerais) and Núcleo de Microscopia e Microanálise (UFV) for the
19 TEM laboratory facilities.
20
21

22 The authors have no financial conflict of interest.
23
24

25 **References**

- 26 1. Jenkins NN, Copeland NG, Taylor BA, Lee B K (1982) Organization, distribution, and stability of
27 endogenous ecotropic murine leukemia virus DNA sequences in chromosomes of *Mus musculus*. *J Virol*
28 43:26–36.
- 29 2. Frankel WN, Stoye JP, Taylor BA, Coffin JM (1989) Genetic analysis of endogenous xenotropic
30 murine leukemia viruses: association with two common mouse mutations and the viral restriction locus
31 Fv-1. *J Virol* 63(4):1763-1774.
- 32 3. Löwer R, Löwer J, Kurth R (1996) The viruses in all of us: characteristics and biological significance
33 of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5177-5184.
- 34 4. Stocking C, Kozak C A (2008) Murine endogenous retroviruses. *Cell Mol Life Sci* 65: 3383 – 3398.
- 35 5. MOUSE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (2002) Initial sequencing and comparative
36 analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520–562.
- 37 6. Bernhard W (1958) Electron microscopy of tumor cells and tumor viruses. *Cancer Res* 18:491-509.
- 38 7. Bernhard W (1960) The detection and study of tumor viruses with the electron microscopy. *Cancer Res*
39 20:712-727.
- 40 8. Kozak CA (1985) Retroviruses as chromosomal genes in the mouse. *Adv Cancer Res* 44:295–336.
- 41 9. Coffin JM (1996) Retroviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM
42 (ed). *Fundamental Virology*. 3th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp763-843.
- 43 10. Ribet D, Harper F, Dupressoir A, Dewannieux M, Pierron G, Heidmann T (2008b) An infectious
44 progenitor for the murine IAP retrotransposon: emergence of an intracellular genetic parasite from an
45 ancient retrovirus. *Genome Res* 18:597–609.
- 46 11. Li M, Huang X, Zhu Z, Gorelik E (1999) Sequence and insertion sites of murine melanoma-
47 associated retrovirus. *J Virol* 73 (11): 9178-9186.
- 48 12. Urnovitz HB, Murphy WH (1996) Human endogenous retroviruses: nature, occurrence, and clinical
49 implications in human disease. *Clin Microbiol Rev* 9(1): 72–99.
- 50 13. Welker R, Janetzko A, Kräusslich H-G (1997). Plasma membrane targeting of chimeric intracisternal
51 A-type particle polyproteins leads to particle release and specific activation of the viral proteinase. *J Virol*
52 71(7): 5209–5217.
- 53 14. Li M, Muller J, Rao V, Hearing V, Lueders K, Gorelik E (1996) Loss of intracisternal A-type
54 retroviral particles in BL6 melanoma cells transfected with MHC class I genes. *J Gen Virol*, 77: 2757-
55 2765.
- 56 15. Ribet D, Louvet-Valle ES, Harper F, DE Parseval N, Dewannieux M, Heidmann O, Pierron G, Maro
57 B, Heidmann T (2008a) Murine endogenous retrovirus MuERV-L is the progenitor of the “orphan”
58 epsilon viruslike particles of the early mouse embryo. *J Virol* 82(3): 1622–1625.
59
60
61
62
63
64
65

16. Kuff E, Leuders K (1988) The intracisternal A-particle gene family: structure and functional aspects. *Adv Cancer Res* 51:183–276.
17. Gross L, Schidlosky G, Feldman D, Dreyfuss Y, Moore L (1975) C-type virus particles in placenta of normal healthy Sprague-Dawley rats. *Proc Nat Acad Sci USA* 72(8):3240-3244.
18. Bibby MC, Smith GM (1975) Increase BALB/c in type A virus particles induced in mouse epidermis during chemical carcinogenesis. *Br J Cancer* 32: 660-666
19. Kuff EL, Lueders KK, Orenstein JM, Wilson SH (1976) Differential response of type C and intracisternal type A particle markers in cells treated with iododeoxyuridine and dexamethasone. *J Virol*, 19 (2): 709-716.
20. Pikó L, Hammons MD, Taylor KD (1984) Amounts, synthesis, and some properties of intracisternal A particle-related RNA in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 488-492.
21. Hall W T, Hartley J W, Sanford KK (1968) Characteristic of and relationship between C particles and intracisternal A particles in cloned cell strains. *J Virol* 2(3):238-247.
22. Lueders KK, Fewell J W, Morozov VE, Kuff EL (1993) Selective expression of intracisternal A-particle genes in established mouse plasmacytomas. *Mol Cell Biol*, 13(12): 7439-7446.
23. Qin C, Wang Z, Shang J, Bekkari K, Liu R, Pacchione S, McNulty KA, Ng A, Barnum JE, Storer RD (2010) Intracisternal A particle genes: distribution in the mouse genome, active subtypes, and potential roles as species-specific mediators of susceptibility to cancer. *Mol Carcinog*, 49:54–67, 2010.
24. Muster T, Waltenberger A, Grausser A, Hirsch S, Cucig P, Romirer I, Födinger D, Seppel H, Schanab O, Magin-Lachmann C, Löwer R, Jansen B, Pehamberger H, Wolff K (2003) An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells. *Cancer Res* 63: 8735-8741
25. Marks MS, Seabra MC (2011) The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Mol Cell Biol*, 2:1-11.
26. Raposo G, Marks MS (2007) Melanosomes-dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Mol Cell Biol* 8:786-797.
27. Leiter EH, Kuff EL (1984) Immunocytochemical demonstration of increased antigen (p73) in genetically diabetic mice. *Am J Pathol* 114:46-55.
28. Kuff EL, Fewell J (1985) Intracisternal A-particle gene expression in normal mouse thymus tissue: gene products and strain-related variability. *Mol Cell Biol* 5:474-483.
29. Miller AD (1996) Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11407-11413.
30. Raisch KP, Kushnaryov V M, Grossber SE, Cahdollar LW (1998). Constitutive production of a murine retrovirus in the human b-lymphoblastoid cell line, DG-75. *Virology*. 250: 135-139.
31. Goff SP (2004) Retrovirus restriction factors. *Mol Cell* 16:849-859, 2004.
32. Weiss RA (2010) A cautionary tale of virus and disease. *BMC Biolog* doi:10.1186/1741-7007-8-124.
33. Poste G, Doll J, Brown AE, Tzeng J, Zeldman I (1982) Comparison of the metastatic properties of B16 Melanoma clones isolated from cultured cell lines, subcutaneous tumors, and individual lung metastases. *Cancer Res* 42, 2770-2778.
34. Stockpole CW (1983) Generation of phenotypic diversity in the B16 mouse melanoma relative to spontaneous metastasis. *Cancer Res*. 43, 3057-3065.
35. Freitas ZF, Rodrigues EG, Oliveira V, Carmona AK, Travassos LR (2004) Melanoma heterogeneity: differential, invasive, metastatic properties and profiles of cathepsin B, D and L activities in subclones of the B16F10-NEX2 cell line. *Melanoma Res*. 14(5):333-344.
36. Eller MS, Ostrom K, Gilchrist BA (1996) DNA damage enhances melanogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1087–1092.
37. Welch DR, Krizman DB, Nicolson GL (1984) Multiple phenotypic divergence of mammary adenocarcinoma cell clones. I. In vitro and in vivo properties. *Clin Exp Metastasis* 2:333–355
38. Welch DR, Evans DP, Tomasovic SP, Milas L, Nicolson GL (1984) Multiple phenotypic divergence of mammary adenocarcinoma cell clones. II. Sensitivity to radiation, hyperthermia and FUDR. *Clin Exp Metastasis* 2:357–371.

Legends

1
2 **Fig. 1** TEM of B16F10 cells after 120h grown in vitro. **A.** IAPs (arrows) distributed throughout the
3 cytoplasm. **B.** Detail of **A.** showing IAPs in expanded region of tubular endoplasmic reticulum (small
4 arrow); note abundant free ribosomes (large arrow) in cytoplasm. **C.** and **D.** show round IAPs (small
5 arrows) and IAPs formation by endoplasmic reticulum luminal face budding (large arrows). G-Golgi; m-
6 mitochondria; n- nucleus; nu- nucleoli; AL- annulate lamellae. 0.8 μ m (**A.**), 0.5 μ m (**B.** and **C.**) and 0.4 μ m
7 (**D.**)

8
9 **Fig. 2** TEM of B16F10B cells after 120h grown in vitro. **A.** B16F10B cell having developed Golgi (G),
10 numerous mitochondria and euchromatic nucleus. **B.** Melanosomes (large arrows), mitochondria and
11 IAPs (small arrows). **C.** IAPs (arrows) observed near mitochondria (m), endoplasmic reticulum (er) and
12 nucleus (n). **D.** IAPs (small arrow) near endoplasmic reticulum (er) and melanosomes in different stages
13 of maturation (large arrow). nu- nucleoli; v- vesicle. 0.5 μ m (**A.** and **D.**), 1.6 μ m (**B.**) and 0.8 μ m (**C.**)

14
15 **Fig. 3** TEM of control mice lung and subcutaneous tumor grown in BALB/c mice. **A.** Interface between
16 the blood vessels (bv) and the alveolar spaces (as); type I pneumocytes (I) of lung parenchyma with
17 cytoplasmic vesicles; basal lamina fusion between parenchyma cells and endothelium (arrow). **B.** Stroma
18 fibroblasts (F); type II pneumocytes (II) with lamellar bodies containing surfactant (arrow). **C.**
19 Melanocyte having large amount of melanosomes in all stages of maturation (arrow), euchromatic
20 nucleus (n) and evident nucleoli (nu). **D.** The melanocytes have abundant free ribosomes (arrow),
21 developed Golgi (G) and swollen mitochondria (m). 0.8 μ m (**A.**), 2.6 μ m (**B.** and **C.**) and 0.2 μ m (**D.**)
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure

[Click here to download high resolution image](#)

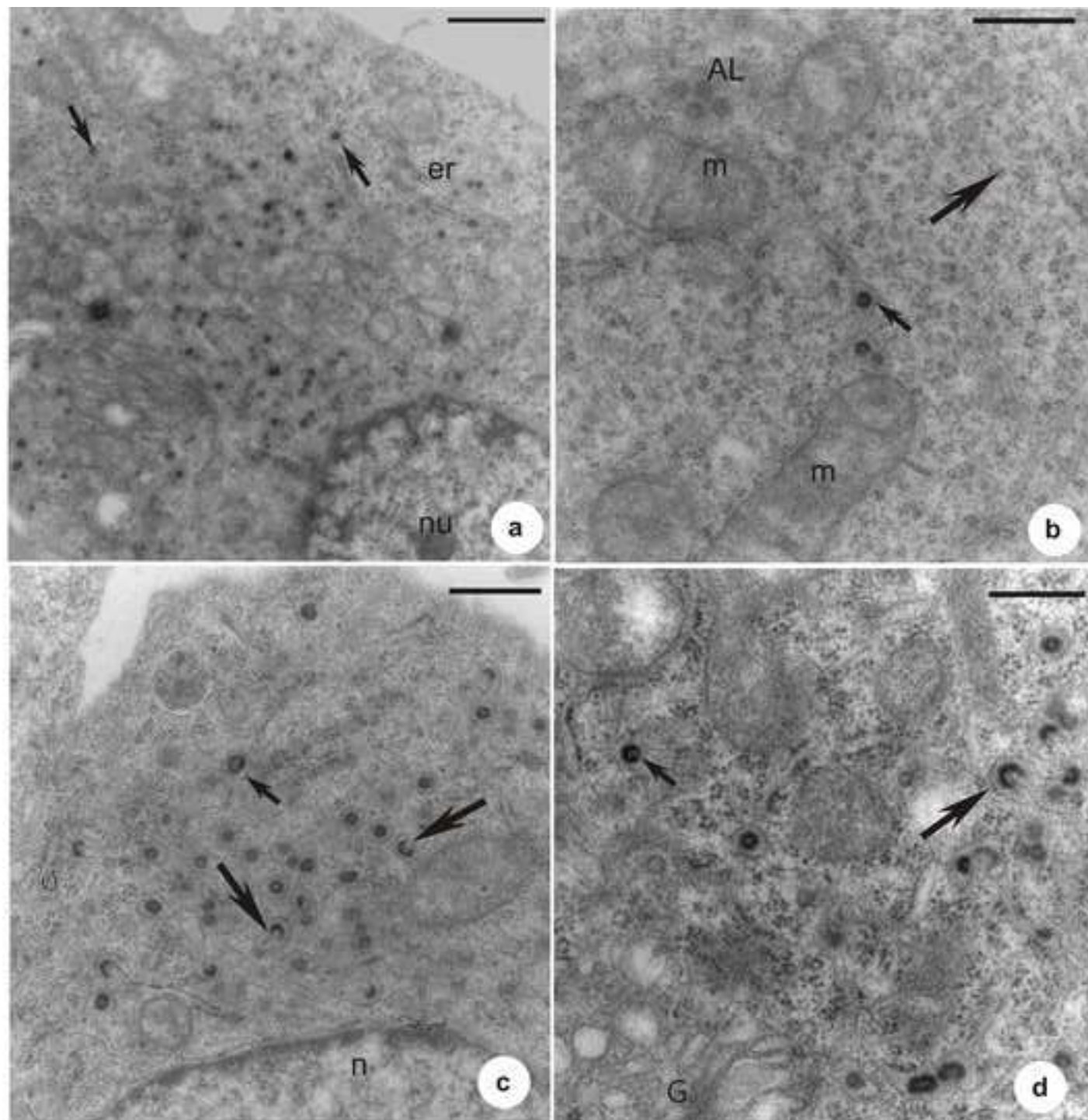
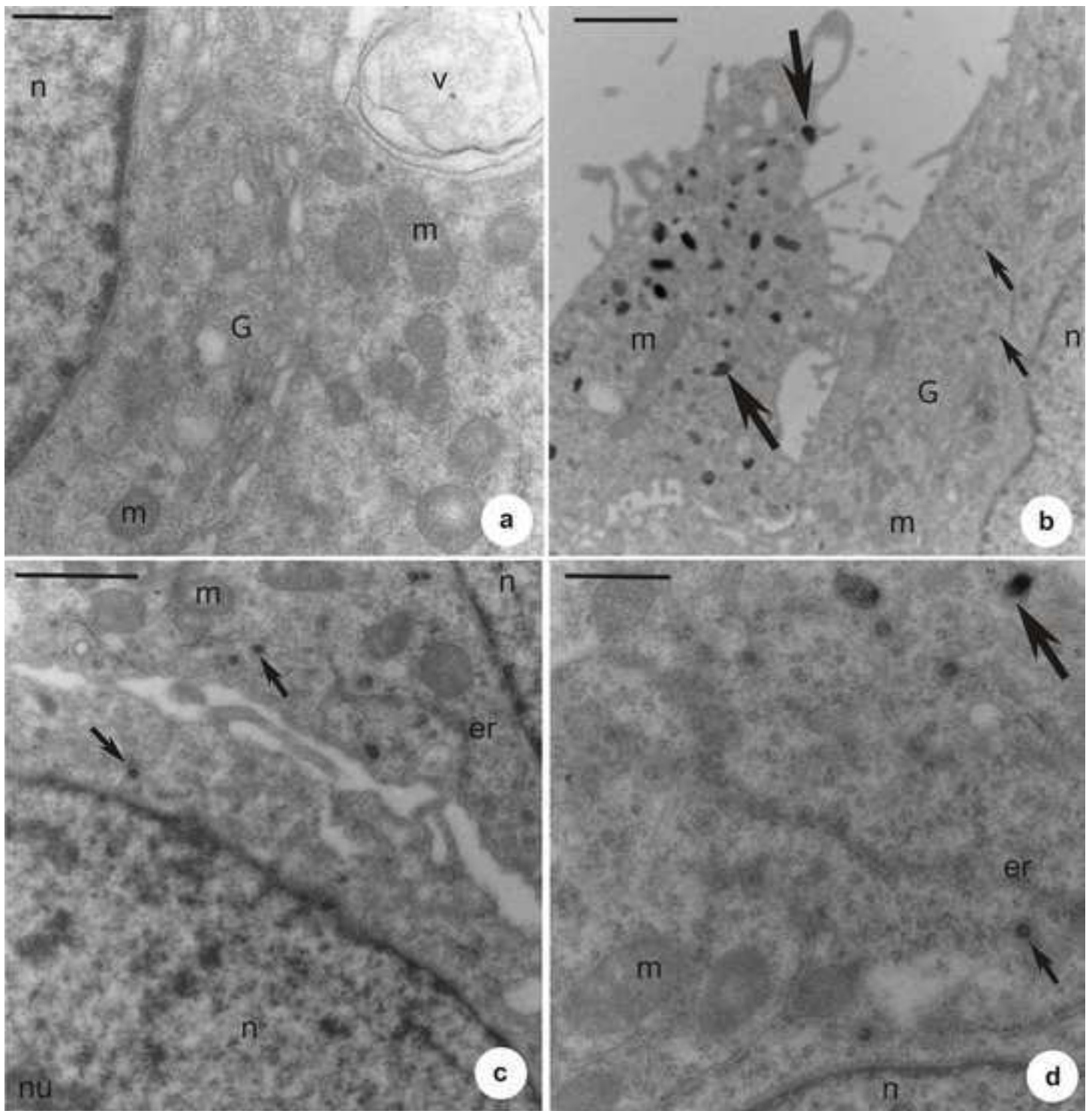
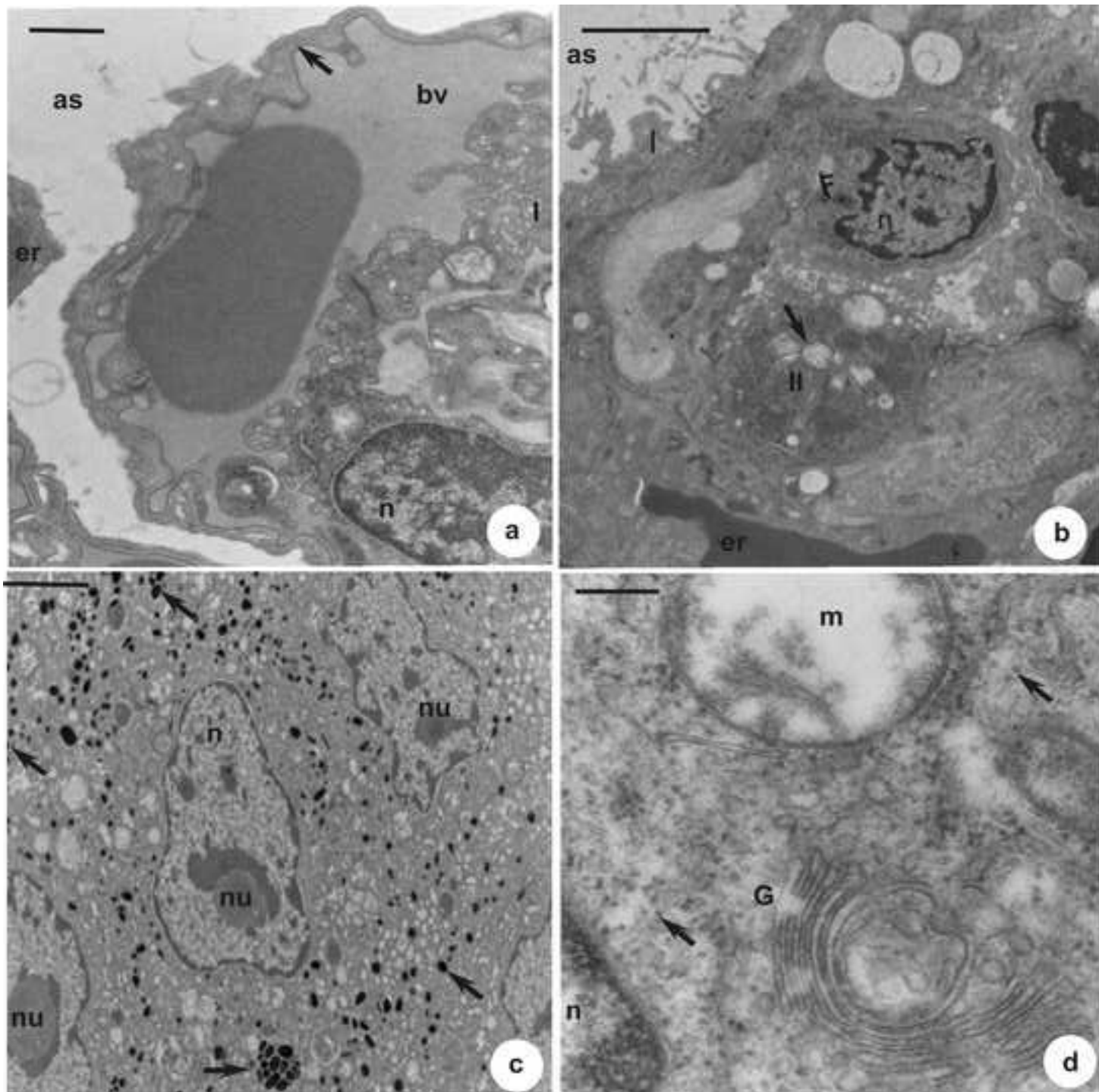


Figure
[Click here to download high resolution image](#)



Figure

[Click here to download high resolution image](#)



ANEXO III

As funções de distribuição de tamanhos de agregados n_s da linhagem B16F10 e das sublinhagens B16F10B, B16F10BM e B16F10M, cultivadas em diferentes tempos de observação foram traçadas em gráfico duplo logaritmo. O eixo das ordenadas representa $(n_{(s)})$ número de células por agregado celular e o eixo das abscissas, o número total de agregados (s) . Os gráficos a seguir apresentados foram elaborados pelo professor Marcelo Lobato Martins.

LINHAGEM B16F10



SUBLINHAGEM B16F10B



O eixo das ordenadas representa $(n_{(s)})$ número de células por agregado celular e o eixo das abscissas, o número total de agregados (s).

SUBLINHAGEM B16F10BM



O eixo das ordenadas representa $(n_{(s)})$ número de células por agregado celular e o eixo das abscissas, o número total de agregados (s) .

SUBLINHAGEM B16F10M



O eixo das ordenadas representa $(n_{(s)})$ número de células por agregado celular e o eixo das abscissas, o número total de agregados (s).