

Modelos experimentais de melanoma murino *in vivo*

Experimental models of *in vivo* murine melanoma

*Cassio Fernando Nunes da Silva*¹; *Gabriella Pasqual Melo*¹; *Sara Santos Bernardes*^{1,2}; *Alessandra Armani Cecchini*¹.

1. Laboratório de Patologia Molecular, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR
2. Universidade Estadual de Maringá.

Endereço para correspondência:

Cassio Fernando Nunes da Silva
Departamento de Ciências Patológicas
Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR
E-mail: cassionunes@live.com

RESUMO

Entre os mais de cem tipos de neoplasias, o melanoma maligno destaca-se devido a sua alta agressividade, seu elevado índice metastático e sua baixa resposta as terapias. Os modelos experimentais animais tem tido suma importância na elucidação desses mecanismos e no desenvolvimento de novas drogas terapêuticas. Os principais modelos animais para o melanoma são os modelos de transplante de xenoenxertos, modelos de indução química, modelos de transplante singênicos e modelos geneticamente modificados, sendo o modelo mais utilizado o de transplante sinérgico de células B16-F10 em camundongos C57BL/6. Este trabalho teve como objetivo demonstrar os principais modelos experimentais do melanoma *in vivo*.

Palavras-chave: Melanoma experimental, Modelos animais, B16-F10, C57/BL-6.

ABSTRACT

Among the more than one hundred types of cancer, malignant melanoma highlight by its high aggressiveness, its high metastatic rate and low response to therapies. The experimental animal models has been very important to elucidate these mechanisms in the development of new therapeutic drugs. The principal animal models for melanoma are the xenograft transplantation models, chemical induction models, syngeneic transplantation models and genetically modified models, where the most widely used model is the synergistic transplantation of B16-F10 cells in C57BL / 6 mice. The aim of our study were demonstrate the main experimental models in vivo melanoma.

Keywords: Experimental melanoma; Animals models; B16-F10; C57/BL-6

INTRODUÇÃO

Apesar de raro (cerca de 4% dos tipos de cânceres cutâneos) o melanoma é o mais grave dos cânceres de pele possuindo altas taxas de mortalidade devido a sua característica altamente invasiva e agressiva ^(1,2). Embora a incidência mundial de melanoma seja baixa, a mesma vem crescendo repentinamente nos últimos anos. Segundo estimativas da OMS, anualmente devem ocorrer cerca de 130 mil novos casos de melanoma cutâneo no mundo ^(1,2). No Brasil, estima-se 5.890 novos casos (2.960 casos novos em homens e 2.930 em mulheres) de melanoma cutâneo no biênio de 2014/2015 ⁽³⁾.

Sua forma metastática é, na maioria das vezes, incurável, com taxas de sobrevida em 5 anos menores que 5% e de sobrevida mediana em torno de 4 meses ⁽⁴⁾. O órgão mais frequentemente acometido pela disseminação metastática do melanoma cutâneo é o pulmão (18-36%) ⁽⁴⁾. O arsenal terapêutico disponível para o tratamento da doença avançada traz resultados insatisfatórios, logo estudos *in vitro* e *in vivo* são de fundamental importância para o melhor entendimento do comportamento biológico dessa neoplasia e para o desenvolvimento diagnóstico e terapêutico ^(1,2,4).

Modelos animais para estudo do melanoma

O estudo de diversas condições patológicas se apoia no manuseio de modelos experimentais. Nesse contexto, modelos animais contribuem para melhor entendimento da fisiopatologia de uma doença e também são úteis como ferramenta para testar novos e potenciais tratamentos. Em relação ao estudo do melanoma vários modelos com diferentes animais foram desenvolvidos, dentre eles peixe *Xiphophorus* sp., porquinho da índia, gambá sul-americano, hamsters, cabras, cachorros e principalmente, camundongos ⁽⁵⁻¹⁰⁾. Os modelos experimentais que não utilizam camundongos não são tão semelhantes histologicamente ao melanoma humano, e a genética destes animais não é tão conhecida como a dos murinos, por isso são menos utilizadas ^(11,12).

O melanoma espontâneo é extremamente raro nos animais de laboratório, tornando-se necessário então sua indução ⁽¹¹⁾. Numerosas metodologias foram descritas, cada qual com características típicas, como os modelos de transplante de xenoenxertos, modelos de indução química, modelos de transplante singênicos e modelos geneticamente modificados ^(13,14).

Os modelos de xenoenxertos permitem que células de melanoma humano sejam enxertadas em camundongos imunodeficientes congênitos e são muito usadas para o estudo de metástases e para testes de drogas ^(14,15). Tem como vantagens fácil manipulação e rápido resultado, principalmente por possibilitar o trabalho direto com células humanas, embora sua manutenção em biotério não seja tão simples ^(14,15). Esse modelo tem sido utilizado para identificar as mutações necessárias para gerar um melanoma invasivo ⁽¹⁶⁾. Uma desvantagem é a interação entre as células de melanoma humano com as células hospedeiras, o que não ocorre de forma satisfatória ^(14,15).

Modelo muito utilizado durante os primeiros estudos de melanoma murino, o modelo de indução química ocorre principalmente com o hidrocarboneto aromático cíclico 7,12-dimetilbenzo-a-antraceno (DMBA), que possui atividade imunossupressora, e com o éster de forbol 13-acetato de 12-o-tetradecanoilforbol (TPA), que atua como um promotor tumoral pela ativação da proteína quinase C (PKC) que, por sua vez, fosforila receptores de fator de crescimento, incluindo os receptores de fator de crescimento epidermal (EGFR) ^(14,17). Muitas vezes esse modelo é associado com outras técnicas, como a irradiação com UVA e UVB, xenotransplante ou

engenharia genética, a fim de diminuir a latência do desenvolvimento do melanoma (14,17,18).

O modelo de transplante sinérgico é o mais antigo entre os modelos utilizados e inclui o melanoma S91 em camundongos DBA/2, o melanoma Harding-Passey em BALB/c e em camundongos DBA/2F1 e o melanoma B16 em camundongos C57BL/6 (13,14). Esse modelo é muito usado para responder questões básicas sobre o melanoma e como esses camundongos apresentam um sistema imunológico funcional, são também usados para estudos com imunoterápicos (13,14). O modelo de melanoma por transplante sinérgico B16 é o mais comumente utilizado, pois apresenta baixa expressão de MHC-1, enquanto expressa altos níveis de antígenos associados ao melanoma, como a gp100 ou a TRP2 (proteína ligada a tirosinase-2), que são alvos imunoterapêuticos (19). A limitação deste método está na falta de entendimento sobre as alterações que dirigem a alteração e progressão tumoral (13,14).

Com o avanço da engenharia genética, os modelos de manipulação gênica têm sido muito utilizados para elucidar as relações entre danos ambientais *versus* predisposição genética, na identificação dos principais genes mutados envolvidos na iniciação e progressão do melanoma e também, são utilizados na avaliação da inibição destes genes por imunoterapias (14,20).

Genes nocauteados e tecnologia transgênica têm facilitado o desenvolvimento de uma variedade de camundongos usados como modelos para estimar o desenvolvimento e progressão tumoral (14,20). Contudo, o modelo de engenharia genética possui muitas limitações. Para que o modelo animal seja mais próximo do melanoma humano, que possuem diversas alterações genéticas necessárias para as fases de iniciação, progressão e metástase, os camundongos passam por um caro e trabalhoso processo de construção do modelo. Além do mais, muitos destes modelos são baseados em animais que expressam oncogenes controlados por promotores tecido-específicos e/ou contendo linha germinativa inativando mutações nos genes supressores tumorais. Estas alterações, em muitos casos, tem um efeito negativo sobre o desenvolvimento e reprodução, tornando difícil obter animais carregando a combinação desejada de mutações (14,20,21).

Linhagem celular B16F10 e modelos animais de melanoma murino

Sydney Ringer, em meados do século XIX, desenvolveu soluções salinas capazes de assegurar as necessidades vitais de órgãos isolados do organismo, e assim lançou as bases do que viria a ser a cultura de células. Porém, foi somente em 1885 que Wilhelm Roux conseguiu manter células embrionárias isoladas de pinto viáveis por vários dias (22). Já no século XX surgiram as primeiras culturas de tecidos com Ross Harrison para estudar o comportamento das células animais em ambiente homeostático e em situações de estresse. A cultura de células *in vitro* permitiu estudar o crescimento, a diferenciação e a morte celular, bem como efetuar manipulações destas em animais, mimetizando situações encontradas naturalmente (22,23).

As linhagens celulares K1735, Cloudman S91-M3 e principalmente, a linhagem B16 são as mais utilizadas em modelos de melanoma murino (24). Os primeiros estudos com células B16 foram realizados pelo doutor Isaias J. Fidler, em que diversas variantes de B16 foram isoladas e as principais diferenças entre as sub-linhagens encontradas foram o potencial metastático e susceptibilidade à destruição pelo sistema imune do hospedeiro (25). Como modelo para melanoma murino, uma linhagem amplamente utilizada nos laboratórios é a linhagem F10 do melanoma B16, que é altamente agressiva e que possui grande capacidade de gerar metástase pulmonar a partir de uma inoculação subcutânea primária ou após uma injeção intravenosa (19,26,27).

As células B16-F10 foram obtidas por Fidler (1973) selecionando as células com maior capacidade de colonizar os pulmões a partir de uma variante parental menos metastática ⁽²⁸⁾. Para o procedimento, uma linhagem não selecionada de melanoma murino, B16, foi colhida de um tumor subcutâneo primário de um camundongo C57BL/6 e reproduzidas em meio de cultura (linhagem B16-F0). Posteriormente, foram inoculadas por injeção intravenosa (i.v.) em camundongo C57BL/6. Quando se observou a presença de nódulos nos pulmões (confirmado pela presença de melanina), as células foram removidas para meio de cultura. Essa linhagem que se desenvolveu no meio de cultura após a primeira inoculação in vivo foi denominada B16-F1. Então, essas células foram colhidas e novamente inoculadas i.v. em um novo grupo de animais no qual, posteriormente, os novos nódulos formados nos pulmões foram removidos e novamente cultivados, gerando a linhagem B16-F2. Esse ciclo foi repetido até se chegar nas linhagens mais agressivas e com maior capacidade de invasão e metástase (B16-F10) (Figura 1) ^(25,28).

O melanoma B16 é um dos poucos melanomas pigmentados disponível para utilização em camundongos. Modelos transgênicos de melanoma também já foram desenvolvidos a partir dessa linhagem ^(29,30).

Li et al. (1998) também identificaram que o melanoma poderia ser estabelecido pela ação de um retrovírus derivado de B16 capaz de transformar melanócitos normais em células de melanoma em camundongos imunocompetentes ⁽³¹⁾.

Modelo murino de melanoma subcutâneo

No modelo sinérgico de melanoma B16 murino com inoculação subcutânea, as células são inoculadas de forma subcutânea no dorso ou na pata traseira do animal, sendo a inoculação dorsal a mais comum neste caso ⁽³²⁾.

As células B16-F10 cultivadas em meio de cultura são inoculadas subcutaneamente em camundongos C57BL/6 a uma dose média de 2×10^5 células/camundongo (1,5 a 2 vezes a dose tumorigênica mínima em camundongos C57BL/6 machos normais). Dentro de 5 a 10 dias forma-se um tumor palpável no local da inoculação, que cresce numa taxa de 1 cm^3 até o 14º / 21º dia ^(9,11).

Quando o tumor deixa de crescer, frequentemente torna-se necrótico no centro e ocorre ulceração e/ou sangramento, sendo aconselhável sacrificar os camundongos antes que ocorra esta fase ^(9,11).

Para os experimentos de crescimento de tumores subcutâneos é extremamente importante que haja uma técnica de injeção consistente, em que cada camundongo apresente uma protuberância claramente visível, definida como “bolha” no local da inoculação. Caso contrário, o animal deve ser descartado e utilizado outro em seu lugar, pois a inoculação inadequada pode causar crescimento tumoral atrasado ou o não desenvolvimento do mesmo ^(9,11).

Modelo de metástase hematogênica (pulmonar)

Este segundo modelo sinérgico de melanoma B16 murino é mais comumente utilizado. Para esse modelo, inocula-se uma carga de 2×10^5 células/camundongos, i.v., via veia caudal ou plexo ocular de camundongos C57BL/6, e posteriormente o pulmão é examinado para verificação de metástase. Apesar de metástase pulmonar ser o termo empregado neste modelo, cada nódulo encontrado no pulmão é tecnicamente um tumor “primário” independente, e não uma verdadeira metástase. A dose típica aplicada no animal irá produzir entre 50 a 250 nódulos pulmonares que são facilmente visíveis devido a presença de melanina das células. Porém, há sempre uma porção de nódulos

que são amelanóticos (brancos), sendo necessário então uma contagem bastante cuidadosa a fim de não subestimar a contagem tumoral total ^(9,12).

As injeções intravenosas feitas pela veia caudal são difíceis de realizar, exigindo uma prática exaustiva para um melhor resultado. Por este motivo, não é recomendado que experimentos sejam realizados antes que o pesquisador possua uma total confiança em sua forma de inoculação ^(9,14).

Modelo de metástase linfocitária

O sistema linfático foi inicialmente proposto sendo o principal canal de disseminação do melanoma em humanos, pois proporciona uma via de transporte para as células tumorais, e também devido a detecção de metástases em linfonodos sentinelas que drenam a região do tumor. Apoiando esta hipótese, a identificação de células cancerígenas em linfonodos sentinelas tornou-se o indicador mais preciso de metástase para órgãos distantes ^(33,34).

Neste modelo, 2×10^5 células/camundongos são inoculadas subcutaneamente na pata traseira do animal, onde desenvolve uma massa tumoral dentro de 5 a 10 dias. Deste tumor primário formado ocorre metástase para os linfonodos sentinelas, próximos da região de inoculação, que nesse caso é o linfonodo poplíteo. Após cerca de 20 dias os animais são sacrificados e o linfonodo do poplíteo é dessecado para análise ^(33,34).

Uma variação deste modelo é a inoculação das células B16-F10 diretamente na cavidade intra-abdominal do animal, causando a metástase nos linfonodos locais ⁽³⁵⁾.

Modelo de metástase hematogênica e linfocitária

Modelo de metástase hematogênica e linfocitária proposto por Bobek (2010) apresenta uma frequência metastática muito alta, podendo ser um bom modelo para se estudar os mecanismos de metástases do melanoma e no desenvolvimento de novas terapias ⁽³²⁾.

Neste modelo, 5×10^6 células/camundongos em 0.1 ml de PBS são inoculadas entre a pele e a cartilagem do lado dorsal da orelha do camundongo C57/BL-6. Após 5-10 dias, será visível uma massa tumoral palpável no local da inoculação e após 3-5 semanas, é possível a presença de metástase nos linfonodos sentinelas do pescoço (via linfocitária), nos pulmões, coração e cérebro e outros órgãos (via hematogênica) ⁽³²⁾.

CONCLUSÃO

Com o aumento da incidência de melanoma nos últimos anos e sua característica altamente agressiva, estudos utilizando modelos experimentais animais são de fundamental importância para o melhor entendimento da fisiopatologia dessa doença.

Devido a sua genética bem conhecida e a suas características histológicas semelhantes ao melanoma humano, o transplante sinérgico da linhagem celular de melanoma murino B16-F10 e sua inoculação por via subcutânea, venosa ou intraperitoneal em camundongos C57BL/6 são os modelos experimentais mais vantajosos para testar grande número de drogas e selecionar compostos específicos para esse tumor cutâneo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. **Fight against cancer: strategies that prevent, cure and care.** 2007.
2. Caini S, Gandini S, Sera F. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma according to anatomical site and clinic-pathological variant. *European Journal of Cancer*, 45: 3054-3063, 2009
3. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2014 : incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer, 2014.
4. Koh HK, Kligler BE, Lew RA. Sunlight and cutaneous malignant melanoma. *Photochemistry and Photobiology*, 51:765-779, 1990.
5. Pawlowski A, Haberman HF, Menon IA. Skin melanoma induced by 7,12-dimethylbenzanthracene in albino guinea pigs and its similarities to skin melanoma of humans. *Cancer Research*, 40:3652-3660, 1980.
6. Della Porta G, Rappaport H, Saffiotti U, Shubik P. Induction of melanotic lesions during skin carcinogenesis in hamsters. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine Online*, 61:305-313, 1995.
7. Simpson RM, Bastian BC, Michael HT, Webster JD, Prasad ML, Conway CM, Prieto VM, Gary JM, Goldschmidt MH, Esplin DG, Smedley RC, Piris A, Meuten DJ, Kiupel M, Lee CR, Ward JM, Dwyer JE, Davis BJ, Anver MR, Molinolo AA, Hoover SB, Rodriguez-Canales J, Hewitt SM. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a pre-clinical model for human melanoma. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 27:37-47, 2013.
8. Kusewitt DF, Ley RD. Animal models of melanoma. *Journal of Cancer Survivorship*, 26:35-70, 1996.
9. Overwijk WW, Restifo N. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. *Current Protocols in Immunology*, 2001.
10. Ley RD. Animal models of ultraviolet radiation (UVR)-induced cutaneous melanoma. *Frontiers in Bioscience*. 7:1531-1534, 2002.
11. Gheorgheosu D, Dehelean C, Cristea M, Muntean D. Development of the B16 murine melanoma model. *Annals of Romanian Society for Cell Biology*. 16:2, 2011.
12. Menon LG, Kuttan R, Kuttan G. Inhibition of Lung metastasis by in mice induced by B16/F10 melanoma cells by polyphenolic compounds. *Cancer Letters*, 95:221-225, 1995.
13. Ha, L, Noonan FP, Fabo EC, Merlino G. Animal Models of Melanoma. *Society for Investigative Dermatologic Symposium Proceedings*, 10, 2005.

14. Mckinney AJ, Holmen SL. Animals models of melanoma: a somatic cell gene delivery mouse model allows rapid evaluaton of gene inplicade in human melanoma. *Chinese Journal of Cancer*, 30:3, 2011.
15. Rofstad EK, Lyng H. Xenograft model systems for human melanoma. *Molecular Medicine Today*, 2:394-403, 1996.
16. Stenger M. Dabrafenib in advanced melanoma with BRAF V600E mutation. *The Journal Of Community And Supportive Oncology*, 12:48-49, 2014.
17. Miyata M, Furukawa M, Takahashi K. Mechanism of 7, 12 dimethylbenz [a]anthracene induced immunotoxicity : Role of metabolic activation at the targe organ. *Japan Journal of Pharmacology*, 86:302-309, 2001.
18. Berkelhammer J, Oxenhandler RW, Hook RR, Hennessy JM. Development of a New Melanoma Model in C57BL/6 Mice. *Cancer Research*, 42:3157-3163, 1982.
19. Fidler IJ, Nicolson GL. Organ selectivity for implantation survival and growth of b16 melanoma variant tumor lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 57:1199-1202, 1976.
20. Aravindaram K, Wang P, Yin Y, Yang N. Tumor-associated antigen/IL-21-transduced dendritic cell vaccines enhance immunity and inhibit immunosuppressive cells in metastatic melanoma. *Gene Therapy*, 21:457-467, 2014.
21. Fearon E, Vogelstein BA. Genetic model for colorectal tumorigenesis. *Journal of Cell Science*, 61:759-767, 1990.
22. Lindee, M. S. The Culture of Cell Culture. *Science*. 316, 2007.
23. Cruz M, Enes M, Pereira M, Dourado M, Ribeiro ABS. Experimental models in oncology: Contribution of cell culture on understanding the biology of cancer. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, 15, 2009.
24. 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 Research*, 11:21-30, 2001.
25. Nicolson GL, Brunson KW, Fidler IJ. Specificity of arrest, survival, and growth of selected metastatic variant cell lines. *Cancer Research*, 38:4105-4011, 1978.
26. Fidler IJ, Bucana C. Mechanism of tumor cell resistance to lysis by singeneic lymphocytes. *Cancer Research*, 37:3942-3856, 1977.
27. Hart IR. The Selection and Characterization of an Invasive Variant of the B16 Melanoma. *American Journal of Pathology*. v. 97, n. 3, dez. 1979.
28. Fidler IJ. Selection of Successive Tumor Lines for Metastasis. *Nature. New Biololy*, 242:148-149, 1973.

29. Chin L, Pomerantz J, Polsky D, Jacobson M, Cohen C, Cordon-Cardo C, Horner JW, Depinho RA. Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. *Genes Development*, 11:2822–2834, 1997.
30. Zhu H, Reuhl K, Zhang X, Botha R, Ryan K, Wei J, Chen S. Development of heritable melanoma in transgenic mice. *Journal of Investigative Dermatology*, 110:247–252, 1998.
31. Li M, Xu F, Muller J, Hearing VJ, Gorelik E. Ecotropic C-type retrovirus of B16 melanoma and malignant transformation of normal melanocytes. *International Journal of Cancer*, 76:430–436, 1998.
32. Bobek V, Kolostova K, Pinterova D, Kacprzak G, Adamiak J, Kolodziej J, Boubelik M, Kubecova M, Hoffman RMA. Clinically Relevant, Syngeneic Model of Spontaneous, Highly Metastatic B16 Mouse Melanoma. *Anticancer Research*, 30:4799–4804, 2010.
33. Ruddell A, Harrell MI, Furuya M, Kirschbaum SB, Iritani, BMB. Lymphocytes Promote Lymphogenous Metastasis of Lymphoma and Melanoma. *Neoplasia*. 13:748–757, 2011.
34. Kwon S, Agollah GD, Wu G, Chan W, Sevick-Muraca EM. Direct visualization of changes of lymphatic function and drainage pathways in lymph node metastasis of B16F10 melanoma using near-infrared fluorescence imaging. *Biomedical optics express*, 4, 2013.
35. Ishibashi S, Sonoda K, Fujii K, Ishikawa K, Shiraishi N, Kitano S. A convenient murine model for the study of intra-abdominal lymph node metastasis. *Oncology Reports*, 12:115–118, 2004.