**EFEITO DA INIBIÇÃO DOS RECEPTORES DE FATOR
DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR NA
ANGIOGÊNESE TUMORAL EM CARCINOMAS
ESPINOCELULARES DE CABEÇA E PESCOÇO**

MARTA MIYAZAWA

*Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Bauru, Universidade
de São Paulo, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor em Odontologia, área de
Patologia Bucal.*

BAURU

2007

**EFEITO DA INIBIÇÃO DOS RECEPTORES DE FATOR DE
CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR NA ANGIOGÊNESE
TUMORAL EM CARCINOMAS ESPINOCELULARES
DE CABEÇA E PESCOÇO**

MARTA MIYAZAWA

*Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Bauru, Universidade
de São Paulo, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor em Odontologia, área de
Patologia Bucal.*

*Orientadores: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira
Prof. Dr. Jacques Eduardo Nör*

BAURU

2007

Miyazawa, Marta

M699e Efeito da inibição dos receptores de fator de crescimento endotelial vascular na angiogênese tumoral em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço/Marta Miyazawa. -- Bauru, 2007. 91p.: il.; 30cm.

Tese. (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiables e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comissão de Ética em pesquisa de animais da Universidade de Michigan (University of Michigan Committee on Use and Care of Animals – UCUCA)

Protocolo nº: 8990

Data: 29 de novembro de 2004.

DADOS CURRICULARES

Marta Miyazawa

25/04/1969 Paraíso do Norte - PR	Nascimento
1987 – 1989	Curso de Graduação em Farmácia – Universidade Estadual de Londrina
1990 – 1994	Curso de Graduação em Odontologia – Universidade Estadual de Londrina
1994 – 1995	Estágio em Cirurgia buco-maxilo-facial – Universidade de Niigata
1996 – 1998	Residência em Cirurgia buco-maxilo-facial – Hospital das Clínicas – USP – São Paulo
1998 – 2003	Atuação como cirurgiã buco-maxilo-facial no Hospital Evangélico de Londrina, Santa Casa de Londrina, Hospital Mater Dei e Hospital Infantil de Londrina; consultório odontológico particular
2002	Estágio em Cirurgia buco-maxilo-facial (Cirurgia Ortognática) – Universidade de Niigata
2003 – 2007	Doutorado em Patologia Bucal na Faculdade de Odontologia de Bauru – USP
2005 – 2006	Estágio de doutorando PDEE – Laboratório de Pesquisa em Angiogênese – Universidade de Michigan
Associação	SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais **Amélia** e **Mário**
e ao meu irmão **Hamilton**
pelo amor e apoio incondicional dedicados a mim
em todos os momentos desta dura jornada.*

*Ao **Maurício**
que com a sua paciência, dedicação e amor
tornaram possível transpor todos os obstáculos
para a conclusão desta tese.*

AGRADECIMENTOS

Aos orientadores

À Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira agradeço pelo esforço em me proporcionar todas as oportunidades para o meu engrandecimento profissional, e pelo exemplo de dedicação como pesquisadora e docente. Grata pela constante confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Jacques E. Nör agradeço por ter me recebido em seu laboratório (Angiogenesis Research Laboratory – School of Dentistry – University of Michigan) e proporcionado todas as condições para o meu treinamento nas mais diversas técnicas laboratoriais de biologia molecular e experimentos com cultura de células e animais que resultaram nesta tese.

Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira e Prof. Dr. Jacques E. Nör
Muito obrigada pela paciência, generosidade e confiança em mim depositada.

Aos professores da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru Prof. Dr. Alberto Consolaro, Prof.^a Dr.^a Denise Tostes Oliveira, Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira e Prof.^a Dr.^a Vanessa Soares Lara pelos ensinamentos que muito contribuíram à minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski por ter me recebido em sua instituição e, com sua dedicação aos pacientes e aos estudos, tornou-se um exemplo para meu aprimoramento profissional e pessoal.

À Profa. Dra. Mirian M. Hidalgo agradeço pela confiança e generosa amizade durante todos estes anos.

À amiga Berenice T. Tatibana, pois sem o seu apoio jamais teria persistido em trilhar pelos caminhos acadêmicos.

À Leda A. Francischone, meu muito obrigado pela sua amizade, carinho e companhia nesta nossa jornada durante o curso de doutorado.

À Érika e Simone grata pelos momentos de alegria e amizade incondicional.

À Mabel M. R. Cordeiro, my “big sister”, muito obrigada pelo treinamento na cultura de células e nas técnicas laboratoriais, mas acima de tudo, pela amizade e apoio que recebi durante minha estada em Ann Arbor.

À Kathleen G. Neiva, minha amiga de luta na arte de fazer ciência, sou-lhe muito grata pelos ensinamentos, pela assistência à distância, pelo carinho e por todos os bons momentos no lab!

À Rosa e ao Roberto Miyake pela hospedagem e apoio constantes nos momentos mais importante, não somente neste doutorado, mas durante toda a minha vida.

À Sra. Neuza Vieira por sempre ter me acolhido em seu lar e por todas as suas orações.

Aos meus colegas de turma Erick, Leda, Rosário, Suzana e Patrícia.

A todos os colegas de pós-graduação Rosa, Andréa, João Adolfo, Maria Renata, Maria Fernanda, Tânia, Bethânia, Camila, Lidiane, Luciana, Renata Consolaro, Renata Falchete, Renato, Thiago, Ana Carolina, Carlos, Érica, Janaína, Karen, Roberta, Gisele, Melaine, Michele, Milton, Aroldo e Sylvie.

Aos funcionários da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru Cristina, Fatiminha, Fernando, Marilza, Oziel, Rodrigo e Valdir pelos preciosos serviços prestados durante a realização deste curso.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Direção da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, na pessoa do Diretor Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro.

À Comissão de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, na pessoa da Presidente Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.

Ao Coordenador do Curso de Pós-graduação em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira.

À Pró-Reitoria de Pós-graduação, Universidade de São Paulo, na pessoa do Pró-Reitor Prof. Dr. Armando Corbani Ferraz.

À CAPES, pelo auxílio pecuniário do Estágio de Doutorando no Exterior (Processo nº 1895/05-2) e do Curso de Doutorado.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan, na pessoa de seu diretor Prof. Dr. Peter J. Polverini.

À Novartis Pharmaceuticals pela concessão do medicamento PTK/ZK para a realização destes estudos.

Ao National Institutes of Health pelo apoio financeiro na execução deste projeto.

ACKNOWLEDGMENTS

I thank all the members from Dr. Nör's Lab – Andreza Aranha, Benjamin Zeitlin, Elisabeta Karl, Eoin Mulane, Flávio Demarco, Ilan Maltz Turkienicz, Joseph Son, Kathleen G. Neiva, Kristy Warner, Luciano Casagrande, Mabel M. R. Cordeiro, Naoki Ashimori, Sandra Tarquinio, Sudha Krishnamurty, Tatiana Botero, Tomoatsu Kaneko, Vichulada Phunthikaphadr, Zhaocheng Zhang and Zhihong Dong – for all the assistance given to me during my stay in the lab.

My special thanks to:

Dr. Peter J. Polverini, PhD, Dean of School of Dentistry – University of Michigan;

Dr. Zhihong Dong, PhD, and Dr. Zhaocheng Zhang, PhD, without your patience to teach me all the techniques in molecular biology, cell culture and animal studies, this research would not have this outcome.

Dr. Taocong Jin, PhD, for all the assistance with Real Time PCR technique;

Dr. Tomoatsu Kaneko, PhD, for teaching me the LCM technique;

Dr. Aaron Spalding, from the Medical School – University of Michigan, for the friendship and assistance with animal experiments;

Chrystopher Strayhorn, from Histology, for the technical assistance ;

Ruth Eberhart, Susan Douglas, Renita Bellmore, Marian Brockie, Doreen Graden, from the office of Department of Cariology, Restorative Science and Endodontics.

Tatiana, thanks for your kindness and friendship.

Zhihong, Zhang and Tao - My friends, thank you so much for your patience, nice moments (mainly during lunch time!) and for our longlasting friendship!

*“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada,
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher”*

Cora Coralina

RESUMO

Efeito da inibição dos receptores de fator de crescimento endotelial vascular na angiogênese tumoral em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) tem sido considerado o principal indutor da angiogênese tumoral por sua ligação a receptores específicos tirosina-quinase presentes nas células endoteliais (VEGFR). Uma importante via reguladora da angiogênese é caracterizada pela ligação do VEGF ao seu receptor VEGFR-2 ativando a via de sinalização de PI3-K, que estimula a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 elevando a expressão de citocinas pró-angiogênicas CXCL-8 e CXCL-1, o que resulta na proliferação de células endoteliais. Recentemente, foi descoberta uma droga com ação antiangiogênica denominada de PTK787/ZK 222584 (PTK/ZK), que se mostrou um potente inibidor do receptor tirosina-quinase de VEGF, sem aparente efeito citotóxico em células que não expressam esses receptores. Visando a melhor compreensão do mecanismo de ação e da via de atuação antiangiogênica VEGF/VEGFR do PTK/ZK nos carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, foram desenvolvidos estudos *in vitro* e *in vivo* avaliando-se a expressão de Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1. No presente estudo foi utilizado um modelo experimental de angiogênese humana em camundongos imunodeprimidos que receberam co-implantes de células tumorais e endoteliais ou apenas células endoteliais, tratados com administração oral de PTK/ZK por 21 dias. A progressão tumoral nos animais foi avaliada por meio de imagem de bioluminescência. Após o sacrifício dos camundongos, os implantes foram incluídos em parafina sendo obtidos cortes de 3µm para análise da densidade vascular e de 7µm para a técnica de microdissecção a laser visando a avaliação de RNA por meio de RT-PCR e PCR em tempo real nas células malignas e endoteliais. Concomitantemente, experimentos *in vitro* de co-cultura de células tumorais e endoteliais foram realizados para a análise de expressão de Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1 avaliados por meio de RT-PCR, Western Blot e teste ELISA. Os resultados demonstraram uma redução importante da expressão de Bcl-2, bem como de CXCL-8, em células endoteliais *in vitro* e *in vivo* quando tratados com PTK/ZK. Além disso, houve uma redução significativa na densidade vascular nos implantes dos animais tratados com o medicamento. Estes resultados reforçam a ação antiangiogênica do PTK/ZK nas células endoteliais sugerindo uma provável via de sinalização na qual a redução da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 causou uma diminuição da expressão da molécula pró-angiogênica CXCL-8, o que resultou numa menor densidade vascular e, conseqüentemente, menor crescimento tumoral. Conclui-se, portanto, que o PTK/ZK mostrou ser um medicamento antiangiogênico eficaz que poderá, no futuro, ser utilizado como terapêutica adjuvante nos pacientes portadores de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço.

Palavras-chave: Angiogênese patológica. Inibidores da angiogênese. Carcinoma espinocelular. Neoplasias bucais.

ABSTRACT

Effect of vascular endothelial growth factor receptors inhibition on tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma

The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) has been considered the most important mediator in inducing tumor angiogenesis. It binds to specific receptors known as Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR). An important pathway for angiogenesis is VEGF binding to VEGFR-2 and through PI3-K stimulates expression of antiapoptotic protein Bcl-2, inducing expression of proangiogenic cytokines CXCL-8 and CXCL-1, resulting in endothelial cell proliferation. A recently developed antiangiogenic drug is PTK787/ZK 222584 (PTK/ZK), a potent tyrosine kinase VEGFR inhibitor, without apparent cytotoxic effect on cells without expression of these receptors. For the better understanding of this mechanism and the angiogenic VEGF/VEGFR pathway of PTK/ZK in head and neck squamous cell carcinoma, it was developed *in vitro* and *in vivo* studies evaluating Bcl-2, CXCL-8 and CXCL-1 expression. A human angiogenesis experimental model was used in immunodeficient mice that received implants of tumor and endothelial cells or endothelial cells only, treated with PTK/ZK orally administered during 21 days. Tumor progression was evaluated by bioluminescence imaging. After mice sacrifice, the implants were paraffin embedded and 3µm sections were obtained for microvessel density analysis and 7µm sections for tumor and endothelial cells RNA retrieving by laser microdissection and analyzed by RT-PCR and *Real time* PCR. *In vitro* studies with co-culture of tumor and endothelial cells were analyzed by RT-PCR, Western Blot and ELISA to evaluate Bcl-2, CXCL-8 and CXCL-1 expression. The *in vitro* and *in vivo* results showed important downregulation of Bcl-2 as well as CXCL-8 expression in endothelial cells when treated with PTK/ZK. In addition, it was observed a significant reduction of microvessel density in implants of animals treated with the drug. These results suggest that the antiangiogenic mechanism of PTK/ZK on endothelial cells seems to occur by downregulation of antiapoptotic Bcl-2 expression leading to downregulation of pro-angiogenic CXCL-8, resulting in less tumor growth. In conclusion, PTK/ZK seems to be an efficient antiangiogenic drug for future adjuvant therapy of patients with head and neck squamous cell carcinoma.

Keywords: Pathologic neovascularization. Angiogenesis inhibitors. Squamous cell carcinoma. Mouth neoplasms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esta figura ilustra a dupla função de Bcl-2 na angiogênese como uma molécula sinalizadora pró-angiogênica e de sobrevida nas células endoteliais. VEGF induz a expressão de Bcl-2 via VEGFR-2, via de sinalização PI3K/Akt e a expressão de Bcl-2 aumenta a sobrevida das células endoteliais. Bcl-2 também sinaliza uma cascata pró-angiogênica que é mediada por atividade IKK β quinase, fosforilação de I κ -B, ativação de NF κ -B e expressão de citocinas CXCL-8 e CXCL-1. Estas citocinas são secretadas e funcionam por uma via autócrina mediada por CXCR2 que resulta em aumento da angiogênese. Este modelo propõe que a inibição da função de Bcl-2 pode ser uma estratégia antiangiogênica efetiva para pacientes portadores de tumores malignos. (Adaptado de KARL et al., 2005)	18
Figura 2	Estrutura molecular de PTK/ZK.	23
Figura 3	Concentração média de CXCL-8 determinado pela reação de ELISA realizada nas co-culturas de células de carcinoma espinocelular e endoteliais (17B-HDMEC e OSCC-3/HDMEC), tratadas (PTK/ZK) ou não (Controle) com 100nM de PTK/ZK.	48
Figura 4	Concentração média de CXCL-1 determinado pela reação de ELISA realizada no sobrenadante de co-culturas de células de carcinoma espinocelular e endoteliais (17B-HDMEC e OSCC-3/HDMEC), tratadas (PTK/ZK) ou não (Controle) com 100nM de PTK/ZK.	48
Figura 5	Expressão de Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1 em nível de mRNA (lado esquerdo) e proteína (lado direito) nas co-culturas de UM-SCC-17B/HDMEC (A) e OSCC-3/HDMEC (B) tratadas ou não (Controle) com 100nM de PTK/ZK. As expressões relativas representadas nesta figura foram normalizadas pelo GAPDH. Para se analisar os resultados <i>in vitro</i> , a célula avaliada está representada fora dos parênteses e a célula correspondente co-cultivada encontra-se representada entre parênteses.	50
Figura 6	Avaliação da presença de VEGFR-1 e VEGFR-2 em nível de RNA por meio de RT-PCR (A) e de proteína por meio de <i>Western Blot</i> (B) demonstrando a presença destes receptores nas células endoteliais (HDMEC), e ausência das mesmas nas células de carcinoma espinocelular (UM-SCC-17B e OSCC-3) utilizadas neste estudo. GAPDH = Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.	51
Figura 7	Camundongos imunodeprimidos com co-implantes de OSCC-3-Luc+HDMEC submetidos à imagem de bioluminescência após 14 e 21 dias do início da administração de PTK/ZK (A) com o respectivo gráfico da leitura de luminescência dos grupos tratados ou não com	52

	PTK/ZK (B). ROI=luminescência da região de interesse. p = significativo para $p<0.05$	
Figura 8	Volume e peso médios dos implantes, retirados após 21 dias, dos grupos tratados com PTK/ZK e controle que receberam células UM-SCC-17B-Luc+HDMEC (17B-HDMEC) (A e B), HDMEC (A e B), e para o grupo OSCC-3-Luc+HDMEC retirados após 28 dias (C e D). p = significativo para $p<0,05$	53
Figura 9	Aspecto macroscópico dos implantes subcutâneos dorsais de células UM-SCC-17B-Luc+HDMEC (17B+HDMEC) (A e B), HDMEC (C e D) e OSCC-3-Luc+HDMEC (E e F) em animais tratados (A, C e E) ou não (B, D e F) com PTK/ZK onde se observa a diferença na coloração dos implantes quando comparados os grupos experimentais e controle.	54
Figura 10	Aspecto microscópico dos implantes subcutâneos dorsais de células 17B-Luc+HDMEC (A e B), HDMEC (C e D) e OSCC-3-Luc+HDMEC (E e F) tratados (A, C e E) ou não (B, D e F) com PTK/ZK destacando-se a presença de vasos sangüíneos e de células inflamatórias mononucleares. (HE aumento original 400X)	55
Figura 11	Média das densidades vasculares para os grupos de implantes com 17B-Luc-HDMEC (após 21 dias), HDMEC (após 21 dias) e OSCC-3-Luc-HDMEC (após 28 dias) tratados ou não com PTK/ZK. * p = significativo para $p<0,05$	56
Figura 12	Aspecto microscópico dos implantes com coloração de imuno-histoquímica para Fator VIII representativos dos grupos 17B-Luc+HDMEC (após 21 dias, A e B), HDMEC (após 21 dias, C e D) e OSCC-3-Luc+HDMEC (após 28 dias, E e F) tratados (PTK/ZK) ou não (Controle) com PTK/ZK. (Imuno-histoquímica para Fator VIII, aumento original 400X)	57
Figura 13	Imuno-histoquímica para Fator VIII realizado em implante de OSCC-3-Luc+HDMEC em lâmina preparada para técnica de LCM (A), com a retirada de conteúdo dos vasos sangüíneos (B) e posterior coleta de células endoteliais (C). Em D e E observam-se as células tumorais perivasculares de OSCC-3-Luc (D) e após sua remoção pela LCM (E). (Imuno-histoquímica para Fator VIII, aumento original 400X)	58
Figura 14	RT-PCR para Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1 dos co-implantes de células endoteliais e tumorais UM-SCC-17B-Luc+HDMEC (A) e OSCC-3-Luc+HDMEC (B) e HDMEC (C), coletadas por técnica de LCM dos implantes subcutâneos dorsais de camundongos imunodeprimidos tratados (PTK/ZK) ou não (Controle) com PTK/ZK via oral. Em D observa-se a expressão relativa de Bcl-2 em células endoteliais co-implantadas com células tumorais OSCC-3-Luc (D) obtida pelo PCR em tempo real. * p = significativo para $p<0,05$	60

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µl	microlitro
µm	micrometro
nM	nanomol
°C	grau Celsius
Akt	= proteína quinase B
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> – adenosina trifosfato
aFGF	<i>acidic Fibroblastic Growth Factor</i> – fator de crescimento fibroblástico ácido
Bak	<i>Bcl-2 antagonist/killer 1</i> – antagonista de Bcl-2/killer 1
Bax	<i>Bcl-2 homologous antagonist</i> – antagonista homólogo de Bcl-2
Bcl-2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i> – CLL célula B/linfoma 2
Bcl-2-x _L	<i>Bcl-2 homologous-X long</i> – homólogo de Bcl-2-X longo
bFGF	<i>basic Fibroblastic Growth Factor</i> – fator de crescimento fibroblástico básico
bp	<i>base pair</i> – pares de base
c-Kit	= CD117, KIT – <i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
c-Fms	<i>Proto-oncogene fms</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> – ácido desoxiribonucléico complementar
CDK	<i>Cyclin-dependent kinases</i> – quinases ciclina-dependentes
CXC	<i>Cysteine-(aminoacid)-Cysteine</i> – cisteína-(aminoácido)-cisteína
CXCL-1	<i>CXC ligand-1</i> – CXC ligante-1
CXCL-8	<i>CXC ligand-8</i> – CXC ligante-8
CXCR-1	<i>CXC Receptor 1</i> – receptor para CXC 1
CXCR-2	<i>CXC Receptor 2</i> – receptor para CXC 2
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> – C ₂ H ₆ OS – dimetil sulfóxido
EGF	<i>Epithelial Growth Factor</i> – fator de crescimento epitelial
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> – ensaio imunoenzimático
ErbB	= <i>EGF receptor</i> – receptor de EGF
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor-2</i> – fator de crescimento fibroblástico-2
Flk-1	<i>Fetal liver kinase-1</i> – quinase de fígado fetal-1
Flt-1	<i>fms-like tyrosine kinase</i> – tirosina quinase fms-like
FLT3	<i>fms-related tyrosine kinase 3</i> – tirosina quinase 3

	relacionada a fms
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HB-EGF	<i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i> – fator de crescimento EGF-like ligado a heparina
HDMEC	<i>Human Dermal Microvascular Endothelial Cells</i> – células endoteliais microvasculares dérmicas humanas
HIF	<i>Hypoxia-inducible transcription factor</i> – fator de transcrição induzido por hipóxia
ICI 182, 780	inibidor de estrógeno ICI 182, 780
IL-1	<i>Interleukin-1</i> – interleucina 1
IL-6	<i>Interleukin-6</i> – interleucina 6
IL-8	<i>Interleukin-8</i> – interleucina 8
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i> – fator de crescimento insulina-like 1
JUN	<i>jun oncogene</i>
kDa	Quilodalton
KDR	<i>kinase domain region</i> – região de domínio quinase
Kg	Quilograma
LCM	<i>Laser Capture Microdissection</i> – microdissecção a laser
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i> – proteína mitógeno-ativada
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> – ácido ribonucléico mensageiro
NF-κB	<i>Nuclear Factor-κB</i> – fator nuclear-κB
OSCC-3	<i>Oral squamous cell carcinoma cell line 3</i> – linhagem de célula de carcinoma espinocelular de boca previamente isolado de paciente pela Universidade de Chicago
OSCC-3-Luc	<i>Oral squamous cell carcinoma cell line 3</i> – linhagem de célula de carcinoma espinocelular de boca transfectada com luciferase
P-Akt	<i>Phospho-Akt</i> – fosfo-Akt
pg	picograma
pH	potencial hidrogeniônico
pO ₂	pressão parcial de oxigênio
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – reação em cadeia da polimerase
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i> – fator de

PD-ECGF	crescimento derivado de plaquetas <i>Platelet derived endothelial cell growth factor</i> – fator de crescimento de células endoteliais derivado de plaquetas
PDGF- β	<i>Platelet derived growth factor-β</i> - fator de crescimento derivado de plaquetas β
PI-3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i> – fosfoinositol 3-quinase
PLC- γ	<i>Phospholipase C-γ</i> - fosfolipase C- γ
PIGF	<i>Placental Growth Factor</i> – fator de crescimento placentário
PTK/ZK	PTK787/ZK222584 - Vatalanib®
Real-time PCR	<i>Real-time polymerase chain reaction</i> - reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> – ácido ribonucleico
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> - reação em cadeia da DNA polimerase com transcriptase reversa
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i> - imunodeficiência profunda combinada
sVEGF	<i>soluble Vascular Endothelial Growth Factor</i> - fator de crescimento endotelial vascular solúvel
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i> - fator de crescimento transformante β
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i> - fator de necrose tumoral- α
TSP-1	<i>Thrombospondin-1</i> – trombospondina-1
UM-SCC-17B	<i>University of Michigan – Squamous Cell Carcinoma cell line 17B</i> – linhagem de célula de carcinoma espinocelular de laringe metastática previamente isolado de paciente pela Universidade de Michigan
UM-SCC-17B-Luc	<i>University of Michigan – Squamous Cell Carcinoma cell line 17B</i> – linhagem de célula de carcinoma espinocelular de laringe metastática transfectada com luciferase
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> - fator de crescimento endotelial vascular
VEGF-A	<i>Vascular Endothelial Growth Factor-A</i> - fator de crescimento endotelial vascular-A
VEGF-B	<i>Vascular Endothelial Growth Factor-B</i> - fator de crescimento endotelial vascular-B
VEGF-C	<i>Vascular Endothelial Growth Factor-C</i> - fator de crescimento endotelial vascular-C
VEGF-D	<i>Vascular Endothelial Growth Factor-D</i> - fator de crescimento endotelial vascular-D

VEGF-E	<i>Vascular Endothelial Growth Factor-E</i> - fator de crescimento endotelial vascular-E
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i> – receptor para o fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR-1	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1</i> – receptor para o fator de crescimento endotelial vascular -1
VEGFR-2	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2</i> – receptor para o fator de crescimento endotelial vascular -2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1	ASPECTOS MOLECULARES DA ANGIOGÊNESE	9
2.2	ANGIOGÊNESE TUMORAL	13
2.3	VIA DE SINALIZAÇÃO VEGF/VEGFR DA ANGIOGÊNESE	16
2.4	MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DA ANGIOGÊNESE	20
2.5	TERAPIA ANTIANGIOGÊNICA PARA TUMORES MALIGNOS	21
2.6	PTK787/ZK 222584	23
3	PROPOSIÇÃO	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	AMOSTRA	35
4.2	EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	36
4.2.1	Co-cultura de células endoteliais e tumorais	36
4.2.2	Teste ELISA	37
4.2.3	Western blot	37
4.2.4	Reação em cadeia da DNA polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR)	37
4.2.5	Expressão de VEGFR-1 e VEGFR-2 nas células endoteliais HDMEC e tumorais OSCC-3 e UM-SCC-17B	38
4.3	EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	39
4.3.1	Modelo de angiogênese tumoral humana em camundongos imunodeprimidos (Severe combined immunodeficiency - SCID)	39
4.3.2	Imagem de bioluminescência	40
4.3.3	Imuno-histoquímica para Fator VIII e análise de densidade vascular	41
4.3.4	Imuno-histoquímica para Fator VIII e técnica de microdissecção a laser (LCM)	41

4.3.5	Reação em cadeia da DNA polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) para LCM	42
4.3.6	Reação de polimerase em cadeia em tempo real	43
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5	RESULTADOS	45
5.1	EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	47
5.1.1	Expressão de Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1 em co-cultura de células endoteliais e tumorais	47
5.1.2	Expressão de VEGFR-1 e VEGFR-2 nas células endoteliais (HDMEC) e tumorais (UM-SCC-17B e OSCC-3)	51
5.2	EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	52
5.2.1	Modelo de angiogênese tumoral humana em camundongos imunodeprimidos (Severe combined immunodeficiency - SCID)	52
5.2.2	Imuno-histoquímica para Fator VIII e análise da densidade vascular	56
5.2.3	Imuno-histoquímica para Fator VIII e técnica de microdissecção a laser (<i>Laser Capture Microscopy</i> - LCM)	58
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
	ANEXO	89

1 – Introdução

1 – INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas muitos pesquisadores direcionaram seus esforços visando determinar, não somente o impacto da angiogênese no desenvolvimento e progressão de tumores sólidos como o carcinoma espinocelular, mas também, a influência das substâncias produzidas e secretadas pelas células malignas na microvasculatura tumoral^{11,24,66,71}.

Há alguns anos foi comprovado que os tumores sólidos necessitam de vascularização como fonte de oxigênio e nutrientes quando ultrapassam 1 a 2mm de diâmetro²⁴ e que as células tumorais podem induzir um processo denominado *angiogenic switch*, onde alteram seu comportamento biológico e passam a secretar fatores pró-angiogênicos visando garantir sua sobrevivência^{11,21,59}.

A angiogênese tumoral depende diretamente dos níveis entre os ativadores e inibidores deste processo, os quais determinam se a célula endotelial permanecerá quiescente ou em um estado angiogênico. Acredita-se que as alterações neste balanço dos mediadores da angiogênese controla o processo de *angiogenic switch* nos tumores sólidos^{11,41,59}. Entretanto, o mecanismo molecular detalhado da *angiogenic switch* pelo qual o endotélio quiescente torna-se ativado é desconhecido, mas o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) parece ser o principal indutor da angiogênese tumoral⁷⁶.

O VEGF tem sido considerado um regulador central da angiogênese, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas, por exercer uma função predominante na formação de microvasos sangüíneos^{20,70,59}.

A família VEGF consiste em várias glicoproteínas, secretadas por células neoplásicas, leucócitos, células endoteliais e células do estroma tumoral, responsáveis pela regulação de diferentes funções nas células

endoteliais, tais como proliferação, migração e sobrevivência, aumento da permeabilidade e tônus vascular^{59,70,76}.

Dois receptores de tirosina-quinases descritos como flt-1 (*fms-like tyrosine kinase-1*) e KDR (*kinase insert domain-containing receptor*)/flk-1 (*fetal liver kinase-1*) e conhecidos como VEGFR-1 e VEGFR-2, respectivamente, foram identificados como receptores específicos para VEGF^{61,70}. A ligação dos fatores de crescimento pró-angiogênicos a esses receptores expressos pelas células endoteliais dos vasos sanguíneos são responsáveis pela sinalização para a proliferação e diferenciação das células endoteliais em humanos⁷⁰.

Uma importante via reguladora da angiogênese ocorre quando VEGF liga-se ao seu receptor VEGFR-2 e através da via de sinalização de PI3-K, induz a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 que eleva a expressão de citocinas pró-angiogênicas CXCL-8 e CXCL-1 resultando na proliferação de células endoteliais³⁶.

Todo esse conhecimento relativo a angiogênese e a comprovação de que as neoplasias malignas dependem essencialmente do suprimento sanguíneo tem inspirado muitos pesquisadores pela busca de moléculas antiangiogênicas a serem utilizadas como alvos potenciais no tratamento do câncer.

No ano 2000, WOOD et al.⁷⁷ fizeram o relato de uma nova droga antiangiogênica denominada PTK787/ZK 222584 (PTK/ZK) com ação comprovada, *in vivo* e *in vitro*, em diferentes tipos de câncer, incluindo o de próstata⁷⁷, de rim^{16,17}, de tireóide⁶³, de hipofaringe⁸¹, de fígado^{45,78} e de boca⁷⁹.

O PTK/ZK atua especificamente como potente inibidor do receptor tirosina quinase de VEGF, não apresentando qualquer efeito citotóxico em células que não expressam esses receptores⁷⁷.

Ao contrário de outras drogas antiangiogênicas de alto peso molecular com potencial imunogênico e que requerem administração parenteral, o PTK/ZK, por ser uma molécula sintética de baixo peso molecular, pode ser administrado via oral e tem sido bem tolerado pelos pacientes. Além disso, esta droga parece não comprometer o processo de angiogênese fisiológica como, por exemplo, a cicatrização.^{73,77}

Visando contribuir com o conhecimento do mecanismo de ação e da via de atuação antiangiogênica VEGF/VEGFR do medicamento PTK/ZK nos

carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço, foi proposto o presente estudo utilizando-se o modelo experimental de angiogênese humana em camundongo imunodeprimido desenvolvido por NÖR et al.⁵⁶

Este estudo pretende não somente contribuir com o mecanismo molecular do processo de angiogênese tumoral mas também, reforçar a fundamentação biológica e molecular de terapêuticas antiangiogênicas adjuvantes como o PTK/ZK, no tratamento dos pacientes portadores de câncer, particularmente aqueles com carcinoma da região de cabeça e pescoço.

2 – Revisão de Literatura

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – ASPECTOS MOLECULARES DA ANGIOGÊNESE

Angiogênese é o processo pelo qual formam-se novos vasos a partir de vasos sangüíneos pré-existentes onde o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*) é primordial para este fenômeno^{13,61}. A proliferação de vasos sangüíneos é crucial para uma grande variedade de processos fisiológicos tais como desenvolvimento embriológico, crescimento normal e diferenciação, cicatrização e funções reprodutivas²¹.

O VEGF consiste em um fator de sobrevivência para as células endoteliais¹⁰ localizado no gene 6p21.3 em humanos²¹, sendo importante regulador da vasculogênese e angiogênese⁶⁵. Pertence a uma família de mitógenos estruturalmente denominados VEGF-fatores de crescimento derivados de plaqueta (PDGF – *Platelet-derived Growth Factor*)¹⁰.

Estes polipeptídeos pertencentes à família de PDGF, como VEGF, são glicoproteínas com ligação dimérica à cisteína que apresentam um peso molecular aproximado de 40kDa¹³. A família VEGF em humanos é composta pelos membros VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, e Fator de crescimento placentário (PIGF – *Placental Growth Factor*).

O VEGF-A, ou simplesmente VEGF, apresenta quatro isoformas: VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆. Além disso, a isoforma VEGF₁₆₅ pode ser clivada por plasmina e várias metaloproteinases, gerando VEGF₁₁₀ e VEGF₁₁₃ – dois fragmentos bioativos NH₂-terminal^{10,21,42,22}.

O VEGF-E é um fator angiogênico não-humano presente no Orf parapoxvírus semelhante ao VEGF-A que estimula a migração e brotamento de células endoteliais vasculares *in vitro* e *in vivo* por meio do VEGFR-2⁴⁷.

A expressão do gene de VEGF é aumentada por fatores de crescimento como PDGF, FGF, EGF (fator de crescimento epitelial), TGF- β (fator de

crescimento de transformação- β), TNF (fator de necrose tumoral), IL-1 (interleucina-1) e hipóxia^{10,21}.

Existem três tipos de receptores tirosina quinase para VEGF presentes nas células endoteliais vasculares⁶⁵: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3, e estes necessitam de dimerização para induzir a sinalização intracelular⁷². O VEGFR-2 é responsável pela transdução de sinais de proliferação, sobrevivência, apoptose, migração e degradação de matriz extracelular⁵².

VEGFR-1 ou Flt-1 de 180kDa foi o primeiro receptor tirosina quinase identificado como receptor para VEGF. Este receptor é expresso por células endoteliais, monócitos, macrófagos, células dendríticas, osteoclastos, pericitos e trofoblastos na placenta^{15,70}. As funções e propriedades de sinalização do VEGFR-1 podem ser diferentes de acordo com o estágio de desenvolvimento do animal e do tipo celular²².

O VEGFR-1 tem sido relacionado à migração celular⁷² sendo um regulador negativo da angiogênese durante o desenvolvimento em fases precoces, mas tem papel importante na angiogênese em condições patológicas⁷². Este receptor liga-se ao VEGF, VEGF-B e PlGF e sua sinalização em células endoteliais pulmonares tem sido atribuída à indução de metaloproteinase-9 sendo relacionada a facilitação de metástases pulmonares²².

A atividade quimiotática para macrófagos induzida por VEGF em tumores malignos também tem sido investigada. Em um estudo realizado com monócitos humanos, BARLEON et al.², em 1996, demonstraram que a resposta quimiotática induzida pelo VEGF para estas células, contribui juntamente com PlGF, na angiogênese de tumores e tecidos inflamatórios por ação direta nas células endoteliais, bem como indiretamente, favorecendo o recrutamento de macrófagos, que segundo os autores pode aumentar a expressão de VEGFR-1².

Estudos *in vitro* com células de carcinoma colorretal demonstraram a presença de VEGFR-1 nestas células malignas e sua ativação foi relacionada a alterações fenotípicas associadas à progressão tumoral e metástase²⁰.

O VEGFR-2, KDR (*Kinase domain region*) ou Flk-1 de 200-230kDa⁷⁰ consiste no marcador mais precoce do desenvolvimento de células endoteliais⁶⁵ sendo o maior mediador para os efeitos de VEGF na mitogênese,

angiogênese e permeabilidade vascular^{22,65,70}. Este receptor sofre dimerização e fosforilação dependente da ligação com a tirosina em células intactas, resultando em sinalização mitogênica, quimiotática e de sobrevivência²².

Em um estudo realizado por TAKAHASHI et al.⁷¹, em 2001, foi sugerido que a autofosforilação de uma região de VEGFR-2 denominada Y1175 pode ser crucial para a proliferação da célula endotelial via MAP quinase⁷¹. O VEGFR-2 também atua na indução da permeabilidade vascular e proliferação da célula endotelial⁷². Além das células endoteliais, células-tronco hematopoiéticas, células neuronais, osteoblastos, células do ducto pancreático, células progenitoras de retina e megacariócitos também expressam VEGFR-2⁶⁵. A ativação de VEGFR-2, e não VEGFR-1, é necessária para o efeito antiapoptótico nas células endoteliais venosas umbilicais humanas²². O VEGFR-2 liga-se principalmente ao VEGF e formas processadas de VEGF-C e VEGF-D⁷⁰.

Mesmo com alto grau de homologia no domínio quinase, a sinalização difere muito entre os receptores de VEGF. Por exemplo, o VEGFR-1 tem um grau de afinidade dez a 40 vezes maior para VEGF quando comparado ao VEGFR-2^{19,22,42}. VEGFR-1 e VEGFR-2 têm sete domínios extracelulares imunoglobulina-*like*, além de uma região transmembrana simples e uma sequência tirosina quinase intracelular que é interrompida por um domínio quinase^{21,22}. A sinalização dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 deve ser coordenada para a expansão e diferenciação equilibrada do precursor endotelial durante a embriogênese⁶⁵.

VEGF-C e VEGF-D têm ação angiogênica via VEGFR-2 e VEGFR-3 ou Flt-4 (195kDa) e linfangiogênica via VEGFR-3. Os níveis de expressão absoluto ou relativo de VEGFR-2 e VEGFR-3 nas células endoteliais parecem determinar se VEGF-C/D exerce efeito angiogênico ou linfangiogênico^{59,70}. A expressão de VEGFR-3 restringe-se a células endoteliais linfáticas, capilares fenestrados e veias de órgãos endócrinos, monócitos e macrófagos⁶⁵.

A hipóxia tem sido considerada a maior indutora da expressão local do gene VEGF em tumores, exercendo um papel importante na regulação da expressão de VEGFRs²¹.

Além destes receptores, há um outro nível de controle exercido por uma forma solúvel do VEGFR (sVEGF receptor-1 – sVEGFR-1) que não possui o

domínio intracelular quinase. O sVEGFR-1 possui alta afinidade por VEGF que inibe a mitogênese induzida por este fator, provavelmente pelo seu seqüestro. Além desta ação, o sVEGFR-1 parece inibir a sinalização mediada pelo VEGF por meio da heterodimerização, o que impediria os sinais de transdução do VEGFR-2 pois sVEGFR-1 não possui o domínio tirosina quinase intracelular^{21,37}. O VEGF encontra-se em níveis plasmáticos elevados em indivíduos com câncer, isquemia e pré-eclâmpsia⁷⁰.

Portanto, VEGF é um mediador importante na angiogênese uma vez que facilita o processo de crescimento e remodelação de vasos sanguíneos, bem como atua como estímulo para mitogênese e sobrevivência para as células endoteliais¹⁰.

Os principais fatores pró-angiogênicos endógenos são aFGF (*acidic Fibroblastic Growth Factor* – fator de crescimento fibroblástico ácido) e bFGF, angiogenina, angiopoietina-1 e -2, fator de crescimento de hepatócitos, CXCL-8, PlGF, fator de crescimento de célula endotelial derivado de plaquetas, TGF- α e - β , TNF- α , VEGF, EGF, efrina-A1, -B1 e -B2. Os fatores antiangiogênicos incluem angiostatina, endostatina, interferon- α e - β , interferon indutor de proteína-10, fator plaquetário 4, fragmento de prolactina, trombospondina (TSP-1), inibidor tecidual de metaloproteinase, tumstatina, vasculostatina, anti-trombina III, sVEGFR-1, entre outros^{38,61,72}.

PEPPER⁵⁷, em 1997, dividiu o processo de angiogênese em fase de brotamento e fase de resolução.

A fase de brotamento constitui-se de:

- aumento da permeabilidade vascular e deposição de fibrina extravascular;
- separação da parede vascular;
- degradação da membrana basal;
- migração celular e invasão da matriz extracelular;
- proliferação de célula endotelial;
- formação do lume capilar.

A fase de resolução consiste de:

- inibição da proliferação de célula endotelial;
- interrupção da migração celular;

- reconstituição da membrana basal;
- maturação do complexo juncional;
- construção da parede vascular incluindo recrutamento e diferenciação de células de músculo liso e pericitos.

2.2 – ANGIOGÊNESE TUMORAL

Os vasos sangüíneos tumorais são geralmente derivados da divisão e proliferação de células endoteliais de vasos pré-existentes, podendo se originar também de precursores endoteliais circulantes soltos da parede vascular ou mobilizados da medula óssea⁵⁹.

Em 1971, Judah Folkman sugeriu que tumores sólidos sempre necessitavam de neovascularização para o seu crescimento, e que mediadores seriam liberados pelas células tumorais para que as células endoteliais passassem de seu estado latente, não regenerador, para um de rápida proliferação com capacidade de formar novos brotos vasculares²⁴. Além disso, ele reforçou que a falta de vascularização adequada não permite que o tumor ultrapasse o tamanho de 1 a 2mm (cerca de 10^6 células) devido à deficiência de oxigenação e nutrientes²¹.

Atualmente, a fase de transição entre o estado avascular ou de vasculatura normal quiescente no tumor dormente, e a fase vascular caracterizada pela formação de novos capilares sangüíneos com crescimento exponencial do tumor tem sido denominado *angiogenic switch*.

Na fase pré-vascular as células tumorais podem estar proliferando tanto quanto na fase vascular, porém a apoptose destas células equilibra esta proliferação mantendo a massa tumoral estável⁵⁹. A ausência de angiogênese tumoral impede a expansão da neoplasia mantendo-a em um tamanho microscópico e em estado assintomático e não-metastático. Porém, uma vez que se torne angiogênica, as neoplasias podem-se expandir rapidamente e tornarem-se letais^{33,53}.

A descoberta de tumores durante autópsia de indivíduos que faleceram por outras causas que não fossem o câncer⁵ sugerem que apenas uma

pequena parcela dos tumores dormentes entram na segunda fase ou fase vascular onde ocorre o crescimento tumoral⁴.

Tem sido proposto que a *angiogenic switch* está “desligada” quando há um equilíbrio entre moléculas pró-angiogênicas e antiangiogênicas, e está “ligada” quando há um desequilíbrio entre os mesmos em favor da angiogênese. Esta mudança nos tumores pode ser desencadeada por estresse metabólico (ex.: baixo pO_2 , baixo pH ou hipoglicemia), estresse mecânico (ex.: pressão gerada pela proliferação celular), resposta imunológica/inflamatória (ex.: células imunológicas/inflamatórias infiltrando o tecido) ou mutação genética (ex.: ativação de oncogenes ou deleção de genes supressores de tumor que controlam a produção de reguladores angiogênicos)^{8,11}.

A *angiogenic switch* depende do aumento e produção de um ou mais fatores pró-angiogênicos, tais como VEGF, fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2 – *Fibroblast Growth Factor 2*), IL-8, TGF- β , PDGF, pleiotrofinas, entre outros. Estes fatores podem ser produzidos por células tumorais, mobilizados da matriz extracelular ou liberados por células do hospedeiro recrutadas pelo tumor (ex: macrófagos). A expressão de inibidores endógenos, por exemplo, TSP-1 ou interferon- β podem estar reduzidos. Portanto, *angiogenic switch* envolve mais que um simples aumento da atividade angiogênica e pode ser vista como o resultado do equilíbrio entre os vários fatores pró- e antiangiogênicos^{25,59}, sendo também influenciada pela expressão de oncogenes⁴.

Resumidamente, a mudança para o fenótipo angiogênico ocorre por⁵³:

- aumento na expressão de proteínas angiogênicas pelas células tumorais, como por exemplo VEGF e bFGF;
- aumento na expressão de proteínas angiogênicas por fibroblastos do estroma induzidas pelo tumor;
- redução da expressão de inibidores angiogênicos endógenos (por ex.: TSP-1) pelas células tumorais e fibroblastos do estroma;
- em alguns tumores ocorre recrutamento de precursores de células endoteliais da medula óssea.

Um dos principais fatores pró-angiogênicos secretados por diferentes células tumorais é o VEGF. A hipóxia local é um dos maiores indutores da expressão de VEGF nos tumores²¹ pois, geralmente, o fluxo sanguíneo tumoral é caótico e variável, criando áreas de hipóxia e de acidez o que regula a produção de inibidores ou estimuladores da angiogênese e seleciona células cancerosas de maior malignidade e metástase¹¹.

Os vasos sanguíneos tumorais produzidos devido ao estímulo de VEGF são estrutural e funcionalmente irregulares e apresentam fluxo sanguíneo desordenado com permeabilidade vascular aumentada. Esta irregularidade no fluxo sanguíneo leva à hipóxia tumoral e conseqüente aumento na produção de VEGF, estabelecendo-se então um *feedback* positivo pelo qual o tumor mantém a produção de VEGF, garante a manutenção da vasculatura imatura do tumor, bem como a presença constante de vasos anômalos¹⁰.

A avaliação de carcinoma de mama, ovário, pulmão e glioblastoma demonstrou que a expressão de mRNA de VEGF ocorria em células tumorais mas não em células endoteliais; por outro lado, a expressão de mRNA de VEGFR-1 e VEGFR-2 estava aumentada nas células endoteliais associadas ao tumor. Além disso, estes estudos indicaram que o VEGF secretado pelas células tumorais acumulava-se nas células endoteliais^{48,49}. As células endoteliais dos vasos tumorais expressam VEGFR-2, e portanto a angiogênese tumoral é diretamente regulada por VEGF e VEGFR⁶⁵. Além do VEGF, as células tumorais humanas podem produzir também VEGF-C, VEGF-D e PlGF⁴.

KITADAI et al.⁴¹, em 2004, estudaram vários espécimes de arquivo de mucosa normal, displasia e carcinoma espinocelular de esôfago por meio de imuno-histoquímica para VEGF, PD-ECGF, bFGF e IL-8, bem como análise de densidade vascular por meio de marcação com CD-34. Além disso, foram realizadas a avaliação da expressão de mRNA de VEGF, PD-ECGF, bFGF e IL-8 em seis linhagens de células de carcinoma de esôfago. Os autores concluíram que as lesões displásicas de esôfago apresentaram neovascularização aumentada quando comparadas ao epitélio normal e a microdensidade vascular foi semelhante à mucosa de carcinoma, indicando que a *angiogenic switch* ocorre em um estágio precoce do desenvolvimento tumoral.

A compreensão das vias moleculares que envolvem o mecanismo de indução de angiogênese fisiológica e tumoral nas células endoteliais bem como o processo de *angiogenic switch*, aumentam as possibilidades de desenvolvimento de novas terapêuticas a serem utilizadas no tratamento de tumores malignos.

2.3 – VIA DE SINALIZAÇÃO VEGF/VEGFR DA ANGIOGÊNESE

O sistema VEGF/VEGFR, principal via responsável pela angiogênese, tem múltiplas funções tais como indução de metástase tumoral, inflamação, neuroproteção, proteção do fígado e mobilização de células-tronco derivadas de medula, bem como linfangiogênese⁷⁰. Portanto, VEGF também tem papel importante no desenvolvimento de certas doenças caracterizadas pela neovascularização, tais como doenças oculares e inflamatórias, bem como na tumorigênese¹⁰.

Experimentos *in vitro* com células endoteliais tratadas com VEGF demonstraram que VEGF provoca a sinalização de sobrevivência destas células sendo este processo mediado pelo VEGFR-2 por meio da via de sinalização de fosfatidilinositol-3 quinase (PI-3 *kinase*)/Akt²⁸. Além disso, quando estas células foram tratadas com VEGF observou-se aumento da expressão das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e A1²⁷.

A importância do papel do VEGF em potencializar e sustentar a angiogênese encontra-se associado à sua capacidade de prolongar a sobrevivência de células endoteliais e induzir expressão de Bcl-2⁵⁵.

O impacto do aumento de Bcl-2 em células endoteliais na progressão tumoral tem sido demonstrado tanto em modelos experimentais de carcinoma como de sarcoma⁵⁶. NÖR et al.⁵⁴, em 2001, demonstraram que a expressão aumentada de Bcl-2 em células endoteliais resulta em maior densidade vascular intratumoral e acelera o crescimento do tumor *in vivo*.

O Bcl-2 tem um papel clássico como proteína antiapoptótica⁷⁵, entretanto, estudos recentes demonstraram que ela também funciona como uma molécula sinalizadora pró-angiogênica envolvendo a ativação de NF-κB e

aumento da regulação da expressão de duas citocinas CXCL-8 (também denominado interleucina-8 – IL-8) e CXCL-1 (também denominado GRO α)³⁶.

KARL et al.³⁶, em 2005, observaram que o meio de cultura condicionado de células endoteliais humanas transduzidas com Bcl-2 (HDMEC-Bcl-2) é suficiente para induzir uma potente neovascularização em córnea de ratos, enquanto o meio de cultura condicionado controle (HDMEC-LXSN) não induz a angiogênese. Para se compreender esta observação inesperada, realizou-se avaliação da expressão genética que revelou uma expressão significativamente maior das citocinas pró-angiogênicas CXCL-8 e CXCL-1 em HDMEC exposta ao VEGF e em HDMEC-Bcl-2 do que nos controles. A inibição da expressão de Bcl-2 com siRNA-Bcl-2 (*small interfering RNA*-Bcl-2) ou da função de Bcl-2 com o inibidor BL-193, reduziu a expressão de CXCL-8 e CXCL-1 causando redução significativa no potencial angiogênico de células endoteliais sem afetar a viabilidade celular. NF- κ B encontra-se altamente ativado em HDMEC exposta ao VEGF e células HDMEC-Bcl-2, e abordagens genéticas e químicas para se bloquear a atividade de NF- κ B reduziram os níveis de expressão de CXCL-8 e CXCL-1. Os autores demonstraram uma nova função para a Bcl-2 como molécula sinalizadora pró-angiogênica e sugeriram um papel desta via na angiogênese tumoral³⁶ (Figura 1).

CXCL-8 e CXCL-1 consistem em citocinas pró-angiogênicas da família CXC^{3,51}. CXCL-8 é um fator importante para quimiotaxia, inflamação, angiogênese, crescimento tumoral e metástases^{3,44}. CXCL-8 liga-se aos receptores CXCR1 e CXCR2, é expresso por leucócitos, células endoteliais e várias células tumorais^{3,6,44,64}, sendo sua produção estimulada pelo VEGF¹⁴.

O primeiro estudo comprovando o papel pró-angiogênico de CXCL-8 foi realizado na córnea de coelhos que receberam implantes com concentrações de CXCL-8 variando de 2pg a 400ng e submetidos a angiogramas de fluoresceína, e observaram a presença de neovascularização da córnea destes animais após 14 dias⁶⁸.

FIGURA 1: Esta figura ilustra a dupla função de Bcl-2 na angiogênese como uma molécula sinalizadora pró-angiogênica e de sobrevivência nas células endoteliais. VEGF induz a expressão de Bcl-2 via VEGFR-2, via de sinalização PI3K/Akt e a expressão de Bcl-2 aumenta a sobrevivência das células endoteliais. Bcl-2 também sinaliza uma cascata pró-angiogênica que é mediada por atividade IKK β quinase, fosforilação de I κ -B, ativação de NF κ -B e expressão de citocinas CXCL-8 e CXCL-1. Estas citocinas são secretadas e funcionam por uma via autócrina mediada por CXCR2 que resulta em aumento da angiogênese. Este modelo propõe que a inibição da função de Bcl-2 pode ser uma estratégia antiangiogênica efetiva para pacientes portadores de tumores malignos. (Adaptado de KARL et al.³⁶, 2005)

Para se avaliar o efeito angiogênico de CXCL-8, uma citocina que contém o ELR (seqüência Glu-Leu-Arg), um estudo utilizou-se de uma forma mutante da proteína CXCL-8 sem o ELR. Foi demonstrado que CXCL-8 apresenta atividade angiogênica como quimiotático e mediador da atividade proliferativa de células endoteliais, e a forma mutante passou a ter um comportamento angiostático. Estes resultados são compatíveis com a capacidade das citocinas contendo ELR de se ligarem às células endoteliais e neutrófilos. Os autores concluíram que o ELR é um domínio funcional regulador da atividade angiogênica das citocinas CXC, e a magnitude de sua expressão e concentração relativa, tanto de citocinas CXC angiogênicas ou angiostáticas, durante a neovascularização provavelmente contribui significativamente para a regulação do processo de angiogênese durante a cicatrização, a inflamação crônica ou tumorigênese⁶⁹.

Em um trabalho realizado por SCHRAUFSTATTER, CHUNG, BURGER⁶⁴, em 2001, com células endoteliais humanas tratadas com citocinas (CXCL-8 ou CXCL-1) ou inibidores de receptores CXCR1 ou CXCR2, demonstrou que CXCL-8 ativa células endoteliais pelos receptores CXCR1 e CXCR2; contribuindo para o aumento da permeabilidade vascular e a adesividade leucocitária como observada na inflamação aguda e na migração e proliferação de célula endotelial durante o processo de angiogênese.

NÖR et al.⁵⁵, em 1999, demonstrou que CXCL-8 pode estimular a proliferação e o crescimento de células endoteliais microvasculares dérmicas mas é incapaz de manter seu fenótipo angiogênico.

A inibição de CXCL-8, CXCR1 ou CXCR2 em células endoteliais humanas *in vitro* demonstraram que CXCL-8 atua como um importante fator de regulação autócrino da proliferação, migração, sobrevivência e produção de metaloproteinase-2 nas células endoteliais⁴⁴.

A expressão de CXCL-8 resulta de uma combinação de três diferentes mecanismos que são a expressão do gene promotor, ativação da transcrição do gene pelas vias de NF- κ B e JUN-N-proteína quinase terminal, e estabilização de mRNA pela via da proteína quinase do p38 mitógeno-ativada³².

CXCL-1 também é uma citocina pró-angiogênica semelhante ao CXCL-8 que tem sido associada na formação de vasos sangüíneos e no aumento do

crescimento da quimiotaxia e metástases de várias linhagens de células tumorais^{12,43}. Esta citocina liga-se de modo autócrino somente ao receptor CXCR2^{3,26,43}.

A presença destas citocinas (CXCL-8 e CXCL-1) também tem sido estudada em células tumorais. Tem-se especulado a relação da presença de CXCL-8 em astrocitomas como parte de uma ação quimiotática da resposta inflamatória do hospedeiro à neoplasia, como um fator pró-inflamatório liberado em resposta à necrose, como um fator pró-angiogênico e como um fator de crescimento autócrino secretado pelas células tumorais para promover seu próprio crescimento⁶.

Diferentes linhagens de células de câncer de próstata humana constitutivamente produzem citocinas pró-angiogênicas, tais como CXCL-8 e CXCL-1, podendo utilizar distintas citocinas para mediar a sua tumorigenicidade e sua capacidade de metastatizar⁵¹.

A presença de CXCL-1, bem como de seu receptor CXCR2, foi avaliada em linhagens de células de espinocelular demonstrando que a expressão constitutiva de CXCL-1 e CXCR2 pelas células malignas está associada ao fenótipo de metástase e modula a proliferação e invasão tumoral de modo autócrino e parácrino^{43,46}.

2.4 – MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DA ANGIOGÊNESE

Diversos modelos experimentais para se estudar o fenômeno da angiogênese foram desenvolvidos ao longo do tempo, incluindo experimentos em íris e córnea de olho de roedores, membrana cório-alantóica de aves, bolsa em bochecha de hamsters, pele dorsal e alvéolo pulmonar entre outros⁵⁶.

No ano de 2001, NÖR et al.⁵⁶ propuseram um modelo de estudo de angiogênese humana onde se associou o uso de matrizes reabsorvíveis de ácido poli-L-lático (PLLA) desenvolvidas por MOONEY et al.⁵⁰, em 1997, com a cultura de células endoteliais humanas implantadas em camundongos imunodeprimidos. Neste modelo experimental foi demonstrado que os microvasos sangüíneos neoformados a partir das células endoteliais humanas implantadas, no 14º dia apresentam células sangüíneas do camundongo no

seu lume e se comportam de modo semelhante aos microvasos sangüíneos naturais tanto do ponto de vista funcional quanto genotípico⁵⁶. Portanto, este modelo mostrou-se ideal para o estudo de desenvolvimento da angiogênese humana tanto fisiológica quanto patológica^{58,67,80}.

2.5 – TERAPIA ANTIANGIOGÊNICA PARA TUMORES MALIGNOS

Nas últimas décadas, o avanço da biologia molecular permitiu a identificação de diversos fatores de crescimento responsáveis pelo desenvolvimento dos tumores sólidos como o carcinoma espinocelular. Uma das terapias promissoras no tratamento deste tipo de câncer está baseada nas drogas antiangiogênicas. Estas pesquisas têm sido fundamentadas em algumas descobertas importantes tais como³⁸:

- bFGF, a primeira molécula pró-angiogênica;
- VEGF e VEGFR tirosina quinase nas células endoteliais ativadas;
- angiopoietinas e seus receptores tirosina quinase;
- inibidores endógenos da angiogênese;
- marcadores moleculares em vasos sangüíneos recentemente formados, especialmente integrinas e moléculas de adesão celular;
- desenvolvimento de análise quantitativa de angiogênese;
- reconhecimento de significância prognóstica da angiogênese tumoral;
- ausência de resistência adquirida a drogas antiangiogênicas de ação direta;
- impacto da angiogênese em tumores hematológicos não-sólidos;
- efeito antiangiogênico “acidental” de várias drogas convencionais e novos medicamentos e estratégias de tratamento contra o câncer.

A terapia antiangiogênica pode inibir a proliferação endotelial no tumor ou induzir a apoptose da célula endotelial dependendo da concentração de reguladores angiogênicos positivos (VEGF, bFGF, PDGF) e negativos (endostatina, angiostatina, tumstatina) gerados pelo tumor²⁵. Além da inibição

da angiogênese, as terapias antiangiogênicas parecem resultar também num aumento da apoptose das células malignas²⁹.

Os mecanismos moleculares e celulares da angiogênese diferem nos vários tecidos, e a terapêutica de inibição ou estímulo de angiogênese devem ser ajustados de acordo com o tecido alvo¹¹.

Nos últimos anos, muitos agentes antiangiogênicos tiveram aprovação para sua utilização no tratamento de diferentes tipos câncer em vários países. Essa terapia tem sido baseada principalmente na inibição de vias de sinalização pró-angiogênicas tumorais com destaque para a via VEGF/VEGFR²³.

Em 1993, KIM et al.³⁹ realizaram o primeiro trabalho *in vivo* com inibição de VEGF por meio de um anticorpo monoclonal no tratamento de camundongos imunodeprimidos que receberam células de rabdomiossarcoma, glioblastoma multiforme ou leiomiossarcoma e observaram uma inibição significativa no crescimento tumoral, comprovando a relevância da terapêutica antiangiogênica no tratamento de tumores malignos.

Posteriormente, várias estratégias foram desenvolvidas para se inibir a sinalização de VEGF incluindo anticorpo monoclonal para VEGF ou VEGFR, os receptores extracelulares solúveis que se ligam ao domínio da heparina de VEGF₁₆₅, a utilização de antisense e siRNA para VEGF ou seus receptores, entre outros²³.

Algumas drogas para a terapêutica antiangiogênica com diferentes mecanismos de ação têm sido desenvolvidas destacando-se dentre elas: Interferon-alfa (inibidor da produção de bFGF), Neovastat/AE941 (inibidor de metaloproteinase e VEGFR), EMD121974 (antagonista de integrina), SU5416 (bloqueio de sinalização de VEGFR), TNP-470 (inibidor de proliferação endotelial), combretastatin (indução de apoptose de endotélio em proliferação), AG-013736 (inibidor de VEGFR, PDGFR β , KIT), Erlotinib (inibidor de EGFR), BAY 43-9006 (inibidor de Raf quinases, VEGFR-2, PDGFR β , FLT3 e KIT). Muitas destas drogas já se encontram em fase de estudo clínico e outras já foram aprovadas pelo órgão americano FDA (*Food and Drug Administration*) para uso terapêutico^{35,38}.

O PTK/ZK é um medicamento com ação antiangiogênica que foi descoberto há pouco tempo e tem mostrado resultados promissores na inibição do crescimento de tumores sólidos malignos^{45,62,63,77}.

2.6 – PTK787/ZK222584 (PTK/ZK)

Em 2000, WOOD et al.⁷⁷ fizeram o primeiro relato de PTK787/ZK222584 (1-[4-chloroanilino]-4-[4-pyridylmethyl] phthalazine succinate) cujo nome comercial é Vatalanib (PTK/ZK, Novartis/Shering AG), onde demonstraram tratar-se de uma molécula inibidora de receptores tirosina quinases de VEGF (Figura 2). A droga mostrou-se ligeiramente mais potente contra VEGFR-2 do que VEGFR-1, e em doses mais elevadas, também apresentava ação inibidora para VEGFR-3, PDGF- β , c-Kit, c-Fms⁷⁷.

FIGURA 2: Estrutura molecular de PTK/ZK.

Este primeiro estudo⁷⁷ caracterizou a ação antiangiogênica do PTK/ZK onde se observou redução da vascularização tumoral, com a inibição somente da formação de novos capilares sangüíneos pois os vasos sangüíneos maduros ou mais estáveis formados, antes do início do tratamento ou induzidos por outros fatores angiogênicos, não se mostraram sensíveis à inibição de PTK/ZK. Além disso, não houve prejuízo no processo normal de cicatrização.

Seu mecanismo de ação ocorre pela ligação competitiva da molécula de PTK/ZK ao sítio de ligação do ATP no domínio quinase do VEGFR. Esta inibição é reversível e altamente seletiva, resultando na redução do crescimento de tumores experimentais. Há uma fraca ação de PTK/ZK nos receptores de PDGF- β (PDGFR- β - *Platelet derived growth factor receptor- β*),

que também auxilia na ação antiangiogênica, visto que a via de sinalização de PDGF atua na interação de pericitos com células endoteliais, o que assegura a estabilização de vasos sanguíneos em desenvolvimento³¹.

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado o efeito antiangiogênico de PTK/ZK utilizando-se diversos tipos de células tumorais, tais como células malignas de próstata⁷⁷, de rim^{16,17}, de tireóide⁶³, de hipofaringe⁸¹ e de fígado^{45,78}.

No estudo realizado por DREVS et al.¹⁶, em 2000, utilizando PTK/ZK no tratamento de murinos que receberam células de carcinoma renal injetadas na subcápsula renal, foi observado a inibição do crescimento tumoral, da formação de metástase e da vascularização tumoral. Mais tarde, neste mesmo modelo, estes pesquisadores avaliaram o tumor primário por meio de ressonância magnética dinâmica e ultra-som doppler, além da densidade vascular e imunomarcação para Flk-1 em células endoteliais. Este estudo demonstrou que a droga reduziu significativamente a densidade vascular tumoral, bem como a permeabilidade vascular. Além disso, houve uma diminuição significativa de células endoteliais positivas para Flk-1, comprovando-se a ação antiangiogênica do PTK/ZK¹⁷.

SCHOENBERGER et al.⁶³, em 2004, implantaram células de carcinoma folicular de tireóide humana no subcutâneo de camundongos que foram tratados com PTK/ZK durante quatro semanas. Os resultados demonstraram que houve redução significativa de microvasos nos implantes, bem como de colágeno tipo I e laminina no espaço intersticial e em áreas perivasculares. Além disso, observou-se aumento de necrose no centro dos implantes tumorais e redução do seu tamanho⁶³.

O implante de células de carcinoma espinocelular de hipofaringe em áreas pré-irradiadas associadas à administração de PTK/ZK foi investigado por ZIPS et al.⁸¹, em 2005. Os autores demonstraram que células endoteliais apresentavam uma maior expressão de VEGFR-2 após exposição à irradiação, porém este fenômeno não foi observado nas células tumorais. Conseqüentemente, o grupo de animais pré-irradiados e tratados com a droga apresentou crescimento tumoral mais lento e tardio quando comparado ao grupo não tratado. Baseados neste resultado sugeriram que a irradiação

fracionada antes da administração do inibidor de VEGFR tirosina quinase (PTK/ZK) pode auxiliar no tratamento destes tumores malignos⁸¹.

Utilizando-se de células cancerosas de próstata humana implantadas em camundongos, SINI et al.⁶⁶, em 2005, verificaram que a monoterapia com PTK/ZK reduziu o volume do tumor em 41%, e a sua associação ao ZD1839, uma droga antiangiogênica inibidora do receptor ErbB, apresentou inibição de 74% no crescimento tumoral. A associação destas drogas resultou na apoptose de células endoteliais no tumor de próstata. Os autores concluíram que o bloqueio simultâneo das vias de ErbB1 e VEGFR resultou num efeito antitumoral cooperativo indicando que esta combinação pode resultar numa estratégia terapêutica válida no tratamento do câncer de próstata humano.

Um estudo *in vitro* e *in vivo* com diferentes linhagens de células de carcinoma hepatocelular que apresentavam VEGFR e foram submetidas a terapêutica com PTK/ZK foi realizado por LIU et al.⁴⁵ em 2005. Houve inibição do crescimento ectópico e ortotópico dos tumores acompanhado de redução de formação vascular bem como de redução na expressão de Bcl-2 e Bcl-x_L nas células tumorais. Além disso, observaram também que a droga induziu a expressão de inibidores de CDK p21 e p27 bem como o acúmulo de células na fase G₁, o que poderia contribuir para o efeito antitumoral do mesmo. Os autores concluíram que PTK/ZK é um potente inibidor do crescimento tanto pelo efeito antiangiogênico quanto pelo efeito direto na proliferação e apoptose da célula tumoral, e sugeriram que esta terapêutica é efetiva no tratamento do carcinoma hepatocelular humano⁴⁵.

Mais tarde, este mesmo grupo de pesquisadores realizou um novo estudo *in vivo* e demonstrou que o uso de PTK/ZK em células de carcinoma hepatocelular induzido em ratos suprimiu a expressão de VEGF e VEGFRs e inibiu a viabilidade destas células tumorais, bem como de células endoteliais. As células de carcinoma hepatocelular apresentaram um aumento na expressão da forma clivada de Caspase-9 e diminuição de Bcl-2, e este efeito foi maior sob hipóxia. Já as células endoteliais, apresentaram redução de Bcl-2 tanto sob hipóxia quanto com a associação de hipóxia à ligadura de artéria hepática. Além disso, também houve redução na expressão de Rac1, Rho e P-Akt tanto em células de carcinoma hepatocelular quanto em células endoteliais sob normóxia. A hipóxia induziu redução na expressão de Rho, estimulou a

expressão de Rac1 e não apresentou alteração na expressão de P-Akt. Na combinação de PTK/ZK com hipóxia observou-se maior redução na expressão de Rac1, Rho e P-Akt em células tumorais enquanto as células endoteliais apresentaram redução de Rho e P-Akt e reversão do aumento de Rac1 induzida pela hipóxia. Portanto, o efeito antitumoral de PTK/ZK mostrou-se dependente de supressão de proliferação, indução de morte e inibição de migração da célula tumoral. Por outro lado, o efeito antiangiogênico mostrou-se mais dependente de indução de morte celular, inibição da capacidade de formação de tubos e supressão da capacidade de mobilidade induzida por hipóxia em células endoteliais.⁷⁸

Recentemente, o PTK/ZK foi utilizado em alguns estudos em pacientes portadores de tumores malignos avançados localizados em região colorretal^{34,73}, em mama^{34,73}, em mesotelioma⁷³, em região neuroendócrina⁷³, em rim⁷³, em pulmão³⁴, em ovário³⁴, em pâncreas³⁴ e em tireóide³⁴. Entretanto, estes estudos ainda encontram-se em fase I/II de estudos clínicos.

DREVS et al.¹⁸, em 2005, realizaram um estudo com 63 pacientes portadores de carcinoma colorretal avançado que foram medicados com PTK/ZK durante 28 dias e dosaram a concentração plasmática de VEGF, bFGF, sTIE-2 e sE-SEL. Os resultados demonstraram que as alterações na concentração plasmática de VEGF e bFGF revelaram a atividade biológica da droga e auxiliaram no estabelecimento da dose ideal para a terapêutica que pode ter influência no prognóstico do paciente, pois estes fatores seriam produzidos pelas células tumorais em resposta à hipóxia, e a concentração plasmática provavelmente reflete o estado de hipóxia do tumor em resposta ao bloqueio efetivo de VEGFR nas células endoteliais.

Também foi relatado o uso do PTK/ZK no tratamento de alguns tumores não sólidos, tais como leucemia mielóide aguda (LMA) e síndrome mielodisplásica (SMD) devido à presença de VEGFR-2 em células hematopoiéticas. Sessenta e três pacientes com LMA ou SMD receberam doses diárias de 500 a 1000mg/dia de PTK/ZK, via oral, associado à quimioterapia padrão. Os resultados demonstraram uma completa remissão da doença em 5 dos 17 pacientes com LMA tratados com PTK/ZK combinado com a quimioterapia. Os autores concluíram que a dose máxima tolerada de PTK/ZK é de 750mg/dia via oral e que este medicamento é geralmente bem

tolerado e pode ser administrado em combinação com a quimioterapia para pacientes com SMD ou LMA.⁶⁰

O PTK/ZK tem se mostrado uma droga bem tolerada cujos efeitos colaterais são reversíveis e incluem náusea, vômito, tontura, fraqueza, fadiga, anorexia, diarreia, letargia, hipertensão e prurido^{34,60,73}. A boa tolerância deste medicamento em um estudo clínico foi descrito por JOST et al.³⁴, em 2006, que observaram sua rápida absorção com eliminação por via biliar e fecal.

Tem sido sugerido também que o PTK/ZK pode ter uma ação antimetastática devido à redução de vascularização do tumor primário levando à diminuição de rotas escapatórias para células metastáticas⁷⁷.

Em tumores malignos como o carcinoma espinocelular de boca, o efeito antiangiogênico do PTK/ZK foi estudado por YAZICI et al.⁷⁹, em 2005, em associação com um outro medicamento quimioterápico (CPT-11) em um modelo ortotópico de camundongo atímico. Os resultados demonstraram que a associação destas drogas reduziu significativamente o crescimento tumoral e a sobrevida dos animais. O PTK/ZK sozinho ou a terapia combinada resultou em apoptose de células tumorais e endoteliais associadas ao tumor. Os autores sugeriram que a tirosina quinase do VEGFR pode ser um alvo para a terapêutica efetiva no tratamento do carcinoma espinocelular de língua⁷⁹.

De acordo com esta revisão de literatura, embora muitos trabalhos estejam sendo realizados para a compreensão do mecanismo de ação de drogas antiangiogênicas como o PTK/ZK, ainda não está totalmente claro a via de sinalização específica deste medicamento, principalmente em tumores sólidos malignos como o carcinoma espinocelular.

3 – Proposição

3 – PROPOSIÇÃO

A partir do estudo da angiogênese em carcinomas espinocelulares desenvolvido com células endoteliais e tumorais cultivadas *in vitro* e posteriormente, implantadas em camundongos imunodeprimidos, tratados com um inibidor de receptores de VEGF (PTK/ZK), propôs-se:

1. avaliar o efeito do PTK/ZK na expressão de Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1 em células tumorais e endoteliais humanas *in vivo* e *in vitro*;
2. analisar o efeito do PTK/ZK na densidade vascular destes tumores implantados em camundongos;
3. contribuir com a compreensão do mecanismo de ação antiangiogênica deste medicamento como terapêutica adjuvante no tratamento do carcinoma espinocelular em humanos.

4 – Material e Métodos

4 – MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação do efeito do PTK/ZK, um potente inibidor de receptores de VEGF, na via canônica de angiogênese, isto é, Bcl-2, CXCL-8 e CXCL1, foi desenvolvido em dois experimentos – um *in vitro* e outro *in vivo* – utilizando-se duas linhagens de células de carcinoma espinocelular (OSCC-3 e UM-SCC-17B) previamente isoladas de pacientes, e uma linhagem de células endoteliais dérmicas de vasos sangüíneos humanos (HDMEC). A linhagem de OSCC-3 foi isolada de um carcinoma espinocelular primário de boca onde o paciente foi clinicamente estadiado como T₂N₀M_x. A linhagem de UM-SCC-17B foi isolada de paciente com metástase regional de carcinoma espinocelular de laringe⁷.

4.1 – AMOSTRA

No estudo *in vitro* foram realizadas co-culturas de célula tumoral (OSCC-3 ou UM-SCC-17B) e célula endotelial (HDMEC) tratadas ou não com PTK/ZK cedido pela Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland).

Para o estudo *in vivo* utilizou-se camundongos imunodeprimidos (SCID – *Severe combined immunodeficiency* – CB.17.SCID, Taconic, Germantown, NY, EUA) que receberam os co-implantes de células tumorais (OSCC-3 ou UM-SCC-17B) e/ou endoteliais.

As células tumorais utilizadas nos experimentos *in vivo* foram linhagens de células tumorais transfectadas com luciferase OSCC-3-Luc e UM-SCC-17B-Luc. Estas células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA) e selecionadas com Sulfato de G418 (#200398, Stratagene, Cedar Creek, TX, EUA) previamente ao implante.

Os grupos experimentais foram divididos em:

1. Grupo 1: OSCC-3-Luc+HDMEC – PTK/ZK – camundongos que receberam co-implantes de células tumorais e endoteliais tratados com PTK/ZK;
2. Grupo 2: OSCC-3-Luc+HDMEC – controle – camundongos que receberam co-implantes de células tumorais e endoteliais;
3. Grupo 3: UM-SCC-17B-Luc+HDMEC – PTK/ZK – camundongos que receberam co-implantes de células tumorais e endoteliais tratados com PTK/ZK;
4. Grupo 4: UM-SCC-17B-Luc+HDMEC – controle – camundongos que receberam co-implantes de células tumorais e endoteliais;
5. Grupo 5: HDMEC – PTK/ZK – camundongos que receberam implantes de células endoteliais tratados com PTK/ZK;
6. Grupo 6: HDMEC – controle – camundongos que receberam implantes de células endoteliais.

4.2 – EXPERIMENTOS *IN VITRO*

4.2.1 – Co-cultura de células tumorais e endoteliais

Células endoteliais microvasculares (Human Dermal Microvascular Endothelial Cells - HDMEC) (Cambrex, Walkersville, MD, USA) foram co-cultivadas com células de carcinoma espinocelular humano (UM-SCC-17B, doado por T. Carey, e OSCC-3, doado por M. Lingen) em meio de crescimento EGM2-MV, Cambrex. Foram utilizadas 5×10^4 células endoteliais na parte inferior de placa de 6 poços (Multiwell® 6 well, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) e 10×10^4 células tumorais na parte superior (Cell culture insert 1.0µm pore size, polyethylene terephthalate track-etched membrane, 6 well format membrane, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA). No dia seguinte à sementeiras das células, as mesmas foram tratadas com 100nM de PTK/ZK (Novartis/Shering AG; Basel, Switzerland), ou veículo como controle (DMSO; Sigma, St. Louis, MO, EUA), e após 24 horas, foi coletado o sobrenadante e extraídos proteína e RNA das células. Foram executados quatro experimentos independentes em triplicata por condição.

4.2.2 – Teste ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

O sobrenadante coletado das co-culturas de células tumorais e endoteliais foi utilizado para se quantificar a expressão de CXCL-8 e CXCL-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) pelo teste ELISA seguindo-se as orientações do fabricante.

4.2.3 – *Western Blot*

A proteína total das células tumorais (OSCC-3 e UM-SCC-17B) e endoteliais (HDMEC) co-cultivadas foi obtida após 24 horas do tratamento com PTK/ZK e colocada em gel de eletroforese de poliacrilamida sendo as membranas incubadas *overnight* a 4°C com os seguintes anticorpos: policlonal anti-Bcl-2 humano (#51-1513 GR, BD Pharmingen, San Jose, California, EUA, diluição 1:1000), policlonal anti-CXCL-8 humano (#AF-208-NA, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA, diluição 1:2000), policlonal anti-CXCL-1 humano (#MAB276, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA, diluição 1:1000), monoclonal anti-GAPDH humano (#MAB374, Chemicon International, Temecula, CA, EUA, diluição 1:500.000). As membranas foram incubadas por uma hora com o respectivo anticorpo secundário a uma diluição de 1:10000. As proteínas foram visualizadas com o kit de detecção de luminescência (Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate; PIERCE, Rockford, IL, EUA).

4.2.4 – Reação em cadeia da DNA polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR)

A expressão de Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1 foi avaliada por meio da reação em cadeia da DNA polimerase (RT-PCR) no RNA total das células tumorais e endoteliais obtidas nas co-culturas de UM-SCC-17B/HDMEC e OSCC-3/HDMEC. Este RNA foi extraído com o reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

O produto amplificado das reações foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 2% com brometo de etídio.

4.2.5 – Expressão de VEGFR-1 e VEGFR-2 nas células endoteliais HDMEC e tumorais OSCC-3 e UM-SCC-17B

A. Western Blot

Para a avaliação da expressão de VEGFR-1 e VEGFR-2 nas células OSCC-3, UM-SCC-17B e HDMEC foram utilizados anticorpos policlonais anti-VEGFR-1 humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA, diluição de 1:2000) e anti-VEGFR-2 humano (C-1158, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA, diluição de 1:2000), e o anticorpo secundário, a uma diluição de 1:10000. A execução da técnica encontra-se descrita no item 4.2.3.

B. Reação em cadeia da DNA polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR)

A avaliação da expressão de VEGFRs nas células utilizadas neste estudo (OSCC-3, UM-SCC-17B e HDMEC) foi realizada pela reação de RT-PCR para VEGFR-1 e VEGFR-2 em células cultivadas *in vitro* isoladamente e não tratadas com PTK/ZK. Os primers utilizados foram VEGFR-1, sense GTTCAAGGAACCTCGGACAA e anti-sense GCTCACACTGCTCATCCAAA; VEGFR-2, sense CTCATGTCTGAACTCAAGATCC e anti-sense CCAGAATCCTCTTCCATGCTCA. A técnica de RT-PCR foi executada conforme descrito no item 4.2.4.

4.3 – EXPERIMENTOS *IN VIVO*

4.3.1 – Modelo de angiogênese tumoral humana em camundongos imunodeprimidos (Severe combined immunodeficiency - SCID)

Para a realização dos experimentos *in vivo* seguiu-se o modelo de angiogênese tumoral desenvolvido por NÖR et al.⁵⁶ em 2001. Neste modelo, esponjas de ácido poli-L-lático hidratadas em etanol, são semeadas com células tumorais e/ou endoteliais implantadas no subcutâneo de dorso de camundongos imunodeprimidos.

Três a seis camundongos imunodeprimidos do tipo SCID (*Severe combined immunodeficiency* - CB.17.SCID, Taconic, Germantown, NY, EUA) machos de 5 a 7 semanas de idade foram anestesiados com uma mistura de Ketamina e Xilazina, e receberam dois co-implantes semeados com 9×10^5 células endoteliais microvasculares humanas (HDMEC) e 1×10^5 células tumorais OSCC-3-Luc ou UM-SCC-17B-Luc. O grupo de implantes de células endoteliais recebeu quatro implantes 10×10^5 HDMEC. As células utilizadas nos co-implantes de OSCC-3-Luc+HDMEC e UM-SCC-17B-Luc+HDMEC, foram previamente ressuspensas em 36µL de meio de cultura próprio para células endoteliais, EGM2-MV, e Matrigel (Collaborative Biomedical Products, Cambridge, MA, EUA) na proporção de 1:1, incubadas por 30 minutos a 37°C para gelatinização do Matrigel.

A partir do primeiro dia pós-operatório e por um período de 21 dias, os camundongos dos grupos 1, 3 e 5 foram medicados com 50mg/Kg de PTK/ZK via oral, e os dos grupos 2, 4 e 6 (controles) receberam o veículo da droga (PGE 300) no mesmo volume. O PTK/ZK foi generosamente cedido pela Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland) sendo preparada uma solução na concentração de 10mg/mL utilizando-se como solvente o polietileno glicol (PGE 300, Fluka BioChemika, Steinheim, Germany).

Ao final do experimento, os animais foram sacrificados seguindo-se as normas da Comissão de Ética em pesquisa de animais da Universidade de Michigan (University of Michigan Committee on Use and Care of Animals – UCUCA). Em seguida, os implantes foram removidos, medidos com paquímetro, pesados em balança eletrônica, fixados em formalina tamponada 10%. Cada implante foi seccionado transversalmente em três partes iguais

visando a obtenção de uma área representativa para análise de densidade microvascular. Depois os implantes foram transferidos para uma solução de etanol 70%, e submetidos aos procedimentos histotécnicos para inclusão em parafina, obtendo-se um único bloco contendo as três partes do implante. Cortes de 3µm foram obtidos, corados em hematoxilina e eosina, e imunomarcados para Fator VIII sendo posteriormente utilizados para análise da densidade vascular. Para a técnica de microdissecção a laser visando a extração de RNA de células tumorais e endoteliais utilizou-se cortes de 7µm do mesmo material montados em lâminas próprias para esta técnica (Leica n# 11505 158 – Membrane Slides; PEN – Membrane 20µm, Bannockburn, IL, EUA).

4.3.2 – Imagem de bioluminescência

Para se acompanhar a progressão tumoral *in vivo*, foi realizada a imagem de bioluminescência nos co-implantes OSCC-3-Luc+HDMEC e UM-SCC-17B-Luc+HDMEC nos dias experimentais 14 e 21 após o início da administração de PTK/ZK. O procedimento foi realizado em um sistema IVIS™ refrigerado criogenicamente acoplado a um software para obtenção dos dados (Xenogen).

Previamente à obtenção da imagem de bioluminescência, os camundongos imunodeprimidos foram anestesiados com isoflurano 2% por inalação, e administrou-se intraperitonealmente 320mg/Kg de peso de luciferina potássica dissolvida em PBS. Em seguida, foram colocados sobre uma cama térmica na câmara IVIS™ e a anestesia foi mantida nasalmente por um sistema de cone. Oito minutos após a injeção de luciferina, obteve-se uma imagem em escala de tom cinza, seguida de aquisição e sobreposição de imagem pseudo-colorida representativa da emissão de fluorescência ativa nas células tumorais OSCC-3-Luc ou UM-SCC-17B-Luc implantadas. Utilizou-se um tempo de integração de 30 segundos para a aquisição da luminescência. As imagens foram analisadas pelo software *Living-Image* e a intensidade do brilho da

região (*Region of Interest* – ROI) correspondente aos implantes foi medida na unidade fotons/segundo.

4.3.3 – Imuno-histoquímica para Fator VIII e análise de densidade vascular

Os cortes obtidos dos implantes foram desparafinizados e incubados *overnight* a 4°C com anticorpo policlonal anti-Fator VIII humano (Lab Vision Corp., Fremont, CA, EUA, diluição 1:500) seguindo-se a técnica padrão de imuno-histoquímica da estreptavidina-biotina peroxidase. Em seguida utilizou-se o kit HRP-AEC (DakoCytomation EnVision+ System, Dako, Cytomation Inc., Carpinteria, CA, EUA) para incubação com anticorpo secundário e a visualização da reação antígeno-anticorpo. O número de vasos sangüíneos imunomarcados em cada implante foi determinado em 10 campos microscópicos aleatórios utilizando-se um microscópio de luz (Axioskop, Zeiss, Germany) com objetiva de 10X. O número médio de vasos sangüíneos quantificados em 120 campos microscópicos e obtido para cada grupo experimental e controle respectivo foi estatisticamente comparado.

4.3.4 – Imuno-histoquímica para Fator VIII e técnica de microdissecção a laser (LCM)

As células endoteliais foram identificadas pela técnica de imuno-histoquímica para Fator VIII. Os cortes microscópicos de 7µm obtidos dos implantes dos diferentes grupos experimental e controle foram desparafinizados e hidratados por meio de soluções de concentrações gradativas de etanol a 4°C. A recuperação antigênica foi realizada com tripsina e o bloqueio da atividade da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3%. Foi realizada incubação com o anticorpo primário para anti-Fator VIII humano (Lab Vision Corp., Fremont, CA, EUA, diluição 1:100) por 60 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com anti-IgG biotinilado de camundongo (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA, diluição 1:500), e

complexo estreptavidina-biotina peroxidase (Elite ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) por 60 minutos. A reação cromógena foi desenvolvida pela solução de diaminobenzidina-H₂O₂ (DAB Substrate kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). As lâminas imunomarcadas para Fator VIII foram conservadas a 4°C para a secagem, sendo, posteriormente, utilizadas para a técnica de LCM.

Para a coleta de células endoteliais e tumorais perivasculares dos implantes pela técnica de microdissecção a laser (*Laser Capture Microscopy* - LCM) utilizou-se microscópio modelo LMD6000 (Leica AS LMD Laser Microdissection Microscope, Leica Microsystems Inc D-355578 Wetzlar, Germany). Foram recortados aproximadamente seis implantes de cada grupo experimental e controle para a obtenção das células endoteliais e tumorais. Em seguida, realizou-se a extração de RNA das células endoteliais e tumorais coletadas, síntese de cDNA e reação de transcriptase reversa (RT-PCR) como descrito na sequência abaixo.

4.3.5 – Reação em cadeia da DNA polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) para LCM

A expressão de Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1 foi avaliada por meio de RT-PCR no RNA total das células tumorais e endoteliais obtidas pela técnica de LCM dos experimentos *in vivo*.

O RNA total foi extraído das células tumorais e endoteliais dos cortes de tecido parafinizados utilizando-se o reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), e purificado com RNeasy Mini kit® (Qiagen, Valencia, CA, EUA) de acordo com orientações do fabricante.

Para a reação de RT-PCR da amostra obtida dos tecidos parafinizados, executou-se a síntese do cDNA com reagentes de transcrição reversa TaqMan® (TaqMan® Reverse Transcription Reagents, Applied Biosystems, Branchburg, NJ, EUA). A amplificação de PCR foi realizada em tubos separados utilizando-se simultaneamente primers para Bcl-2, CXCL-8 ou CXCL-1 humanos juntamente com um conjunto para desidrogenase

gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH) com SuperScript One-step® e Platinum Taq kit® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para RT-PCR. Para a amplificação da PCR utilizaram-se os mesmos primers descritos anteriormente (item 4.2.5B) para o experimento *in vitro*.

4.3.6 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

O cDNA obtido das células tumorais e endoteliais extraídos a partir da técnica de LCM foi submetido à reação em cadeia da polimerase em tempo real. Sondas e primers de TaqMan® Gene Expression Assays (Assay ID: Bcl-2, Hs00608023_m1; CXCL-8, Hs00174103_m1; CXCL-1, Hs00605382_gH; 18S, Hs99999901_s1) foram obtidos da Applied Biosystems. Preparou-se uma mistura de 0.02µg de RNA total por 30µL de mistura da reação com TaqMan® Universal PCR Master Mix (TaqMan® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, Branchburg, NJ, EUA). Para o RNA padrão, utilizou-se TaqMan® One-step RT-PCR Master Mix Reagents (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, EUA). As reações foram realizadas em uma placa de reação de 96 tubos analisados pelo sistema de detecção ABI7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Todas as reações foram realizadas em triplicata, contendo um controle positivo e outro negativo.

4.4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação dos dados obtidos nos implantes dos experimentos *in vivo* dos grupos experimental e controle referentes a peso, volume e densidade vascular, bem como a expressão relativa de Bcl-2 em PCR em tempo real, foi realizada aplicando-se testes T ou análise univariada de ANOVA com o programa SigmaStat 2.0 (SPSS; Chicago, IL, USA). Os níveis de significância foram estabelecidos em 5%.

5 – Resultados

5 – RESULTADOS

Os resultados obtidos do efeito do PTK/ZK nos carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço serão apresentados em duas partes:

- experimentos *in vitro*;
- experimentos *in vivo*.

5.1 – EXPERIMENTOS *IN VITRO*

5.1.1 – Expressão de Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1 em co-cultura de células endoteliais e tumorais

A. Teste ELISA

A presença das citocinas CXCL-8 e CXCL-1 secretadas pelas células foi quantificada pelo teste ELISA a partir do sobrenadante coletado das co-culturas de UM-SCC-17B ou OSCC-3 com HDMEC.

A concentração média de CXCL-8 na presença de 100nM de PTK/ZK foi de $3528 \pm 315,8$ pg/mL para co-cultura de UM-SCC-17B/HDMEC, e de $1652 \pm 344,9$ pg/mL para co-cultura de OSCC-3/HDMEC (Figura 3). Nos grupos não tratados com PTK/ZK (controles) UM-SCC-17B/HDMEC e OSCC-3/HDMEC, a concentração média de CXCL-8 foi de $4167 \pm 367,7$ pg/mL e $2048 \pm 25,9$ pg/mL, respectivamente (Figura 3).

A expressão de CXCL-1 nas células tumorais e endoteliais, submetidas ao tratamento com 100nM de PTK/ZK apresentou concentração média de $5000 \pm 168,1$ pg/mL na co-cultura de UM-SCC-17B/HDMEC, e de $855 \pm 180,3$ pg/mL na co-cultura de OSCC-3/HDMEC (Figura 4). Nas co-culturas não tratadas (controles) as concentração médias de CXCL-1 foram de 5644 ± 528 pg/mL na UM-SCC-17B/HDMEC e $1178 \pm 71,5$ pg/mL para OSCC-3/HDMEC (Figura 4).

A concentração média de CXCL-8 e CXCL-1 secretada por esta interação entre células endoteliais e tumorais observada no teste ELISA revelou uma tendência a uma menor expressão destas citocinas quando estas células são expostas à presença de PTK/ZK.

Observou-se também que na co-cultura de células UM-SCC-17B/HDMEC tratada ou não com PTK/ZK, a concentração das citocinas CXCL-8 e CXCL-1 foi maior do que na co-cultura de células OSCC-3/HDMEC.

FIGURA 3: Concentração média de CXCL-8 determinado pela reação de ELISA realizada nas co-culturas de células de carcinoma espinocelular e endoteliais (17B-HDMEC e OSCC-3/HDMEC), tratadas (PTK/ZK) ou não (Controle) com 100nM de PTK/ZK.

FIGURA 4: Concentração média de CXCL-1 determinado pela reação de ELISA realizada nas co-culturas de células de carcinoma espinocelular e endoteliais (17B-HDMEC e OSCC-3/HDMEC), tratadas (PTK/ZK) ou não (Controle) com 100nM de PTK/ZK.

B. Western Blot e RT-PCR

Os métodos aplicados para a análise de expressão de Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1 em nível de mRNA e proteína nas células tumorais e endoteliais utilizadas nos experimentos *in vitro* foram RT-PCR e *Western Blot*, respectivamente. Para se interpretar os resultados *in vitro* de RT-PCR e *Western Blot* (Figura 5), a célula da co-cultura avaliada está representada fora dos parênteses e a contra-parte co-cultivada correspondente encontra-se representada entre parênteses.

Na co-cultura de UM-SCC-17B/HDMEC tratada com 100nM de PTK/ZK, as células endoteliais apresentaram redução na expressão de Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1 em nível de mRNA, sendo mais acentuada para Bcl-2 (Figura 5A-lado esquerdo) quando comparado aos respectivos grupos controle. Nas células tumorais UM-SCC-17B do grupo tratado com PTK/ZK observou-se uma redução na expressão de todos estes genes, porém, mais acentuada em relação a CXCL-8 (Figura 5A-lado esquerdo).

Ao verificar a expressão de Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1 em nível de proteína nas co-culturas de UM-SCC-17B/HDMEC, notou-se redução da expressão de Bcl-2, o que foi próxima à redução de mRNA tanto em célula endotelial quanto em célula tumoral. Não houve expressão de CXCL-1 em ambas as linhagens de celulares (5A-lado direito), e a expressão da proteína CXCL-8 na co-cultura UM-SCC-17B/HDMEC no grupo tratado com PTK/ZK foi reduzida nas células endoteliais e ausente nas tumorais (Figura 5A-lado direito) em relação ao grupo controle.

No grupo de co-cultura de OSCC-3/HDMEC, as células endoteliais apresentaram redução na expressão de Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1 em nível de mRNA. Entretanto, as células tumorais OSCC-3 apresentaram um aumento da expressão de Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1, se comparados aos grupos controles (Figura 5B-lado esquerdo).

Em relação a expressão protéica nos grupos tratados com PTK/ZK observou-se uma pequena redução na expressão de Bcl-2 nas células tumorais (OSCC-3), e de CXCL-8 nas células endoteliais (HDMEC) quando comparados ao grupo controle (Figura 5B-lado direito). As células endoteliais e tumorais expostas a PTK/ZK apresentaram discreto aumento na expressão protéica de

Bcl-2 e CXCL-8, respectivamente (Figura 5B-lado direito). A expressão de CXCL-1 em nível protéico não pode ser observada nas células endoteliais e tumorais da co-cultura de OSCC-3/HDMEC (Figura 5B-lado direito).

A

B

FIGURA 5: Expressão de Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1 em nível de mRNA (lado esquerdo) e proteína (lado direito) nas co-culturas de UM-SCC-17B/HDMEC (A) e OSCC-3/HDMEC (B) tratadas ou não (Controle) com 100nM de PTK/ZK. As expressões relativas representadas nesta figura foram normalizadas pelo GAPDH. Para se analisar os resultados *in vitro*, a célula avaliada está representada fora dos parênteses e a célula correspondente co-cultivada encontra-se representada entre parênteses.

5.1.2 – Expressão de VEGFR-1 e VEGFR-2 nas células endoteliais (HDMEC) e células tumorais (UM-SCC-17B e OSCC-3)

A presença da expressão de VEGFR-1 e VEGFR-2 nas células endoteliais e tumorais foi analisado por meio de RT-PCR (Figura 6A) e *Western Blot* (Figura 6B). Os resultados demonstraram a presença destes receptores nas células de endoteliais (HDMEC), porém ausência em ambas as linhagens de células tumorais (UM-SCC-17B e OSCC-3) (Figura 6).

FIGURA 6: Avaliação da presença de VEGFR-1 e VEGFR-2 em nível de RNA por meio de RT-PCR (A) e de proteína por meio de *Western Blot* (B) demonstrando a presença destes receptores nas células endoteliais (HDMEC), e ausência das mesmas nas células de carcinoma espinocelular (UM-SCC-17B e OSCC-3) utilizadas neste estudo. GAPDH = Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

Como os experimentos *in vitro* apresentam algumas limitações para se reproduzir o complexo microambiente da relação entre células endoteliais e tumorais, foram realizados estudos *in vivo* visando caracterizar o efeito inibidor de PTK/ZK na angiogênese tumoral a partir da avaliação da densidade vascular e da expressão de Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1.

5.2 – EXPERIMENTOS *IN VIVO*

5.2.1 – Modelo de angiogênese tumoral humana em camundongos imunodeprimidos (*Severe combined immunodeficiency - SCID*)

A bioluminescência realizada nos camundongos com co-implantes OSCC-3-Luc+HDMEC pode ser observada na Figura 7.

FIGURA 7: Camundongos imunodeprimidos com co-implantes de OSCC-3-Luc+HDMEC submetidos à imagem de bioluminescência após 14 e 21 dias do início da administração de PTK/ZK (A) com o respectivo gráfico da leitura de luminescência dos grupos tratados ou não com PTK/ZK (B). ROI=luminescência da região de interesse.

p = significativo para $p < 0.05$

Os camundongos SCID que receberam co-implantes de OSCC-3+HDMEC-Luc ou UM-SCC-17B-Luc+HDMEC ou apenas HDMEC foram medicados com PTK/ZK durante 21 dias. Ao término do experimento, os implantes foram retirados pesados e medidos.

O volume médio dos implantes nos grupos tratados com PTK/ZK foi de $929,9 \pm 771,2 \text{ mm}^3$ para o Grupo 1 (OSCC-3-Luc+HDMEC – PTK/ZK), $83,4 \pm 42,9 \text{ mm}^3$ para o Grupo 3 (UM-SCC-17B-Luc+HDMEC – PTK/ZK), e $33,1 \pm 9,5 \text{ mm}^3$ para o Grupo 5 (HDMEC – PTK/ZK) como pode ser observado na Figura 8.

Os grupos controles apresentaram volume médio de $1972,1 \pm 1773,6\text{mm}^3$ (Grupo 2 - OSCC-3-Luc+HDMEC – controle), $90,4 \pm 27,5\text{mm}^3$ (Grupo 4 - UM-SCC-17B-Luc+HDMEC – controle) e $39,5 \pm 7,5\text{mm}^3$ (Grupo 6 - HDMEC – controle) (Figura 8). O peso médio dos implantes foi de $820 \pm 660\text{mg}$ para o Grupo 1, $89,7 \pm 38,5\text{mg}$ para o Grupo 3, $37,4 \pm 5,9\text{mg}$ para o Grupo 5 (Figura 8). No grupo controle, os pesos médios foram de $1620 \pm 1130\text{mg}$ para o Grupo 2, $84,1 \pm 21,8\text{mg}$ para o Grupo 4 e $47 \pm 10,3\text{mg}$ para o Grupo 6 (Figura 8).

A diferença de peso entre os implantes de HDMEC tratados com PTK/ZK e controle foi estatisticamente significativa ($p=0,011$), como pode ser visualizado na Figura 8B.

FIGURA 8: Volume e peso médios dos implantes, retirados após 21 dias, dos grupos tratados com PTK/ZK e controle que receberam células UM-SCC-17B-Luc+HDMEC (17B-HDMEC) (A e B), HDMEC (A e B), e para o grupo OSCC-3-Luc+HDMEC retirados após 28 dias (C e D).

p = significativo para $p < 0,05$

O aspecto macroscópico dos implantes nos diferentes grupos experimentais e controle pode ser visualizado na Figura 9. No momento da retirada dos implantes observou-se uma coloração mais esbranquiçada nos grupos tratados com PTK/ZK, e mais avermelhada nos respectivos grupos controles (Figura 9).

FIGURA 9: Aspecto macroscópico dos implantes subcutâneos dorsais de células UM-SCC-17B-Luc+HDMEC (17B+HDMEC) (A e B), HDMEC (C e D) e OSCC-3-Luc+HDMEC (E e F) em animais tratados (A, C e E) ou não (B, D e F) com PTK/ZK onde se observa a diferença na coloração dos implantes quando comparados os grupos experimentais e controle.

O aspecto microscópico dos implantes de UM-SCC-17B-Luc+HDMEC, OSCC-3-Luc+HDMEC e HDMEC nos grupos tratados com PTK/ZK e controle podem ser visualizadas na Figura 10. Os cortes microscópicos nos grupos controles revelaram vasos mais calibrosos quando comparados aos grupos tratados com o medicamento. Notou-se ainda presença de intenso infiltrado inflamatório crônico caracterizado, principalmente, por macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias (Figura 10).

FIGURA 10: Aspecto microscópico dos implantes subcutâneos dorsais de células 17B-Luc+HDMEC (A e B), HDMEC (C e D) e OSCC-3-Luc+HDMEC (E e F) tratados (A, C e E) ou não (B, D e F) com PTK/ZK destacando-se a presença de vasos sanguíneos e de células inflamatórias mononucleares. (HE aumento original 400X)

5.2.2 – Imuno-histoquímica para Fator VIII e análise de densidade vascular

A análise da densidade de vasos sangüíneos imunomarcados com Fator VIII ou fator de von Willebrand nos implantes de OSCC-3-Luc+HDMEC, UM-SCC-17B-Luc+HDMEC e HDMEC tratados (Grupos 1, 3 e 5) ou não (Grupos 2, 4 e 6) com PTK/ZK estão descritos nas Figuras 11 e 12.

O número médio de vasos sangüíneos no grupo OSCC-3-Luc+HDMEC tratado com PTK/ZK (Grupo 1) e controle (Grupo 2) $9,1 \pm 4,4$ e $17,6 \pm 8,8$, respectivamente. Para o grupo UM-SCC-17B-Luc+HDMEC (Grupo 3) tratado e controle (Grupo 4), $3,4 \pm 4,7$ e $7,3 \pm 8,2$, respectivamente. Nos implantes de HDMEC tratados com PTK/ZK (Grupo 5) e controle (Grupo 6) foi de, respectivamente, $12,4 \pm 5,8$ e $23,4 \pm 8,4$.

Um menor número de vasos sangüíneos, estatisticamente significativo ($p < 0,001$), nos grupos OSCC-3-Luc+HDMEC, UM-SCC-17B-Luc+HDMEC e HDMEC tratados com PTK/ZK, foi observado quando comparado aos respectivos grupos controles como observado na Figura 11.

FIGURA 11: Média das densidades vasculares para os grupos de implantes com 17B-Luc-HDMEC (após 21 dias), HDMEC (após 21 dias) e OSCC-3-Luc-HDMEC (após 28 dias) tratados ou não com PTK/ZK.

* p = significativo para $p < 0,05$

FIGURA 12: Aspecto microscópico dos implantes com coloração de imuno-histoquímica para Fator VIII representativos dos grupos 17B-Luc+HDMEC (após 21 dias, A e B), HDMEC (após 21 dias, C e D) e OSCC-3-Luc+HDMEC (após 28 dias, E e F) tratados (PTK/ZK) ou não (Controle) com PTK/ZK. (Imuno-histoquímica para Fator VIII, aumento original 400X)

5.2.3 – Imuno-histoquímica para Fator VIII e técnica de microdissecção a laser (*Laser Capture Microscopy – LCM*)

Na Figura 13, observam-se as células endoteliais e tumorais perivasculares de co-implantes de OSCC-3-Luc com HDMEC corados pela imuno-histoquímica para Fator VIII e que foram posteriormente coletadas por meio da técnica de LCM. Os implantes de HDMEC tiveram somente as células endoteliais coletadas por esta técnica.

A seqüência A, B e C ilustra um implante de OSCC-3-Luc+HDMEC apresentado vasos sangüíneos imunomarcados com Fator VIII (A), após a remoção do conteúdo do lume dos vasos sangüíneos (B), e a coleta das células endoteliais (C) pela técnica de LCM. A seqüência D e E demonstra, respectivamente, as células tumorais do implante de OSCC-3-Luc+HDMEC e após sua coleta pela técnica de LCM.

FIGURA 13: Imuno-histoquímica para Fator VIII realizado em implante de OSCC-3-Luc+HDMEC em lâmina preparada para técnica de LCM (A), com a retirada de conteúdo dos vasos sangüíneos (B) e posterior coleta de células endoteliais (C). Em D e E observam-se as células tumorais perivasculares de OSCC-3-Luc (D) e após sua remoção pela LCM (E). (Imuno-histoquímica para Fator VIII, aumento original 400X)

O RNA total das células endoteliais e tumorais dos implantes de UM-SCC-17B-Luc+HDMEC, OSCC-3-Luc+HDMEC e HDMEC obtidas a partir da técnica de LCM foi submetido à técnica de RT-PCR e reação de PCR em tempo real para Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1.

A RT-PCR demonstrou que os co-implantes de UM-SCC-17B-Luc+HDMEC e OSCC-3-Luc+HDMEC tratados com PTK/ZK apresentaram uma redução significativa na expressão de mRNA de Bcl-2 nas células endoteliais quando comparados com os respectivos controles. Porém, nos implantes de HDMEC esta redução não foi tão significativa na expressão deste gene (Figura 14). Por outro lado, as células tumorais OSCC-3-Luc apresentaram uma redução expressiva para Bcl-2, o que não se observou nas células UM-SCC-17B-Luc (Figura 14).

Notou-se também redução na expressão de CXCL-8 nas células tumorais dos co-implantes de OSCC-3-Luc+HDMEC, mas este fato não foi observado nos co-implantes de UM-SCC-17B-Luc+HDMEC (Figura 14). Nas células endoteliais co-implantadas com UM-SCC-17B-Luc não se detectou a presença de expressão de CXCL-8, mas houve redução desta expressão nos co-implantes de OSCC-3-Luc+HDMEC (Figura 14).

Em relação ao CXCL-1, sua expressão não foi detectada nas células tumorais e endoteliais (Figura 14).

A utilização da técnica de reação de PCR em tempo real para células endoteliais e tumorais retiradas dos co-implantes de UM-SCC-17B-Luc+HDMEC ou OSCC-3-Luc+HDMEC demonstrou redução na expressão relativa de Bcl-2, mas a expressão de outros genes como CXCL-8 e CXCL-1 não foi detectada por esta técnica (Figura 14).

FIGURA 14: RT-PCR para Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1 dos co-implantes de células endoteliais e tumorais UM-SCC-17B-Luc+HDMEC (A) e OSCC-3-Luc+HDMEC (B) e HDMEC (C), coletadas por técnica de LCM dos implantes subcutâneos dorsais de camundongos imunodeprimidos tratados (PTK/ZK) ou não (Controle) com PTK/ZK via oral. Em D observa-se a expressão relativa de Bcl-2 em células endoteliais co-implantadas com células tumorais OSCC-3-Luc (D) obtida pelo PCR em tempo real.

* p = significativo para $p < 0,05$

6 – *Discussão*

6 – DISCUSSÃO

As drogas antiangiogênicas têm se mostrado uma terapêutica promissora como adjuvante no tratamento de diferentes tipos de câncer humano^{18,35,38,73}. Uma das recentes drogas com ação antiangiogênica que encontra-se na fase I/II de testes clínicos, descoberta por WOOD et al.⁷⁷, em 2000, recebeu a denominação de PTK/ZK (Novartis/Shering AG; Basel, Switzerland).

Desde 2004 foi firmado um acordo de concessão da droga PTK/ZK para a realização de pesquisas relacionadas à angiogênese, entre a Novartis/Shering e o Laboratório de Pesquisa em Angiogênese da Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan, sob responsabilidade do Prof. Dr. Jacques E. Nör.

Em 2006, surgiu a oportunidade de desenvolvermos um estudo neste laboratório a partir da parceria entre a Faculdade de Odontologia de Bauru-USP e a School of Dentistry – University of Michigan. Um projeto de pesquisa foi então elaborado e desenvolvido visando investigar o mecanismo de ação antiangiogênico do PTK/KZ em linhagens de células malignas de carcinoma espinocelular de região de cabeça e pescoço, cultivadas *in vitro* e implantadas *in vivo*, utilizando-se o modelo experimental de angiogênese humana em camundongos imunodeprimidos descrito por NÖR et al.⁵⁶ em 2001. A seguir iremos descrever e discutir os resultados deste estudo pioneiro relacionado a ação do PTK/ZK em carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço desenvolvido junto à Universidade de Michigan.

Um dos principais fatores de crescimento indutores da angiogênese tumoral consiste no VEGF que por meio de seus receptores específicos VEGFRs⁴, presentes nas células endoteliais, estimulam a formação de novos vasos sanguíneos. A via angiogênica VEGF/VEGFRs em condições fisiológicas

ou patológicas está bem determinada, entretanto, os mecanismos de ação das drogas antiangiogênicas são variáveis.

O PTK/ZK foi descrito como um potente inibidor de VEGFRs e no presente estudo, procurou-se investigar principalmente seu efeito em duas linhagens de células malignas obtidas de pacientes com carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço, sendo uma de tumor primário (OSCC-3) e a outra de tumor metastático (UM-SCC-17B).

O comportamento *in vitro* das células malignas (OSCC-3 e UM-SCC-17B) e das células endoteliais (HDMEC) em co-culturas tratadas com PTK/ZK podem ser visualizados nas Figuras 3, 4 e 5.

Nestes experimentos *in vitro* as dosagens das citocinas CXCL-8 e CXCL-1, obtidas no sobrenadante das co-culturas de células malignas e endoteliais, por meio do teste ELISA, demonstrou uma tendência à redução da expressão de ambas citocinas quando submetidas ao tratamento com o PTK/ZK (Figuras 3 e 4). Notamos que a co-cultura de carcinoma espinocelular primário (OSCC-3/HDMEC) mostrou uma secreção de CXCL-8 e CXCL-1 marcadamente menor se comparada à co-cultura de carcinoma espinocelular metastático (UM-SCC-17B/HDMEC), tanto nos grupos controles como nos grupos tratados com PTK/ZK como pode ser observado nas Figuras 3 e 4.

Podemos inferir com base nestes resultados que as células de carcinomas espinocelulares metastáticas provavelmente secretam uma maior concentração das citocinas CXCL-8 e CXCL-1 do que as células malignas do carcinoma espinocelular primário. Estes resultados confirmam achados prévios que associaram as citocinas CXCL-8 e CXCL-1 à progressão do câncer humano e conseqüentemente a um maior risco de metástase^{46,72,74}. Atualmente, foi comprovado que particularmente CXCL-8 contribui para o crescimento tumoral não somente estimulando a proliferação da célula maligna mas também, induzindo direta ou indiretamente a angiogênese tumoral⁷².

No presente estudo, a expressão dos genes Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1 foi avaliada em nível de mRNA e proteína de cada linhagem celular separadamente, pois as co-culturas OSCC-3/HDMEC e UM-SCC-17B/HDMEC nos grupos tratados com PTK/ZK e controles foram cultivadas sem contato.

Nas células endoteliais em co-cultura de OSCC-3 ou UM-SCC-17B houve uma redução da expressão de Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1 em nível de

mRNA, quando submetidas ao tratamento com PTK/ZK. Em nível protéico, quando submetidas ao medicamento antiangiogênico, as células endoteliais nas co-culturas de carcinomas espinocelulares (OSCC-3 e UM-SCC-17B) mostraram redução de CXCL-8 enquanto que a citocina CXCL-1 não foi detectada. Em relação a expressão protéica de Bcl-2, nas células endoteliais tratadas com PTK/ZK e co-cultivadas com o carcinoma espinocelular primário (OSCC-3) houve um discreto aumento (Figura 5B), enquanto que naquelas também submetidas ao tratamento e co-cultivadas com o carcinoma espinocelular metastático (UM-SCC-17B) houve uma marcante redução (Figura 5A).

Estes resultados reforçam a ação antiangiogênica do PTK/ZK via bloqueio dos receptores de VEGF que foram detectados, no presente estudo, somente nas células endoteliais cultivadas e estavam ausentes nas células das linhagens de carcinoma espinocelular investigadas (Figura 6). O PTK/ZK ao bloquear o receptor de VEGF (especificamente VEGFR-2), presente nas células endoteliais, provavelmente interferiu diretamente na via de sinalização pró-angiogênica do PI3K/Akt como descrito na Figura 1. Nesta via de sinalização de acordo com GERBER et al.²⁸, e GERBER, DIXIT, FERRARA²⁷, e NÖR et al.^{54,55}, a expressão da proteína Bcl-2 desencadeada pela ligação do VEGF ao seu receptor específico (VEGFR-2) nas células endoteliais tem ação antiapoptótica aumentando a sobrevivência destas células, mas atua também como sinalizadora da cascata pró-angiogênica que induz a secreção de citocinas CXCL-8 e CXCL-1, resultando no aumento da angiogênese. Podemos então sugerir, baseados em nossos resultados, que o bloqueio do receptor de VEGF pelo PTK/ZK diminuiu a expressão de Bcl-2 e conseqüentemente, das citocinas CXCL-8 e/ou CXCL-1 nas células endoteliais reduzindo a angiogênese (Figura 5).

No presente estudo, a acentuada redução de Bcl-2 nas células endoteliais tratadas com PTK/ZK e co-cultivadas com UM-SCC-17B foi sempre acompanhada da redução de CXCL-8 tanto em nível de mRNA como em nível protéico, sugerindo que na linhagem de carcinoma espinocelular metastático a ação do PTK/ZK na via PI3K/Akt foi mais consistente.

Nas células tumorais do carcinoma espinocelular primário (OSCC-3) tratadas com PTK/ZK observamos, em nível de mRNA, um aumento da

expressão de Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1. Por outro lado, as células tumorais do carcinoma espinocelular metastático (UM-SCC-17B) mostraram, em nível de mRNA, uma redução discreta para a expressão de Bcl-2, moderada para CXCL-1 e mais marcante para CXCL-8 quando tratadas com PTK/ZK (Figura 5).

Em nível de proteína não foi possível detectar a presença de CXCL-1 em ambas linhagens de células tumorais (OSCC-3 e UM-SCC-17B). Para a citocina CXCL-8 um discreto aumento em nível protéico foi observado para a linhagem de carcinoma espinocelular OSCC-3, não sendo detectada sua presença na linhagem de célula tumoral UM-SCC-17B. Esta dificuldade na detecção da expressão protéica das citocinas CXCL-8 nas células UM-SCC-17B e CXCL-1 nas células tumorais e endoteliais estudadas pode ter ocorrido em função destas moléculas terem um baixo peso molecular (varia de 7 a 14kDa)^{32,69}, o que muitas vezes inviabiliza sua detecção tornando o resultado variável e pouco reproduzível.

Torna-se importante ressaltar que em nível de mRNA, tanto o aumento na expressão de Bcl-2 e das citocinas CXCL-8 e CXCL-1 detectado na linhagem de carcinoma espinocelular OSCC-3, como sua diminuição na linhagem UM-SCC-17B não pode ser associada diretamente ao tratamento com o PTK/ZK pois não detectamos a presença de receptores para VEGF (VEGFR-1 e VEGFR-2), principal alvo deste medicamento, nas células malignas como pode ser visualizado na Figura 6. Além disso, o aumento da expressão de mRNA de Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1 nas células malignas OSCC-3 (Figura 5) pode estar refletindo um comportamento inerente à célula tumoral, onde diversos oncogenes estão ativados na tentativa de se manter a viabilidade celular¹. Entretanto, nesta mesma linhagem de carcinoma espinocelular (OSCC-3) a expressão protéica de Bcl-2 não se mostrou aumentada (Figura 5). Está bem estabelecido que o aumento da expressão da proteína Bcl-2 evita a apoptose permitindo a sobrevivência de células tumorais¹. Entretanto, outros genes da família bcl, como os genes pró-apoptóticos Bax e Bak também regulam, quando ativados, o mecanismo da apoptose na célula tumoral. Portanto, a célula maligna pode receber tanto a instrução para sobreviver como para morrer³².

Em seguida, iremos discutir os resultados dos estudos *in vivo* realizados para uma melhor compreensão do comportamento das células endoteliais e tumorais frente à ação antiangiogênica do PTK/ZK.

O modelo de camundongos imunodeprimidos utilizado neste estudo foi originalmente descrito por NÖR et al.⁵⁶ em 2001, e tem-se mostrado adequado para a investigação de diferentes aspectos da angiogênese humana^{58,67,80}.

A evolução tumoral ao longo do tempo dos co-implantes de carcinomas espinocelulares e células endoteliais (OSCC-3-Luc+HDMEC ou UM-SCC-17B-Luc+HDMEC) foi acompanhada utilizando-se a imagem de bioluminescência (Figura 7). Notou-se por esta técnica que embora em alguns animais a dimensão dos tumores estivesse reduzida no grupo tratado com PTK/ZK quando comparado ao controle (Figura 7A), não foi possível se detectar diferença estatisticamente significativa pela imagem de bioluminescência entre os grupos controle e tratado no 14° e 21° dias após o tratamento com PTK/ZK (Figura 7B). Observou-se entretanto, que no 21° dia os implantes apresentavam um maior índice de luminescência se comparado ao 14° dia, indicando que esta metodologia pode ser aplicada para o acompanhamento experimental da progressão tumoral⁵⁸.

A análise de peso e volume dos co-implantes de OSCC-3-Luc+HDMEC e UM-SCC-17B-Luc+HDMEC não mostrou diferença estatística entre os grupos controles e tratados com PTK/ZK (Figura 8). Entretanto, no grupo de implantes de células endoteliais (HDMEC) os implantes do grupo controle apresentaram um maior peso se comparados àqueles do grupo tratado com PTK/ZK ($p=0,011$) (Figura 8).

A análise macroscópica demonstrou uma coloração mais esbranquiçada dos implantes OSCC-3-Luc+HDMEC, UM-SCC-17B-Luc+HDMEC e HDMEC nos grupos tratados com PTK/ZK quando comparados aos controles (Figura 9), sugerindo uma redução de vasos sanguíneos no interior dos implantes induzido pelo medicamento antiangiogênico. Microscopicamente, os vasos sanguíneos dos implantes dos grupos tratados com PTK/ZK se mostravam mais delicados e regulares e com menor calibre se comparados aos grupos controles (Figura 10), o que justifica a palidez inicialmente observada macroscopicamente nos implantes dos animais submetidos ao medicamento.

Quando realizamos a análise da densidade de vasos sangüíneos imunomarcados para Fator VIII observamos uma redução estatisticamente significativa em todos os grupos submetidos ao tratamento com PTK/ZK (Figura 11), o que confirma a ação antiangiogênica do medicamento descrita em outros estudos^{16,17,18,77}. A análise da microdensidade vascular tem sido freqüentemente utilizada em modelos experimentais para se avaliar a eficácia da terapêutica antiangiogênica^{16,45,79}. Entretanto, HLATKY, HAHNFELDT, FOLKMAN³⁰, em 2002, ressaltaram que a microdensidade vascular varia amplamente entre os tipos tumorais e que esta técnica deve ser cuidadosamente avaliada em conjunto com outras metodologias, como realizado no presente estudo, para se determinar a eficácia da terapêutica antiangiogênica.

A avaliação da expressão de Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1 *in vivo* nos implantes de OSCC-3-Luc+HDMEC, UM-SCC-17B-Luc+HDMEC e HDMEC foi realizada por meio de RT-PCR e PCR em tempo real, após a extração do RNA total de células endoteliais e tumorais obtidas isoladamente a partir da técnica de microdissecção a laser (LCM) como demonstrado na Figura 13. Uma das dificuldade encontradas na execução desta técnica foi o descolamento do endotélio das lâminas preparadas para LCM, o que pode ter ocorrido devido à realização prévia da imuno-histoquímica para marcação dos vasos sangüíneos. Além disso, a pequena quantidade do RNA obtido das células tumorais e endoteliais pela técnica de LCM, além de requerer um maior número de cortes microscópicos, exige uma criteriosa identificação dos vasos sangüíneos pelo pesquisador.

A avaliação da expressão de Bcl-2, CXCL-8 e CXCL-1 por meio de RT-PCR demonstrou que houve redução significativa na expressão de Bcl-2 nas células endoteliais tanto nos co-implantes OSCC-3-Luc+HDMEC e UM-SCC-17B+HDMEC quanto nos implantes de HDMEC (Figura 14), reafirmando os achados do estudo *in vitro* (Figura 5). A redução da expressão de Bcl-2 em implantes constituídos somente por células endoteliais não foi tão intensa quanto nos co-implantes quando tratados com PTK/ZK, o que sugere que o complexo microambiente tumoral influenciou no comportamento das células endoteliais e na suscetibilidade a esta droga.

Apesar dos esforços para se avaliar a expressão de CXCL-8 e CXCL-1 por meio de RT-PCR e PCR em tempo real, infelizmente isto não foi possível em algumas das amostras do estudo, provavelmente devido à qualidade do RNA de nosso material, uma limitação observada em nossos materiais parafinados.

O resultado mais consistente do estudo *in vivo* que comprova os achados *in vitro* refere-se à reação de PCR em tempo real para a análise da expressão Bcl-2 em células endoteliais de co-implantes OSCC-3-Luc+HDMEC, onde foi demonstrada uma redução significativa da sua expressão no grupo submetido ao tratamento com PTK/ZK quando comparado ao grupo controle (Figura 14). Este resultado confirma a ação do PTK/ZK na via VEGF/VEGFRs onde a redução da expressão de Bcl-2 interferiu na sinalização de PI3-K/Akt diminuindo a angiogênese.

Um interessante estudo experimental de LIU et al.⁴⁵, em 2005, demonstrou uma redução na expressão de Bcl-2 em células de carcinoma hepatocelular que expressavam VEGFR em animais submetidos ao tratamento com PTK/ZK. Este medicamento inibiu a proliferação tumoral de modo dose-dependente e também induziu estas células a entrarem em apoptose tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A resposta pró-apoptótica foi associada à diminuição da expressão de Bcl-2 e Bcl-x_L nas células malignas do carcinoma hepatocelular. Os autores sugeriram que PTK/ZK é um potente inibidor do crescimento tumoral em carcinoma hepatocelular tanto pelo efeito antiangiogênico quanto na proliferação e apoptose da célula tumoral. Entretanto, devemos ressaltar que a presença de receptores para VEGF parece ser variável entre os diferentes tipos de carcinoma espinocelular pois, contrariamente aos achados de LIU et al.⁴⁵, em 2005, as linhagens de carcinoma espinocelular de região de cabeça e pescoço que investigamos não apresentavam receptores para VEGF reforçando que a ação antiangiogênica do PTK/ZK, no presente estudo, deve ser atribuída basicamente ao seu efeito nas células endoteliais associadas ao tumor.

Uma análise geral de nossos resultados sustentam a hipótese de que a ação do PTK/ZK envolvendo a inibição de VEGF/VEGFR nas células endoteliais ocorre pela via de sinalização de PI3K/Akt, levando a uma redução na expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e, conseqüentemente, induzindo

menor expressão das citocinas pró-angiogênicas CXCL-8 e CXCL-1 (Figuras 5 e 14), o que resulta na diminuição da angiogênese tumoral (Figura 11).

Podemos ainda inferir que um desequilíbrio desta via de sinalização VEGF/VEGFR como o provocado pelo PTK/ZK poderia estar interferindo diretamente no fenômeno da *angiogenic switch* nos tumores retardando a transformação do fenótipo avascular para o vascular nas células endoteliais, o que contribui para a redução do crescimento dos carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço. Assim sendo, a inibição de VEGF/VEGFR-Bcl-2-citocinas CXC pode se tornar, no futuro, um alvo terapêutico importante na inibição da progressão tumoral.

Entretanto, mais estudos são necessários para a compreensão exata do mecanismo de ação do PTK/ZK nestas complexas vias de sinalizações antiangiogênicas para uma indicação segura e eficaz deste medicamento na terapêutica dos pacientes portadores de tumores malignos, particularmente nos carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço.

7 – Conclusões

7 – CONCLUSÕES

O estudo da angiogênese em carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço desenvolvido com células endoteliais e tumorais cultivadas *in vitro* e implantadas em camundongos imunodeprimidos tratados com PTK/ZK demonstrou:

1. uma redução importante da expressão de Bcl-2 em células endoteliais humanas *in vitro* e *in vivo*;
2. redução da expressão de CXCL-8 em células endoteliais *in vitro* bem como nas células endoteliais dos co-implantes de UM-SCC-17B-Luc+HDMEC *in vivo*;
3. uma redução significativa na densidade vascular dos implantes e co-implantes em camundongos imunodeprimidos.

Fundamentados nestes resultados, este estudo reforça o efeito antiangiogênico do inibidor do VEGFR tirosina quinase PTK/ZK, e sugere um provável mecanismo de atuação deste medicamento nas células endoteliais por meio da redução da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2. Esta redução na via de sinalização de Bcl-2 provoca uma diminuição da expressão da molécula pró-angiogênica CXCL-8, resultando numa menor densidade vascular e, conseqüentemente, menor crescimento tumoral.

Portanto, o PTK/ZK mostrou-se um medicamento com ação antiangiogênica eficaz em carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço e poderá, no futuro, ser utilizado como terapêutica adjuvante nos pacientes portadores destas neoplasias malignas.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;26(9):1324-37.
2. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marmé D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*. 1996;87(8):3336-43.
3. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, et al. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2000;68(1):1-8.
4. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):401-10.
5. Black WC, Welch HG. Advances in diagnostic imaging and overestimations of disease prevalence and the benefits of therapy. *N Eng J Med* 1993;328(17):1237-43.
6. Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-Oncol*. 2005;7(2):122-33.
7. Carey TE, Van Dyke DL, Worsham MJ, et al. Characterization of human laryngeal primary and metastatic squamous cell carcinoma cell lines UM-SCC-17A and UM-SCC-17B. *Cancer Res*. 1989;49(21):6098-6107.
8. Carmeliet P. Controlling the cellular brakes. *Nature*. 1999;401:657-8.

Referências bibliográficas seguindo-se as normas de Vancouver: Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication, do International Committee of Medical Journals Editors (ICMJE) – fevereiro de 2006.

9. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Med.* 2000;6(3):389-95.
10. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology.* 2005;69(suppl 3):4-10.
11. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000;407(6801):249-57.
12. Caunt M, Hu L, Tang T, Brooks PC, Ibrahim S, Karparkin S. Growth-regulated oncogene is pivotal in thrombin-induced angiogenesis. *Cancer Res.* 2006;66(8):4125-32.
13. Cébe-Suarez S, Zehnder-Fjällman A, Ballmer-Hofer K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(5):601-15.
14. Charalambous C, Pen LB, Su YS, Milan J, Chen TC, Hofman FM. Interleukin-8 differentially regulates migration of tumor-associated and normal human brain endothelial cells. *Cancer Res.* 2005;65(22):10347-54.
15. Clauss M, Weich H, Breier G, Kniest U, Röckl W, Waltenberger J, et al. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities – Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem.* 1996;271(30):17629-34.
16. Drevs J, Hofmann I, Hugenschmidt H, Wittig C, Madjar H, Müller M, et al. Effects of PTK787/ZK 222584, a specific vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, on primary tumor, metastasis, vessel density, and blood flow in a murine renal cell carcinoma model. *Cancer Res.* 2000;60(17):4819-24.

17. Dreys J, Müller-Driver R, Wittig C, Fuxius S, Esser N, Hugenschmidt H, et al. PTK787/ZK 222584, a specific vascular endothelial growth factor-receptor tyrosine kinase inhibitor, affects the anatomy of the tumor vascular bed and the functional vascular properties as detected by dynamic enhanced magnetic resonance imaging. *Cancer Res.* 2002;62(14):4015-22.
18. Dreys J, Zirrgiebel U, Schmidt-Gersbach CIM, Mross K, Medinger M, Lee L, et al. Soluble markers for the assessment of biological activity with PTK787/ZK 222584 (PTK/ZK), a vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) tyrosine kinase inhibitor in patients with advanced colorectal cancer from two phase I trials. *Ann Oncol.* 2005;16(4):558-65.
19. Elkin M, Orgel A, Kleinman HK. An angiogenic switch in breast cancer involves estrogen and soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(11):875-8.
20. Fan F, Wey JS, McCarty MF, Belcheva A, Liu W, Bauer TW, et al. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene.* 2005;24(16):2647-53.
21. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocr Rev.* 1997;18(1):4-25.
22. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9(6):669-76.
23. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature.* 2005;438(7070):967-74.
24. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New Engl J Med.* 1971;285(21):1182-6.

25. Folkman J. Angiogenesis and apoptosis. *Semin Cancer Biol.* 2003;13(2):159-67.
26. Fujisawa N, Hayashi S, Kurdowska A, Carr FK, Miller EJ. Inhibition of GRO α -induced human endothelial cell proliferation by the α -chemokine inhibitor antileukinate. *Cytokine.* 1999;11(3):231-8.
27. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1998;273(21):13313-6.
28. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *J Biol Chem.* 1998;273(46):30336-43.
29. Harmey JH, Bouchier-Hayes D. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: implications for anti-angiogenic therapy. *Bioessays.* 2002;24(3):280-3.
30. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(12):883-93.
31. Hess-Stump H, Haberey M, Thierauch KH. PTK787/ZK222584, a tyrosine kinase inhibitor of all known VEGF receptors, represses tumor growth with high efficacy. *Chembiochem.* 2005;6(3):550-7.
32. Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol.* 2002;72(5):847-55.
33. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastasis: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med.* 1995;1(2):149-53.

34. Jost LM, Gschwind HP, Jalava T, Wang Y, Guenther C, Souppart C, et al. Metabolism and disposition of Vatalanib (PTK787/ZK-222584) in cancer patients. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(11):1817-28.
35. Jubb AM, Oates AJ, Holden S, Koeppen H. Predicting benefit from anti-angiogenic agents in malignancy. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(8):626-35.
36. Karl E, Warner K, Zeitlin B, Kaneko T, Wurtzel L, Jin T, et al. Bcl-2 acts in a proangiogenic signaling pathway through Nuclear Factor- κ B and CXC chemokines. *Cancer Res.* 2005;65(12):5063-9.
37. Kendall RL, Wang G, DiSalvo J, Thomas KA. Specificity of vascular endothelial growth factor receptor ligand binding domains. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;201(1):326-30.
38. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis.* 2000;21(3):505-15.
39. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*. *Nature.* 1993;362:841-4.
40. Kitadai Y, Ellis LM, Takahashi Y, Bucana CD, Anzai H, Tahara E, et al. Multiparametric *in situ* messenger RNA hybridization analysis to detect metastasis-related genes in surgical specimens of human colon carcinomas. *Clin Cancer Res.* 1995;1(10):1095-1102.
41. Kitadai Y, Onogawa S, Kuwai T, Matsumura S, Hamada H, Ito M, et al. Angiogenic switch occurs during the precancerous stage of human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2004;11(2):315-9.

42. Kowanetz M, Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res.* 2006;12(17):5018-22.
43. Li A, Varney ML, Singh RK. Constitutive expression of growth related oncogene (*gro*) in human colon carcinoma cells with different metastatic potential and its role in regulating their metastatic phenotype. *Clin Exp Metastasis.* 2004;21(7):571-9.
44. Li A, Varney ML, Valasek J, Godfrey M, Dave BJ, Singh RK. Autocrine role of Interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis. *Angiogenesis.* 2005;8(1):63-71.
45. Liu Y, Poon RT, Li Q, Kok TW, Lau C, Fan ST. Both angiogenesis- and angiogenesis-independent effects are responsible for hepatocellular carcinoma growth arrest by tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584. *Cancer Res.* 2005;65(9):3691-9.
46. Loukinova E, Dong G, Enamorado-Ayalya I, Thomas GR, Chen Z, Schreiber H, et al. Growth regulated oncogene- α expression by murine squamous cell carcinoma promotes tumor growth, metastasis, leukocyte infiltration and angiogenesis by a host CXC Receptor-2 dependent mechanism. *Oncogene.* 2000;19(31):3477-86.
47. Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, et al. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 1999;18(2):363-74.
48. Millauer B, Longhi MP, Plate KH, Shawver LK, Risau W, Ullrich A, et al. Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types *in vivo*. *Cancer Res.* 1996;56(7):1615-20.

-
49. Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. Glioblastoma growth inhibited *in vivo* by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature*. 1994;367(6463):576-9.
50. Mooney DJ, Sano K, Kaufmann PM, Majahod K, Schloo B, Vacanti JP, et al. Long-term engraftment of hepatocytes transplanted on biodegradable polymer sponges. *J Biomed Mater Res*. 1997;37(3):413-20.
51. Moore BB, Arenberg DA, Stoy K, Morgan T, Addison CL, Morris SB, et al. Distinct CXC chemokines mediate tumorigenicity of prostate cancer cells. *Am J Pathol*. 1999;154(5):1503-12.
52. Muñoz-Chápuli R, Quesada AR, Medina MA. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(17):2224-43.
53. Naumov GN, Akslen LA, Folkman J. Role of angiogenesis in human tumor dormancy. *Cell Cycle*. 2006;5(16):1779-87.
54. Nör JE, Christensen J, Liu J, Peters M, Mooney DJ, Strieter RM, et al. Up-regulation of Bcl-2 in microvascular endothelial cells enhances intratumoral angiogenesis and accelerates tumor growth. *Cancer Res*. 2001;61(5):2183-8.
55. Nör JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol*. 1999;154(2):375-84.
56. Nör JE, Peters MC, Christensen JB, Sutorik MM, Linn S, Khan MK, et al. Engineering and characterization of functional human microvessels in immunodeficient mice. *Lab Invest*. 2001;81(4):453-63.

57. Pepper MS. Manipulating angiogenesis – From basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(4):605-19.
58. Pinsky MS, Song W, Dong Z, Warner K, Zeitlin B, Karl E, et al. Activation of iCaspase-9 in neovessels inhibits oral tumor progression. *J Dent Res.* 2006;85(5):436-41.
59. Ribatti D, Nico B, Crivelatto E, Roccaro AM, Vacca A. The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia.* 2007;21(1):44-52.
60. Roboz GJ, Giles FJ, List AF, Cortes JE, Carlin R, Kowalski M, et al. Phase 1 study of PTK787/ZK222584, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, for the treatment of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Leukemia.* 2006;20(6):952-7.
61. Roskoski Jr R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol.* doi: 10.1016/j.critrevonc.2007.01.006; 2007.
62. Rudin M, McSheehy PMJ, Allegrini PR, Rausch M, Baumann D, Becquet M, et al. PTK787/ZK222584, a tyrosine kinase inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor, reduces uptake of the contrast agent GdDOTA by murine orthotopic B16/BL6 melanoma tumours and inhibits their growth *in vivo*. *NMR Biomed.* 2005;18(50):308-21.
63. Schoenberger J, Grimm D, Kossmehl P, Infanger M, Kurth E, Eilles C. Effects of PTK787/ZK222584, a tyrosine kinase inhibitor, on the growth of a poorly differentiated thyroid carcinoma: an animal study. *Endocrinology.* 2004;145(3):1031-8.
64. Schraufstatter IU, Chung J, Burger M. IL-8 activates endothelial cell CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;280(6):L1094-1103.

-
65. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res.* 2006;312(5):549-60.
66. Sini P, Wyder L, Schnell C, O'Reilly T, Littlewood A, Brandt R, et al. The antitumor and antiangiogenic activity of vascular endothelial growth factor receptor inhibition is potentiated by ErbB1 blockade. *Clin Cancer Res.* 2005;11(12):4521-32.
67. Song W, Sun Q, Dong Z, Spencer DM, Nunez G, Nor JE. Antiangiogenic gene therapy: disruption of neovascular networks mediated by inducible caspase-9 delivered with a transcriptionally targeted adenoviral vector. *Gene Ther.* 2005;12(4):320-9.
68. Strieter RM, Kunkel SL, Elner VM, Martonyi CL, Koch AE, Polverini PJ, et al. Interleukin-8 – A corneal factor that induces neovascularization. *Am J Pathol.* 1992;141(6):1279-84.
69. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem.* 1995;270(45):27348-57.
70. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci.* 2005;109(3):227-41.
71. Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC- γ and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.* 2001;20(11):2768-78.
72. Takeda A, Stoeltzing O, Ahmad SA, Reinmuth N, Liu W, Parikh A, et al. Role of angiogenesis in the development and growth of liver metastasis. *J Surg Oncol.* 2002;9(7):610-6.

73. Thomas AL, Morgan B, Horsfield MA, Higginson A, Kay A, Lee L, et al. Phase I study of the safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of PTK787/ZK 222584 administered twice daily in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(18):1-10.
74. Ueda T, Shimada E, Urakawa T. Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: possible involvement of interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis. *J Gastroenterol*. 1994;29(4):423-9.
75. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell*. 1999;96:245-54.
76. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res*. 2000;60(2):203-12.
77. Wood J, Bold G, Buchdunger E, Cozens R, Ferrari S, Frei J, et al. PTK787/ZK222584, a novel and potent inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor tyrosine kinases, impairs Vascular Endothelial Growth Factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *J Cancer Res*. 2000;60(8):2178-89.
78. Yang ZF, Poon RTP, Liu Y, Lau CK, Ho DW, Tam KH, et al. High doses of tyrosine kinase inhibitor PTK787 enhance the efficacy of ischemic hypoxia for the treatment of hepatocellular carcinoma: dual effects on cancer cell and angiogenesis. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(9):2261-70.
79. Yazici YD, Kim S, Jasser SA, Wang Z, Carter KB, Bucana CD, et al. Antivascular therapy of oral tongue squamous cell carcinoma with PTK787. *Laryngoscope*. 2005;115(12):2249-55.

80. Zeitlin BD, Joo E, Dong Z, Warner K, Wang G, Nikolovska-Coleska Z, et al. Antiangiogenic effect of TW37, a small-molecule inhibitor of Bcl-2. *Cancer Res.* 2006;66(17):8698-8706.
81. Zips D, Eicheler W, Geyer P, Hessel F, Dörfler A, Thames HD, et al. Enhanced susceptibility of irradiated tumor vessels to vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibition. *Cancer Res.* 2005;65(12):5374-9.

Anexo

ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética em pesquisa de animais da Universidade de Michigan (University of Michigan Committee on Use and Care of Animals – UCUCA)

Nov-30-2004 09:23am From:SCHOOL OF DENTISTRY +7349361597 T-994 P.004 F-032

THE UNIVERSITY OF MICHIGAN
UNIVERSITY COMMITTEE ON USE
AND CARE OF ANIMALS (UCUCA)

ROOM 370 ANIMAL RESEARCH FACILITY
ANN ARBOR, MICHIGAN 48109-0614
TEL: 734 763 8028 FAX: 734 763-3234
EMAIL: ucuca@umich.edu

October 29, 2004

Jacques E. Nör
Cariology, Restorative Sciences and Endodontics, School of Dentistry
2309 School of Dentistry 1078

Dear Dr. Nör:

The University of Michigan Committee on Use and Care of Animals (UCUCA) has reviewed your Application to Use Vertebrate Animals (Form 8225) referenced below. This project has been approved. The proposed animal use procedures are in compliance with University guidelines, State and Federal regulations, and the standards of the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals."

When communicating with the UCUCA Office please refer to the Approval Number referenced below. The appropriate Approval Number must accompany all requisitions for animals and pharmaceuticals. No research, testing or instructional use of vertebrate animals may be initiated without an Approval Number.

The Approval Period for your Approval Number is also indicated below. However, the United States Department of Agriculture (USDA) requires an annual review of applications to use animals. Therefore, each year of this application prior to the anniversary of its approval date, you will receive a short Annual Review Form. Your continued animal use approval is contingent upon the completion and return of this form. You will also be notified prior to the expiration of the Approval Period so that your renewal application can be prepared, submitted and reviewed in a timely manner and an interruption in the approval status of this project avoided.

Committee approval must be obtained prior to changes in procedures that could affect the humane use of animals. If changes are contemplated, a modified Form 8225 must be approved prior to initiation of the modified procedures. Contact the UCUCA Office for more information.

The University's Animal Welfare Assurance Number on file with the NIH Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW) (formerly OPRR) is A3114-01, and most recent date of accreditation by the Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC, Int.) is September 23, 2002.

If you receive news media inquiries concerning any aspect of animal use or care in this project, please contact Janet Mender, News and Information Services, 764-7260. If you have security concerns regarding the animals or animal facilities, contact Bill Bess, Director of Public Safety, 763-3434.

Sincerely yours,

Mark R. Opp, PhD
Associate Professor and Chairperson,
University Committee on Use and Care of Animals

cc: DRDA

TITLE: THERAPEUTIC INHIBITION OF BCL-2 AND HEAD & NECK TUMOR ANGIOGENESIS
APPROVAL PERIOD: 10/29/04 – 10/29/07
FUNDING AGENCY: NIH
UCUCA APPROVAL NUMBER: 8990