INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**OBTENÇÃO DE ALTOS NÍVEIS SÉRICOS DE ENDOSTATINA MURINA EM
CAMUNDONGOS PELA UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE OVÁRIO DE
HAMSTER CHINÊS RECOMBINANTES SECRETANDO ENDOSTATINA
TRANSPLANTADAS EM DISPOSITIVOS DE IMUNOISOLAMENTO**

Natália Malavasi Vallejo

São Paulo

2008

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**OBTENÇÃO DE ALTOS NÍVEIS SÉRICOS DE ENDOSTATINA MURINA EM
CAMUNDONGOS PELA UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE OVÁRIO DE
HAMSTER CHINÊS RECOMBINANTES SECRETANDO ENDOSTATINA
TRANSPLANTADAS EM DISPOSITIVOS DE IMUNOISOLAMENTO**

Natália Malavasi Vallejo

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientadora:
Dra. Ligia Ely Morganti Ferreira Dias

São Paulo

2008

Aos meus pais, Paulo e Elisabeth, dedico esse trabalho.
Muito Obrigada pelo apoio incondicional, o amor, paciência, força e coragem que
me deram para concluir mais essa etapa de minha vida.
Devo tudo a vocês!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela proteção e força para trilhar os caminhos da vida.

Aos meus pais, Paulo e Elisabeth, pelo total apoio, confiança, dedicação durante todo esse tempo e por compartilharem comigo os melhores momentos da minha vida.

Ao meu irmão Diego, por estar do meu lado sempre e me chamar de doida por mexer com camundongos. Muito obrigada por ser meu irmão, e por participar de todas as minhas conquistas!!!!

À minha orientadora Dra. Ligia Ely Morganti Ferreira Dias, pela orientação, confiança e por compartilhar comigo seus conhecimentos e experiências profissionais.

Ao meu noivo Bruno, pelo amor, apoio, paciência e muita compreensão durante todos esses anos.

Às Dras. Olga Zazuco Higa, Maria Aparecida Pires Camilo, Nanci do Nascimento e ao Dr. Patrick Jack Spencer, obrigada pela ajuda e disponibilização de reagentes e aparelhos.

Ao Dr. Roger Chammas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela ajuda na realização das lâminas de imuno-histoquímica e disponibilização do laboratório de microscopia.

Às amigas e irmãs, Flavinha, Claudinha e Renata, que sempre me acolheram na república das graçinhas e dividimos momentos inesquecíveis de faculdade e de república. Muuuuito obrigada pela amizade!!!!

Às amigas Giovanna, Taís, Gabi e Thalita, agradeço pela amizade e momentos inesquecíveis que vivemos durante a faculdade e sei que mesmo longe algumas vezes, sempre torceram pelo meu sucesso. Muito Obrigada!!!

À amiga Bianca, pelo apoio, conselhos e muitas e muitas horas de conversas sem fim que sempre tivemos. Agradeço pela amizade destes 11 anos inesquecíveis de nossas vidas.

Às amigas, Rosa e Dani, obrigada pela ajuda desses anos, por estarem sempre por perto e pela amizade.

Aos amigos, Keli e Bruno, obrigada pela amizade!!!!

Aos amigos Janaína, Murilo, Alberto (Troxa) e Camila, obrigada pela ajuda de todos esses anos e pela amizade.

À Neidinha, que sempre esteve disposta a ajudar na sangria de todos os meus animais, e pelos vários momentos de risada e desabafo. Muito Obrigada pela ajuda!!!

Aos funcionários e amigos Johnny, Junqueira e Zé Maria, que sempre estiveram dispostos a ajudar em tudo.

A todos os funcionários e amigos do IPEN, Dona Ge, Edu, Longino pela manutenção e organização dos laboratórios.

À FAPESP pela concessão dos recursos financeiros para realização deste projeto (Auxílio à Pesquisa Processo nº 00/04658-0).

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

OBTENÇÃO DE ALTOS NÍVEIS SÉRICOS DE ENDOSTATINA MURINA EM CAMUNDONGOS PELA UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS RECOMBINANTES SECRETANDO ENDOSTATINA TRANSPLANTADAS EM DISPOSITIVOS DE IMUNOISOLAMENTO

Natália Malavasi Vallejo

RESUMO

Endostatina, um fragmento do colágeno XVIII de 20 kDa, é um potente inibidor de angiogênese e crescimento tumoral. Foi previamente demonstrado que a administração contínua de endostatina em modelos animais melhorou a eficácia e potência da terapia antitumoral, comparada com a administração subcutânea diária por injeções de endostatina. A liberação contínua da proteína antiangiogênica endostatina para a circulação sistêmica poderia ser um tratamento antiangiogênico ideal. O sistema Theracyte é um sistema de membranas de politetrafluoretileno semi-permeáveis para macro-encapsulamento e implante de células geneticamente modificadas para liberação de proteínas terapêuticas *in vivo* e que não requer a imunossupressão do hospedeiro. Com a finalidade de demonstrar a utilidade deste sistema, células CHO expressando (his)₆-met-endostatina foram injetadas em dispositivos de imunoisolamento Theracyte, que foram imediatamente implantados em camundongos imunodeficientes (SCID). Em outro modelo de implante de dispositivos de imunoisolamento, os dispositivos Theracyte foram implantados em animais e depois do tempo de cicatrização (17 dias), as células expressando endostatina foram injetadas dentro dos dispositivos. Níveis altos e constantes de endostatina de até 3,7 µg/ml foram detectados no plasma durante os dois meses de duração do estudo em ambos os modelos de implante dos dispositivos de imunoisolamento. Níveis mais altos de endostatina (até 6,7 µg/ml) foram detectados no plasma de animais implantados com o mesmo número de células “livres”. Análise histológica de cortes corados por hematoxilina/eosina dos dispositivos retirados dos animais mostraram que haviam células aparentemente viáveis dentro dos dispositivos. A análise imuno-histoquímica utilizando anticorpo anti-endostatina mostrou a existência de reação nas células dentro do dispositivo e também do lado de fora, demonstrando que a endostatina, secretada pelas células recombinantes confinadas, extravasou da membrana, atingindo os tecidos ao redor.

OBTAINING HIGH SERUM LEVELS OF MURINE ENDOSTATIN IN MICE USING RECOMBINANT CHINESE HAMSTER OVARY CELLS SECRETING ENDOSTATIN TRANSPLANTED IN IMMUNOISOLATION DEVICES

Natália Malavasi Vallejo

ABSTRACT

Endostatin, a 20 kDa C-terminal fragment of collagen XVIII, is a potent inhibitor of angiogenesis and tumor growth. It has been shown that endostatin continuous administration in animal models improves the efficacy and potency of the antitumoral therapy, compared to bolus subcutaneous daily administration. Continuous delivery of the antiangiogenic protein endostatin to the systemic circulation would be an optimal treatment for tumor. The Theracyte system is a semi-permeable membrane macro-encapsulation system for implantation of genetically engineered cells for therapeutic proteins delivery *in vivo* and which do not require host immunosuppression.

To demonstrate the utility of this system, CHO cells expressing (his)₆-met-endostatin were loaded into Theracyte immunoisolation devices which were immediately implanted into SCID mice. In another model for the immunoisolation devices implant, Theracyte devices were implanted into animals and after healing (17 days later), the cells expressing endostatin were injected within the devices.

High and constant levels of endostatin of up to 3,7 µg/ml were detected in plasma throughout the two months duration of the study in both models of immunoisolation device implant. Higher plasma levels of endostatin (up to 6,7 µg/mL) were observed in animals implanted with the same amount of “free” cells. Histological analysis of hematoxylin/eosin stained devices withdrawn from the animals showed that there were apparently viable cells within the devices. Immunohistochemistry using anti-endostatin antibody showed that there are reaction in the cells within the devices and outside them, demonstrating that endostatin, secreted by the confined recombinant cells, permeated through the membrane, reaching the surrounding tissues.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Angiogênese.....	1
1.2. Endostatina.....	6
1.3. Biohíbridos	9
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Materiais.....	16
3.1.1. Equipamentos e acessórios principais.....	16
3.1.2. Reagentes.....	17
3.1.3. Linhagens celulares	18
3.2. Métodos	18
3.2.1. Obtenção das células CHO expressando endostatina e (his) ₆ -met-endostatina	18
3.2.2. Obtenção do meio condicionado.....	19
3.2.3. Indução e tratamento de tumores em camundongos SCID [♂]	20
3.2.3.1. Tumor de Erlich	20
3.2.3.2. Tumor B16F10	20
3.2.3.3. Tratamento de tumores de Erlich e Melanoma induzidos em camundongos utilizando células CHO livres expressando (his) ₆ -met-endostatina.....	21
3.2.4. Injeção de células CHO expressando (his) ₆ -met-endostatina nos dispositivos Theracyte in vitro	22
3.2.5. Injeção de células CHO expressando (his) ₆ -met-endostatina em camundongos SCID [♂]	23
3.2.5.1. Injeção de células CHO expressando (his) ₆ -met-endostatina livres...23	
3.2.5.2. Injeção de células CHO expressando (his) ₆ -met-endostatina nos dispositivos Theracyte e implante dos dispositivos nos camundongos.....	24
3.2.6. Cortes histológicos	25
3.2.7. Determinação de (his) ₆ -met-endostatina.....	26
3.2.7.1. SDS-PAGE.....	26
3.2.7.2 Western Blotting.....	26
3.2.7.3. Imuno-histoquímica.....	27
3.2.7.4. Dosagem dos níveis de expressão de endostatina recombinante	28
3.2.8. Atividade biológica.....	28
4. RESULTADOS	30

4.1. Tratamento de tumores de Ehrlich induzidos em camundongos.....	30
4.2. Tratamento de tumores Melanoma induzidos em camundongos.....	31
4.3. Atividade biológica	32
4.4. Injeção de células CHO expressando (his) ₆ -met-endostatina livres em camundongos.....	33
4.5. Seleção de clones produtores de altos níveis de (his) ₆ -met-endostatina	36
4.6. Implante das células CHO nos dispositivos Theracyte <i>in vitro</i>	37
4.7. Implante das células CHO nos dispositivos Theracyte <i>in vivo</i>	40
4.8. Dosagem por ELISA de endostatina no soro dos camundongos.....	47
5. DISCUSSÃO.....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

1.1. Angiogênese

O desenvolvimento e o funcionamento adequado dos tecidos dependem de um suprimento de oxigênio, nutrientes, moléculas e células do sistema imune. Esse suprimento é fornecido pelos vasos sanguíneos. Os vasos sanguíneos são compostos fundamentalmente por células endoteliais, que se conectam para formar os tubos que direcionam e mantêm o fluxo sanguíneo e a perfusão para os tecidos (Risau, 1997; Jain, 2003).

O termo angiogênese foi utilizado pela primeira vez em 1935 por Hertig para descrever a vascularização na placenta. O estudo sistemático da angiogênese teve início com Judah Folkman, e progressivamente foram desenvolvidos vários modelos *in vitro* e *in vivo* para o estudo de seus mecanismos moleculares, modulação e a sua importância nos processos fisiológicos e patológicos (Folkman e Brem, 1992).

Atualmente o termo angiogênese tem sido empregado para descrever o crescimento de brotos endoteliais a partir de vênulas pós-capilares pré-existentes e para demonstrar os processos de crescimento e remodelamento de uma rede vascular primitiva em uma complexa. A angiogênese envolve distintas formas de crescimento vascular. Elas têm início com a dilatação de vênulas pré-existentes, as quais podem sofrer brotamento, ou tornarem-se divididas por colunas de células periendothelias, processo denominado intussuscepção ou, por pontes de células transendothelias, as quais dividem o vaso em capilares distintos (Benjamin e col., 1998; Carmeliet, 2000).

A angiogênese é um processo fisiológico definido como a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, essencial para o desenvolvimento embrionário, ocorrendo durante ciclos reprodutivos femininos (ovulação, menstruação, gravidez) e na formação de órgãos e regeneração de tecidos. Também contribui para o desenvolvimento e progressão de uma variedade de condições patológicas, incluindo o crescimento tumoral e

metástases, doenças cardiovasculares, retinopatia diabética, artrite reumatóide, psoríase, entre outras (Bbuto e col., 2004; Folkman, 2007).

Durante a embriogênese, os vasos sanguíneos se desenvolvem mediante dois tipos de processos: vasculogênese, onde as células endoteliais se originam a partir de um tecido previamente avascular e angiogênese, onde os novos capilares brotam de vasos existentes. Em adultos os novos vasos são produzidos principalmente pela angiogênese; normalmente a vasculatura é quiescente, exceto pelos ciclos reprodutivos femininos (ovulação, menstruação, gravidez), tornando-se ativa sob estímulo apropriado (revisado em Hanahan e Folkman, 1996; Conway e col., 2001).

As células endoteliais sozinhas podem iniciar, mas não completar a angiogênese. As células periendoteliais são essenciais para o amadurecimento vascular. Essas células estabilizam o vaso nascente mediante a inibição, migração e a proliferação endotelial, e estimulam a produção de matriz extracelular. As células endoteliais proporcionam controle homeostático e protegem o novo vaso contra rupturas ou regressão (Carmeliet, 2000). As etapas da angiogênese envolvem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular em resposta ao óxido nítrico e “vascular endothelial cell growth factor” (VEGF) ou “vascular permeability factor”, degradação da membrana basal por metaloproteinases, perda das junções entre as células endoteliais pela ação do ativador do plasminogênio, migração e proliferação das células endoteliais, formação de cordões endoteliais, formação de membrana basal, maturação e remodelamento e recrutamento de células periendoteliais (Figura 1) (Donovan e col., 2001; Zatterstrom e col., 2000; Jain, 2003; Bbuto e col., 2004; Tandle e col., 2004).

Figura 1. Etapas da angiogênese normal. Modificado de Robbins & Cotran.

Patologia Estrutural e Funcional. 6ª ed.

A angiogênese está sujeita a um complexo sistema de controle dinâmico entre fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos (angiostáticos). No indivíduo adulto o crescimento vascular está sob rigoroso controle, havendo uma predominância dos fatores anti-angiogênicos sobre os pró-angiogênicos, que são ativados por células endoteliais, monócitos, músculo liso e plaquetas. Ocorrendo uma elevação da concentração de inibidores endógenos da angiogênese deveria haver um balanço a favor da inibição da neovascularização (Tandle e col., 2004).

Vários estudos e evidências sugerem que a angiogênese é essencial para a progressão e sobrevivência de tumores sólidos e suas metástases (Kim e col., 1993, Tarta e col., 2000; Ribatti e Ponzoni, 2005).

A angiogênese associada aos tumores sólidos é um processo em que novos capilares são formados no estroma tumoral a partir de células endoteliais do hospedeiro. Isto permite o crescimento do tumor além de 2-3 mm, pela perfusão de oxigênio e nutrientes e remoção de metabólitos tóxicos, ao invés da simples difusão no espaço extracelular que mantém o tumor restrito e com uma pequena população celular (Tarta e col, 2000). As células de tumores pré-vasculares podem proliferar tão rapidamente quanto aquelas de um tumor em expansão, no entanto, a taxa de crescimento de células em tumores sem neovascularização fica em equilíbrio com a sua taxa de mortalidade. Uma vez que o tumor se torna vascularizado, ele cresce exponencialmente, como esquematizado na figura 2. A infiltração de novos vasos sangüíneos supre as células tumorais de oxigênio e nutrientes e remove os produtos do seu metabolismo (Folkman, 1995).

A angiogênese dos tumores é regulada pela produção de fatores pró-angiogênicos dos quais os mais conhecidos são os “fibroblast growth factors” (forma ácida ou aFGF e forma básica ou bFGF), e “vascular endothelial cell growth factor” ou “vascular permeability factor” (VEGF/VPF) (Tarta e col., 2000; Kerbel e Folkman, 2002; Sottile, 2003), os quais estimulam a proliferação de células endoteliais. Tanto o VEGF quanto bFGF apresentam expressão aumentada em células de vários tipos de tumores (Kong e Crystal, 1998). A hipóxia das células tumorais leva a um aumento de expressão de VEGF (Shweiki e col., 1992). Estas duas famílias de fatores angiogênicos podem promover a neovascularização de uma maneira sinérgica (Pepper e col., 1992; Bergers e Benjamin, 2003).

Figura 2. Etapas da angiogênese tumoral (Bergers e Benjamin, 2003).

O fenótipo angiogênico de um tumor aparentemente é o resultado entre o balanço dos reguladores positivos e negativos da neovascularização (Rastinejad e col., 1989; Good e col., 1990; O'Reilly e col., 1994; Parangi e col., 1996).

As células endoteliais intratumorais podem se dividir até 50 vezes mais rápido do que as células endoteliais normais. Além de um efeito na expansão dos tumores sólidos, a angiogênese pode facilitar a formação de metástases aumentando a saída das células tumorais do sítio primário e sua entrada na circulação sanguínea por meio de formação de vasos mais permeáveis do que os vasos maduros normais (Dvorak e col., 1995; Bergers e Benjamin, 2003). Existe uma correlação entre a produção de fatores angiogênicos e recidiva, formação de metástases e prognóstico ruim em pacientes humanos com câncer de mama, próstata, pulmão, estômago, ovários entre outros (Zetter, 1998).

Com o papel de angiogênese tumoral em crescimento e progressão firmemente estabelecida, consideráveis esforços têm sido dirigidos para a terapia antiangiogênica como uma nova modalidade de tratar cânceres humanos (Tandle e col., 2004).

Inibidores da angiogênese têm sido desenvolvidos usando como alvo as células endoteliais vasculares a fim de bloquear a angiogênese tumoral ao invés das células tumorais em si.

1.2. Endostatina

O'Reilly e col. (1997) descreveu a endostatina que foi purificada do produto de secreção de uma linhagem celular murina de hemangioendotelioma e é um fragmento de 20kDa do C-terminal do colágeno XVIII.

O grande interesse pela endostatina na área médica surgiu quando foi verificada sua potente capacidade de inibir tumores de tecido sólido *in vivo*, suprimindo o fenótipo angiogênico, afetando a formação de vasos sanguíneos e o crescimento de tumores. Trata-se por estes fatos de um agente com importante potencial terapêutico (O'Reilly e col., 1997, Bergers e col., 1999; Ren e col., 2003; Citrin e col., 2004; Sasaki e col., 1998; Dixelius e col., 2000 e Shi e col., 2007).

O tratamento com endostatina (20mg/Kg/dia) levou à quase completa regressão (estado de microtumores) de diferentes modelos de tumores primários (carcinoma de pulmão de Lewis, fibrosarcoma T241, hemangioendotelioma EOMA e melanoma B16F10) estabelecidos (O'Reilly e col., 1997). O crescimento de metástases de tumor de pulmão de Lewis após a remoção do tumor primário foi quase completamente suprimido pela administração de endostatina enquanto nos camundongos tratados com solução salina, as metástases desenvolveram-se rapidamente (O'Reilly e col., 1997).

Em um trabalho relacionado, Boehm e col. (1997) mostraram que o tratamento com endostatina não induz os tumores à resistência, mesmo após 6 ciclos de tratamento descontinuado e que após a terapia antiangiogênica os tumores se apresentaram em estado de dormência prolongada.

O tratamento com endostatina tem sido correlacionado à inibição da angiogênese em modelos animais, sem efeito colateral, toxicidade ou desenvolvimento de resistência à droga, agindo na inibição da proliferação, migração, aderência, e sobrevivência celulares (Bergers e col., 1999, Perletti e col., 2000 e Shi e col., 2007).

O tratamento de tumores e metástases utilizando a endostatina apresenta algumas vantagens sobre a quimioterapia convencional:

- 1) As células endoteliais são normais, diplóides, geneticamente estáveis e representam alvo uniforme se comparadas às células tumorais com alta instabilidade genética, mais propensa a criar mecanismos de resistência às drogas;
- 2) A endostatina é altamente específica para células endoteliais ativadas. Sob condições fisiologicamente normais com exceção dos órgãos reprodutores femininos, as células endoteliais não se dividem;
- 3) A endostatina possui baixa toxicidade e não causa resposta imunológica por se tratar de uma proteína endógena;
- 4) A endostatina muito provavelmente tem ação sobre diferentes tipos de tumores, pois sua atuação é sobre o endotélio e não sobre as células tumorais.

Se assumirmos que as células sobreviventes do tumor possuem o potencial para expressar mediadores pró-angiogênicos, a interrupção da terapia antiangiogênica apresenta o risco potencial de deslocar o equilíbrio em favor da angiogênese, permitindo ao tumor emergir de seu estado de dormência. Uma terapia efetiva para o tratamento antiangiogênico deveria, portanto apresentar um efeito persistente.

Kisker e col. (2001) demonstraram que a administração contínua de endostatina por meio de uma bomba osmótica no peritônio de camundongos resultou na manutenção de níveis sistêmicos elevados de endostatina, levando a aumento da eficácia, manifestada como maior regressão dos tumores e um decréscimo de 6 a 8 vezes na dose requerida para obtenção do mesmo efeito antitumoral, quando comparada com a administração diária de endostatina por meio de injeções da proteína.

O mecanismo de ação da endostatina ainda não está totalmente esclarecido, mas trabalhos demonstraram que a endostatina desencadeia a supressão de genes envolvidos na proliferação das células endoteliais, resultando

em um efeito antimigratório (Shichiri e Hirata, 2001). Foi demonstrado também que a endostatina interage com a tropomiosina (proteína que estabiliza os filamentos de actina), resultando no rompimento da integridade dos microfilamentos, levando à inibição da mobilidade das células endoteliais e indução de apoptose (Macdonald e col., 2001). Foi reportado que a endostatina bloqueia a interação entre o VEGF (fator de crescimento da célula endotelial) e o receptor de superfície celular, KDR/Flk-1, inibindo a ligação do VEGF às células endoteliais resultando na inibição da proliferação e migração de células endoteliais (Kim e col., 2002). Foi descrito também que a endostatina inibe a proliferação de células endoteliais bloqueando a atividade catalítica da enzima matriz metaloproteinase-2 (MMP), enzima envolvida na regulação da angiogênese e metástase tumoral (Lee e col., 2002).

Estudos recentes demonstraram uma nova proposta para esclarecer o mecanismo de ação da endostatina, mostrando a ligação específica e de alta afinidade da endostatina com a nucleolina na superfície celular de células endoteliais. A nucleolina exposta na superfície celular pode servir como marcador específico de vasculatura angiogênica (Christian e col., 2003). Foi demonstrada a co-localização de endostatina e nucleolina em vasos sanguíneos em angiogênese no ambiente tumoral (Shi e col., 2007). Os autores relatam que a endostatina é internalizada e transportada para o núcleo das células endoteliais via nucleolina. No núcleo a fosforilação da nucleolina, crítica para a proliferação celular, pode ser inibida pela endostatina.

Em processos angiogênicos naturais como: gravidez, feridas ou ciclos reprodutivos feminino, a angiogênese não é retardada mesmo no caso de utilização de altos níveis de endostatina, pois células endoteliais em processos de reparação não expressam nucleolina na superfície celular e sendo assim, a endostatina não seria internalizada (Shi e col., 2007).

Uma das linhagens celulares mais utilizadas para a expressão gênica estável de proteínas recombinantes em células de mamífero são as células de ovário de hamster chinês (CHO). Essas células apresentam uma série de vantagens, seus produtos apresentam uma comprovada similaridade com os equivalentes naturais, podem proporcionar níveis de produção elevados, se adaptam bem à ausência de soro e podem crescer tanto aderidas à superfície

como em suspensão (Kaufman, 1990). Uma outra vantagem é a possibilidade de se utilizar clones deficientes em diidrofolato redutase (DHFR) que é o caso do mutante DXB11. O sistema de expressão que utiliza células CHO deficientes em diidrofolato redutase (DHFR) e o gene DHFR de camundongo como marcador de seleção foi adotado em um trabalho anterior a este, realizado no laboratório do Centro de Biotecnologia do IPEN, no qual, por meio da transfecção do plasmídeo pED contendo o gene da endostatina em células CHO (CHO-DXB11) obtendo com estes clones a expressão de níveis bastante elevados ($29 \mu\text{g}/10^6$ células em 24 horas) de endostatina murina recombinante (Chura-Chambi e col., 2004).

Consideramos que o uso de células eucariotas transplantadas, produtoras de endostatina recombinante (biohíbrido) liberada durante longo período na circulação, seria uma alternativa útil para o tratamento antiangiogênico de tumores e metástases.

1.3. Biohíbridos

A terapia por imunoisolamento (ou uso de biohíbridos) se baseia no transplante de células alogênicas ou xenogênicas mantidas encapsuladas em uma barreira semipermeável que permite a passagem bidirecional de pequenas moléculas (oxigênio, nutrientes, metabólitos e secreções celulares bioativas) e restringindo a passagem de moléculas maiores e células do sistema imune do hospedeiro. Este tipo de dispositivo permite o transplante de células, que normalmente seriam rejeitadas pelo sistema imune do indivíduo, para produzirem altos níveis de proteínas com propriedades terapêuticas sem a necessidade de imunossupressão.

Os primeiros dispositivos de imunoisolamento descritos foram aqueles contendo ilhotas de Langherans xenogênicas para o tratamento de diabetes dependente de insulina (tipo I) (Chick e col., 1977; Chick e col., 1975). De fato, o imunoisolamento foi mais extensivamente estudado para reposição de ilhotas pancreáticas em diabetes. Estas células seriam induzidas a produzir insulina na presença de elevados níveis de glicose no soro.

Os dispositivos para imunoisolamento de células mais descritos atualmente são as microcápsulas de alginato, onde as células são imobilizadas em hidrogel e envoltas por membranas seletivamente permeáveis e são injetadas no músculo, no tecido subcutâneo ou no peritônio do animal (Read e col., 2001; Joki e col., 2001; Bjerkvig e col., 2003; Vos e col., 2006; Teng e col., 2007; Zhang e col., 2007).

Os trabalhos de Read e col. e de Joki e col. em 2001 descreveram propostas similares à do presente trabalho: ambos obtiveram secreção contínua de endostatina por meio do encapsulamento de células recombinantes secretoras de endostatina para o tratamento de tumores. Joki e col. em 2001 descreveram o efeito da liberação de endostatina humana sobre o crescimento de uma linhagem de glioblastoma humana em ratos. Teng e col. e Zhang e col., 2007 realizaram tratamento de tumores de melanoma B16F10 por meio de implante de microcápsulas contendo células CHO expressando endostatina e demonstraram em seus estudos um decréscimo na formação da neovascularização no tecido tumoral e inibição do crescimento do tumor de melanoma em 80 e 77,4%, respectivamente. Ambos os trabalhos utilizam as microcápsulas de alginato para o encapsulamento das células recombinantes.

As macrocápsulas são implantes macroscópicos feitos de membranas poliméricas semipermeáveis, onde ficam retidas as células, implantadas subcutânea ou intraperitonealmente (Lysaght e col., 1994). Para o encapsulamento das células, as macrocápsulas são feitas de material polimérico resistente de maneira que não ocorra vazamento de material. A membrana deve ser de um material biologicamente inerte.

Brauker e col. (1995) demonstraram por meio de análise histológica que quando uma variedade de diferentes materiais (acetato de celulose, ésteres mistos de celulose, politetrafluoretileno e copolímeros de acrílico) foram implantados subcutaneamente em ratos houve a formação de tecido fibrótico com espessura de 30 a 100 μm ao redor do polímero no caso da utilização dos biomateriais com poros pequenos (até 0,8 μm). A análise histológica revelou que no caso da utilização dos mesmos materiais com poros grandes o suficiente para permitir a penetração completa pelas células do sistema imune do hospedeiro (0,8 a 8 μm) ocorreu neovascularização na interface membrana-tecido. Os autores

relatam ainda que quando foram comparadas as vascularizações nas interfaces membrana-tecido de membranas de politetrafluoroetileno (PTFE) com diferentes tamanhos de poros implantadas no tecido subcutâneo, as membranas com poros maiores (5 μm) apresentavam um número de estruturas vasculares 80 a 100 vezes maior do que as mesmas membranas com poros de 0,02 μm de tamanho. A vascularização aumentada foi observada mesmo quando a membrana de poros maiores foi laminada com uma membrana com poros menores, esta utilizada para barrar a entrada de células do hospedeiro no protótipo de dispositivo de imunisolamento. O nível maior de vascularização foi mantido por pelo menos um ano no tecido subcutâneo dos animais. Dessa maneira a deficiência no fornecimento de oxigênio às células no interior dos dispositivos de imunisolamento, resultante de vascularização pobre ao redor de dispositivos pode ser minimizada pela utilização de membranas com duas lâminas de PTFE: uma interna com poros de 0,4 μm que impedem a saída de células do interior do dispositivo e a entrada de células do hospedeiro e uma lâmina externa, com poros de 5 μm , que possibilitam a vascularização na interface membrana de biomaterial-tecido do hospedeiro. Esse tipo de material é usado nos dispositivos de imunisolamento Theracyte. O efeito é de integração do biomaterial no tecido do hospedeiro, produzindo uma neovascularização ao redor do dispositivo.

Brauker e col. (1996) utilizando o mesmo sistema de dispositivos de imunisolamento com duas lâminas demonstram a viabilidade de células isogeneicas e alogeneicas (células embrionárias de pulmão de ratos Sprague-Dawley implantadas em ratos Lewis) no dispositivo *in vivo* durante pelo menos 1 ano. No entanto, quando os dispositivos apresentavam buracos, as células alogeneicas eram mortas em um período de três semanas. Células xenogeneicas (células embrionárias de pulmão de camundongo implantadas em ratos Lewis) transplantadas nos dispositivos também foram destruídas dentro de três semanas. A morte dos tecidos xenogeneicos foi acompanhada por um acúmulo de células inflamatórias e um decréscimo na vascularização local. Os autores sugerem a possibilidade de que células xenogeneicas são mortas pelo acúmulo de células inflamatórias, talvez mediada pela liberação de antígenos dos tecidos dentro do dispositivo e sua apresentação por uma via indireta.

Os dispositivos Theracyte, compostos de duas lâminas de PTFE, oferecem um sistema simples e seguro de sistema de liberação de moléculas com propriedades terapêuticas, permite a remoção ou implantação de novos dispositivos e não requerem imunossupressão do hospedeiro no caso de utilização de células alogeneicas (figura 3).

Yanay e col. (2003) demonstraram a elevação dos níveis de hematócrito de ratos tratados com células vasculares de músculo liso autólogas ou alogeneicas transduzidas com um vetor retroviral para secreção de eritropoietina (EPO) transplantadas em um dispositivo de imunisolamento Theracyte. Os resultados de hematócrito foram maiores quando os dispositivos foram implantados subcutaneamente do que quando os dispositivos foram implantados intraperitonealmente.

Os dispositivos Theracyte também já foram descritos para o transplante de hepatócitos de porcos na cavidade intraperitoneal de camundongos imunocompetentes. As células transplantadas permaneceram viáveis e funcionais no período de 8 semanas após seu implante (Garkavenko e col., 2006).

Foi também descrita a comparação entre o implante de ilhotas de Langherans porcinas implantadas em dispositivos Theracyte e em microcápsulas de alginato para tratamento de diabetes em camundongos. Os resultados obtidos foram similares para os dois sistemas: a sobrevivência das células das ilhotas e a reversão da diabetes em até 16 semanas em camundongos auto-imunes não obesos (NOD) (Elliott e col., 2005).

O processo de neovascularização leva de duas a três semanas para ser completado e aparentemente as estruturas vasculares permanecem indefinidamente (Padera e col., 1996).

Figura 3. Esquema do dispositivo Theracyte (Josephs e col., 1999).

Neste trabalho foram realizados implantes de células CHO produtoras de endostatina em dispositivos de imunisolamento (Theracyte) para a secreção de endostatina murina recombinante para manutenção de um suprimento persistente da proteína em circulação com níveis elevados no soro dos camundongos.

Foram realizados experimentos com a finalidade de demonstrar se existe a necessidade de pré-implantação do dispositivo de imunisolamento nos animais e de aguardar a formação do tecido de cicatrização e de neovascularização ao seu redor antes do transplante das células CHO, de modo que a própria endostatina não possa exercer seu efeito antiangiogênico sobre as células endoteliais ao redor do dispositivo, interferindo na sobrevivência das células dentro do mesmo.

Embora estudos tenham demonstrado que a endostatina não interfere na cicatrização de feridas (Bergers e col., 1999; Bloch e col., 2000 e Shi e col., 2007) um fator importante em qualquer situação clínica é a possibilidade de

interrupção da terapia no caso de efeitos colaterais indesejados em processos fisiológicos normais.

A vantagem do uso dos dispositivos Theracyte sobre as microcápsulas de alginato para imunisolamento das células é: a possibilidade de retirada do dispositivo com as células no caso de efeitos colaterais graves.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- 1) Realizar tratamento de tumores de Erlich e Melanoma B16F10 induzidos em camundongos SCID machos, utilizando células “livres” secretoras de endostatina injetadas nos animais.
- 2) Implantar células CHO secretoras de endostatina em dispositivos de imunoisolamento (Theracyte) *in vitro*, para verificarmos a liberação de endostatina para o meio de cultura e a viabilidade celular no interior dos dispositivos;
- 3) Teste utilizando duas metodologias para o implante dos dispositivos e das células produtoras de endostatina em camundongos SCID:
 - a) implante dos dispositivos nos camundongos e após 17 dias, injeção das células CHO expressando endostatina;
 - b) implante dos dispositivos já contendo as células expressando (his)₆-met-endostatina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Equipamentos e acessórios principais

- Adesivo de silicone: medical adhesive silicone tipe A, Silastic, E.U.A.
- Aparelho Milli-Q-Plus, purificador de água em sistema Milli Q (18 Ω), Milipore, Belford, MA, E.U.A.
- Autoclave, modelo: Kavoklave II, Blackburn, Inglaterra.
- Banho-maria, modelo: 100, Fanem, São Paulo, Brasil.
- Banho-maria, modelo: Type 16500 Dri-Bath, Thermolyne, Iowa, E.U.A.
- Balança analítica, modelo: AW 220, Shimadzu, Japão.
- Balança de precisão, modelo: P1200, Mettler, São Paulo, Brasil.
- Câmara de Neubauer, modelo: Tiefe Depth Profondeur, Loptik Labor, Basel, Suíça.
- Centrífuga refrigerada automática, modelo: 5810R, Eppendorf, Alemanha.
- Centrífuga, modelo: CELM LS 3 PLUS, Barueri, São Paulo, Brasil.
- Dispositivo TheraCyte[®], Baxter Healthcare, Deerfield, E.U.A.
- Estufa de CO₂ para cultura de celular, modelo: 3158. Farma Scientific, Ohio, E.U.A.
- Filmes radiográficos, Kodak Dental, Canadá.
- Fluxo Laminar modelo: 2256, TROX, Curitiba, Brasil.
- Freezer -80°C, modelo AL 880 E, American Lab, São Paulo, Brasil.
- Garrafas de cultura celular, modelos: 25cm², 75cm², 175cm², Invitrogen, Carlsbad, E.U.A.
- Leitor de ELISA, modelo: MR 4000, Dynatech Biotech, EUA.
- Microscópio invertido, modelo: TMS, Nikon, Japão.
- Microscópio óptico, modelo: Nikon Eclipse e600 com câmera fotográfica Nikon DXM 1200F, Nikon, Düsseldorf, Alemanha.

- Paquímetro Digital, modelo: YT203, Digimes Yato Pro-Cal, Guangdong, China.
- Seringa Hamilton, Hamilton Company, Nevada, E.U.A.
- Sistema de eletroforese vertical, modelo: SE250, Hoefer, Pharmacia Biotech, San Francisco, E.U.A.
- Sistema de estocagem de criotubos em nitrogênio líquido, Thermolyne, Dubuque, IA, E.U.A.

3.1.2. Reagentes

- Anestésico e relaxante muscular: Quetamina, Rhabiofarma Ind. Farmacêutica, Hortolândia, Brasil.
- Anestésico e relaxante muscular: Xilazina, Rhabiofarma Ind. Farmacêutica, Hortolândia, Brasil.
- Antimicótico: Anfotericina B (Fungisona), Invitrogen, Carlsbad, E.U.A.
- Antibióticos: Penicilina e Estreptomicina, Invitrogen, Carlsbad, E.U.A.
- Anticorpo secundário conjugado a peroxidase de cavalo, Armeshan Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK.
- Anticorpo policlonal anti-endostatina murina, cód. AB1880, Chemicon, Califórnia, E.U.A.
- Bicarbonato de sódio, Gibco-BRL, Gathersburg, E.U.A.
- Cromógeno 3,3-diaminobenzidina, Dako, Carpinteria, CA, E.U.A.
- Dimetilssulfóxido (DMSO), MERCK, São Paulo, Brasil.
- Fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), doado pelo Dr. Paulo Lee Ho do Instituto Butantan.
- Heparina-Liquemine, Roche, São Paulo, Brasil.
- Kit de ELISA para determinação de endostatina murina, modelo: CYT 160, Chemicon, E.U.A.
- Kit de quimioluminescência para revelação de Western blotting ECL, Armesham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK.
- Leite em pó desnatado e liofilizado, Molico, São Paulo, Brasil.
- L-Glutamina, Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, E.U.A.

- Meio Mínimo essencial Eagle's Dulbecco's (D-MEM), Cultilab, Campinas, Brasil.
- Meio mínimo essencial Eagle's (E-MEM), Cultilab, Campinas, Brasil.
- Meio mínimo essencial (α -MEM) sem a presença de ribonucleosídeos e deoxiribonucleosídeos, Gibco, Grand Island, NY, E.U.A.
- Solução Fixadora, Kodak Dental, Canadá.
- Solução Reveladora, Kodak Dental, Canadá.
- Soro fetal bovino (SFB) Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, E.U.A.
- Tripsina, SIGMA, St. Louis, E.U.A.

3.1.3. Linhagens celulares

- Células B16F10 (linhagem celular de tumor de melanoma), foram adquiridas da ATCC[®], nº CRL-6475[™], Manassas, VA, E.U.A.
- Células CHO (linhagem celular de ovário de hamster chinês) deficientes no gene da enzima dihidrofolato redutase (DHFR) transfectadas com o vetor pED contendo os códons para expressão de endostatina, (his)₆-met-endostatina ou o vetor pED vazio.
- Células C-PAE (linhagem celular vascular de artéria de bezerro) foram adquiridas da ATCC[®], nº CCL-209[™], Manassas, VA, E.U.A.

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção das células CHO expressando endostatina e (his)₆-met-endostatina

O vetor para expressão em células de mamífero pED foi gentilmente doado pelo Dr. R.J. Kauffman. Em um projeto anterior a este foram realizadas as clonagens do gene da endostatina e (his)₆-met-endostatina murinas neste vetor

(Chura-Chambi e col., 2004), sua transfecção em células CHO e a amplificação dos genes de interesse nas células.

A linhagem celular mutante CHO-DXB11 (deficiente em DHFR) foi mantida em meio essencial mínimo α (α -MEM) contendo 10 mg/L de ribonucleosídeos e deoxiribonucleosídeos suplementado com 50 U/mL de penicilina, 50 μ g/mL de estreptomicina, 1.25 μ g/mL de anfotericina B, 2 mM de L-glutamina e 10% de soro fetal bovino. Para a obtenção das células expressando endostatina e (his)₆-met-endostatina, foram feitas transfecções dos vetores contendo o gene da endostatina purificados utilizando a técnica de precipitação com fosfato de cálcio (Chura-Chambi e col., 2004). Foi também realizada a transfecção do vetor pED sem o gene da endostatina para ser utilizado com controle negativo.

A seleção dos clones transfectados foi realizada em meio seletivo α -MEM na ausência de ribonucleosídeos e deoxiribonucleosídeos, suplementados com 10% de SFB dialisado, antibióticos e L-glutamina a 37°C em estufa de CO₂. Os clones isolados desta seleção foram submetidos a incrementos graduais de concentrações de metotrexato no meio de cultura a cada 15-25 dias para a seleção dos clones que contivessem cópias amplificadas dos genes da DHFR e endostatina nas células transfectadas e conseqüentemente maior expressão de endostatina.

3.2.2. Obtenção do meio condicionado

Cada clone foi semeado em 3 poços, em placas de 24-poços, com meio α -MEM sem ribonucleosídeos e deoxiribonucleosídeos suplementado com antibióticos, L-glutamina, 10% soro fetal bovino e mantido a 37°C em ambiente úmido com 5% de CO₂ até atingir a semi-confluência. Células de um poço foram tripsinizadas e contadas, para cada clone, considerando-se este valor como o número de células para o tempo zero. O meio de cultura dos outros dois poços foram trocados por meio de cultura α -MEM sem MTX com e sem soro fetal bovino. Após 24 horas, o meio condicionado foi coletado, centrifugado, o sobrenadante foi estocado a -80°C e o número de células para cada poço foi

determinado por tratamento com tripsina e contagem. A média do número de células entre 0 e 24 horas foi calculada, o mesmo procedimento foi realizado para 48 horas de cultura celular.

3.2.3. Indução e tratamento de tumores em camundongos SCID♂

3.2.3.1. Tumor de Ehrlich

Camundongos BALB-C contendo tumor de Ehrlich na forma ascítica foram doados pela Faculdade de Veterinária da Universidade de São Paulo. O líquido ascítico contendo as células tumorais foi coletado utilizando seringa de 1 mL. O líquido foi colocado em um tubo cônico estéril, centrifugado durante 5 minutos a 277 g, o sobrenadante e a camada de hemácias foram descartados e o precipitado foi ressuspenso em 10 mL de Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS). As células tumorais foram contadas utilizando Câmara de Neubauer e 250.000 células foram aliquotadas em tubos eppendorfs, estes tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 277 g, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso em 30 µL de Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS) e foi injetado na região do coxim planar esquerdo de camundongos SCID machos, utilizando um torniquete para que as células não subissem para a perna e coxa do animal e ficassem somente na região do coxim planar.

Os camundongos utilizados foram imunodeficientes (SCID) machos com idades entre 6 a 8 semanas, mantidos em ambiente livre de patógenos (germ-free) e manuseados em fluxo laminar

3.2.3.2. Tumor B16F10

Células B16F10 (melanoma) foram cultivadas em meio mínimo essencial eagle's dulbecco's (D-MEM) contendo 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina, 1,25 µg/mL de anfotericina B, 2 mM de L-glutamina, 110

mg/mL de piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino. As células foram mantidas em cultura celular em estufa à 37°C e com 5% de CO₂, utilizando garrafas de 175 cm² até a semi-confluência. As células foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e 250.000 células foram aliquotadas em tubos tipo eppendorf. Os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 277 g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 30 µL de PBS e injetado na região do coxim planar esquerdo de camundongos SCID machos, utilizando um torniquete.

3.2.3.3. Tratamento de tumores de Ehrlich e Melanoma induzidos em camundongos utilizando células CHO livres expressando (his)₆-met-endostatina

Os tumores de Ehrlich e os Melanomas induzidos na região do coxim planar dos camundongos foram mensurados utilizando um paquímetro digital. As medidas do coxim planar dos mesmos camundongos, não contendo o tumor, foram utilizadas como medidas controles. Quando as medidas dos tumores atingiram 0,5 mm de espessura, foram injetadas 10⁵; 2,5x10⁵ e 5x10⁵ células expressando (his)₆-met-endostatina e 2,5x10⁵ e 5x10⁵ células contendo o vetor fechado (sem o gene da endostatina). As células foram injetadas subcutaneamente na região abdominal dos camundongos. Foram utilizados grupos contendo 5 camundongos.

A espessura dos tumores foi medida utilizando um paquímetro digital, a cada dois dias, até que se atingisse o vigésimo dia de tratamento ou quando os tumores se encontrassem necrosados. Ao final do tratamento os camundongos foram sacrificados de acordo com as normas de ética de experimentação animal.

A análise estatística dos volumes dos tumores foi analisada utilizando o teste de normalidade e o teste de variância One-way ANOVA, presentes no programa Grafic-Pad Prism, versão 3.0 (p < 0,05).

3.2.4. Injeção de células CHO expressando (his)₆-met-endostatina nos dispositivos Theracyte *in vitro*

Os dispositivos Theracyte são compostos de camada dupla de membranas de politetrafluoretileno (PTFE) soldadas por ultra-som que formam um lúmen central com capacidade para 20 µl, o qual pode ser preenchido por células. A membrana interna possui poros de 0,4 micron de diâmetro que impede a saída de células do dispositivo e é ligada a uma membrana externa com poros de 5 micron, que ajudam à formação de vasos sanguíneos quando os dispositivos são implantados *in vivo*. Um tubo de polietileno sai da membrana e serve como porta de aplicação das células. Este sistema fechado foi utilizado para o encapsulamento de células.

Células CHO expressando (his)₆-met-endostatina foram implantadas nos dispositivos de imunoisolamento Theracyte. As células foram cultivadas com meio de cultura apropriado α -MEM, em garrafas de 75 cm², em estufa à 37°C com 5% de CO₂. Os dispositivos foram previamente esterilizados, imergindo-os em etanol a 95%, até que as membranas dos dispositivos ficassem transparentes, em etanol a 70% durante 16 horas e finalmente lavados em 0,9% de NaCl estéril para que fossem retirados quaisquer vestígios de etanol. As células em cultura foram contadas e 10⁶ células CHO expressando (his)₆-met-endostatina foram injetadas no dispositivo pelo cateter de aplicação, utilizando uma seringa tipo Hamilton previamente esterilizada por autoclavagem à 90°C de temperatura e o cateter foi selado com adesivo de silicone. O dispositivo foi colocado em meio de cultura α -MEM contendo 3% de Soro Fetal Bovino, em estufa à 37°C em ambiente úmido, com 5% de CO₂ e mantido em cultura durante 4 dias, para a liberação e expressão de (his)₆-met-endostatina secretada pelas células.

Foi realizada também a cultura de 10⁶ células CHO expressando (his)₆-met-endostatina em uma garrafa de 75 cm², mantida nas mesmas condições dos dispositivos. Ao final dos quatro dias os dispositivos foram retirados das placas e foram cortados pela metade no sentido longitudinal. Uma metade dos dispositivos foi tripsinizada e as células foram contadas. Foram semeadas 1.000, 10.000 ou 100.000 células em placas de petri com 90 x 15 mm de diâmetro. As células

foram mantidas em cultura com meio α -MEM com 10% de Soro Fetal Bovino durante seis dias, o mesmo procedimento foi realizado com as células mantidas em cultura na garrafa de 75 cm². Após os 6 dias de experimento os meios de cultura das placas de petri foram colhidos, centrifugados, e estocados à -20°C e as placas foram coradas com coloração de Rodamina. Após a retirada dos meios de cultura as placas foram lavadas uma vez com solução salina tamponada com fosfato (PBS), foram adicionados 10mL de solução de rodamina em cada placa e mantidas em temperatura ambiente durante 10 minutos. A solução de rodamina foi retirada e as placas lavadas em água corrente e mantidas a temperatura ambiente até a secagem completa, para a determinação do número de colônias, com a finalidade de observar a viabilidade celular no interior dos dispositivos. A outra metade dos dispositivos foi enviada para a preparação de lâminas histológicas coradas com hematoxilina/eosina.

3.2.5. Injeção de células CHO expressando (his)₆-met-endostatina em camundongos SCID ♂

3.2.5.1. Injeção de células CHO expressando (his)₆-met-endostatina livres

Células CHO (1×10^6) expressando (his)₆-met-endostatina foram injetadas, subcutaneamente na região abdominal de camundongos SCID e como controle negativo foram utilizadas células CHO transfectadas com o vetor fechado (sem o gene da endostatina).

O sangue dos camundongos foi coletado uma vez por semana durante quatro semanas. Foram utilizadas pipetas Pasteur de vidro para a coleta via plexo retro-orbital dos camundongos, os tubos contendo o sangue com o anticoagulante foram centrifugados durante 10 minutos a 277 g e o plasma separado e estocado à -20°C para posterior análise da expressão de (his)₆-met-endostatina. Previamente a este trabalho, a transfecção de plasmídeo em células CHO, e alguns clones produtores de altos níveis de endostatina *in vitro* haviam sido selecionados. Três dos clones, produtores dos melhores níveis de endostatina *in*

vitro foram utilizados para a seleção do clone produtor dos melhores níveis de endostatina *in vivo*. O mesmo procedimento acima citado foi utilizado, com os diferentes clones de células expressando endostatina e (his)₆-met-endostatina.

3.2.5.2. Injeção de células CHO expressando (his)₆-met-endostatina nos dispositivos Theracyte e implante dos dispositivos nos camundongos

Segundo os fabricantes da Theracyte[®], em geral as células sobrevivem melhor quando são implantadas junto com o dispositivo. No entanto neste caso existe a possibilidade de que a própria endostatina iniba a formação de neovascularização ao redor do dispositivo, o que dificultaria a oxigenação e, portanto a sobrevivência das células em imunoisolamento. Para minimizarmos essa possibilidade, em um dos tratamentos as células foram transplantadas nos animais somente após a cicatrização do dispositivo pré-implantado nos animais.

A implantação do dispositivo nos camundongos foi realizada utilizando métodos diferentes: no primeiro método os dispositivos foram implantados subcutaneamente no dorso dos camundongos e após a cicatrização foram injetadas as células CHO expressando endostatina no interior do dispositivo. No segundo método os dispositivos foram implantados nos animais já contendo as células em seu interior. Os dois métodos de implantação dos dispositivos foram utilizados para verificarmos em qual das condições são obtidos os melhores resultados de expressão e liberação de (his)₆-met-endostatina.

As células CHO expressando (his)₆-met-endostatina em cultura, passaram por um processo de tripsinização e foram contadas utilizando uma Câmara de Neubauer. Células CHO (1×10^6) foram injetadas nos dispositivos utilizando seringa tipo Hamilton previamente esterilizada.

Os dispositivos foram previamente esterilizados. Os camundongos foram devidamente anestesiados com Xilazina [65 mg/kg] e Quetamina [5 mg/kg]. Foi feita uma incisão na região dorsal dos camundongos, com uma tesoura cirúrgica sem ponta e o tecido subcutâneo foi descolado até que coubesse o dispositivo no dorso do animal, então os dispositivos foram implantados nos camundongos SCID e as suturas com fios cirúrgicos foram feitas.

No primeiro método 17 dias após o implante dos dispositivos, tempo que deveria ser suficiente para cicatrização e formação da vascularização ao redor dos dispositivos implantados (Padera e cols., 1995), 10^6 células produtoras de (his)₆-met-endostatina foram injetadas nos dispositivos utilizando seringa tipo Hamilton, devidamente esterilizada, sendo introduzida pelo catéter no lúmen interno dos dispositivos. Os catéteres foram novamente selados com adesivo de silicone e os animais foram mantidos no biotério, em sala limpa (germ-free).

No segundo método 10^6 células foram injetadas nos dispositivos, os quais foram imediatamente implantados nos animais, utilizando o procedimento descrito acima.

Os camundongos foram mantidos no biotério, em sala limpa (germ-free) durante onze semanas. Uma vez por semana o sangue dos animais foi coletado utilizando pipetas Pasteur de vidro via plexo retro-orbital dos camundongos, e o plasma estocado à -20°C para posterior determinação dos níveis de endostatina no plasma.

Nos dois métodos de implante dos dispositivos após a finalização dos ensaios, os dispositivos foram retirados, mantidos imersos em uma solução de formol a 10% e foram enviados para cortes histológicos e preparação de lâminas histológicas coradas com hematoxilina/eosina.

3.2.6. Cortes histológicos

Os dispositivos foram utilizados para o preparo de lâminas de histologia, realizado nos laboratórios da Faculdade de Medicina da USP. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina/eosina. As lâminas preparadas foram de dispositivos retirados dos camundongos nas 4^a e 6^a semanas do implante.

3.2.7. Determinação de (his)₆-met-endostatina

3.2.7.1. SDS-PAGE

A análise da endostatina e (his)₆-met-endostatina no meio condicionado e no plasma dos camundongos foi realizada por eletroforese a 12% de gel SDS-poliacrilamida sob condições redutoras (Laemmli, 1970). Os volumes das amostras aplicadas nos géis foram normalizados numa proporção inversamente proporcional ao número de células para eliminar variações. Amostras de meio condicionado e de plasmas a serem testados foram aquecidas a 85°C durante 5 minutos na presença de 100 mM DTT e foram aplicadas no gel. Como controle negativo foi utilizado o sobrenadante de células CHO transfectadas com o vetor fechado (sem o gene da endostatina). Foi aplicado também um marcador de massa molecular e a corrida eletroforética foi realizada a 80 volts.

A revelação do SDS-PAGE foi efetuada imergindo o gel em uma solução fixadora (metanol 50%, ácido acético 10% e água 40%) durante 30 minutos, em seguida foi imerso em uma solução com 0,25% de “Comassie blue R250”, 45% metanol e 8% de ácido acético por aproximadamente 1 hora. A seguir o gel foi descorado em uma solução com 10% de ácido glacial acético, sendo realizadas trocas sucessivas.

3.2.7.2 Western Blotting

As amostras para serem analisadas no Western Blotting foram submetidas à SDS-PAGE em seguida foi realizada a transferência das proteínas, do gel para uma membrana de nitrocelulose. A transferência das proteínas foi realizada por eletroeluição do seguinte modo: colocaram-se 2 folhas de papel filtro pré-umedecido em tampão de transferência (0,3% glicina, 0,6% Tris-base, 0,04% SDS, 20% metanol) e em seguida, do pólo positivo para o pólo negativo, colocaram-se a membrana de nitrocelulose, o gel e mais 2 folhas de papel filtro

pré-umedecidas. A corrente foi fixada de acordo com a área de gel (0,85 mA por cm²) para a transferência total das proteínas. A transferência foi realizada por uma hora. A membrana foi lavada com uma solução de PBS contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico) e então foi incubada por 16 horas com o anticorpo policlonal anti-endostatina em uma diluição de 1:250 em PBS contendo leite em pó. Após a incubação foram realizadas 5 lavagens com PBS contendo leite. As reações foram detectadas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase de cavalo (Armehsan Pharmacia Biotech) na diluição de 1:1500 usando o Kit ECL, para detecção de Western Blotting e as membranas foram expostas a filmes radiográficos, sendo estes revelados utilizando soluções fixadora, reveladora e água destilada.

3.2.7.3. Imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica se baseia na conjugação de marcadores com moléculas de imunoglobulinas. Logo que produzida a união antígeno-anticorpo, o marcador é localizado por uma reação tintorial e desta maneira pode ser detectada a estrutura em que se localiza o antígeno. Nos métodos de imuno-histoquímica se utiliza uma reação enzima-substrato que transforma um cromógeno incolor em um produto final corado.

Nos laboratórios da Faculdade de Medicina da USP, foram preparadas lâminas dos cortes dos dispositivos de imunoisolamento Theracyte retirados de camundongos SCID na 6ª semana do implante, utilizando o modelo de implantação do dispositivo juntamente com as células. Para a detecção imuno-histoquímica de endostatina nos cortes histológicos, a recuperação do epítipo induzida pelo aquecimento foi realizada em todas as lâminas por imersão em EDTA 1 mM (pH 8,0) e incubação a 120°C a 25 psi de pressão por 3 minutos. A ligação à endostatina foi realizada utilizando-se um anticorpo policlonal anti-endostatina murina (Chemicon) em uma diluição 1:100 por 20 minutos a 42°C, seguida de incubação com um anticorpo secundário adequado e revelado utilizando um sistema de detecção baseado em diaminobenzidina. Os controles da reação foram realizados na ausência do anticorpo anti-endostatina.

3.2.7.4. Dosagem dos níveis de expressão de endostatina recombinante

A determinação dos níveis de expressão da endostatina recombinante e (his)₆-met-endostatina foi realizada no meio condicionado e no plasma colhido dos camundongos, utilizando-se o kit de ELISA (Chemicon) para quantificação de endostatina murina seguindo instruções do fabricante.

Este ensaio emprega a técnica quantitativa de enzima-imunoensaio com duplo anticorpo. O anticorpo anti-IgG de coelho pré-revestido na placa que tem a função de capturar um complexo específico: endostatina biotinilada, amostra ou padrão e anticorpo anti-endostatina conjugado. A endostatina biotinilada (ligante competitivo) e a amostra ou o padrão competem pelos sítios de ligação do anticorpo específico anti-endostatina. Portanto, quanto maior a quantidade de endostatina nas amostras menor a quantidade de endostatina biotinilada capturada pelo anticorpo. O ensaio foi lido em leitor de ELISA baseado na capacidade do conjugado de streptavidina alcalina fosfatase em desenvolver coloração quando em contato com o agente cromogênico. A concentração de endostatina detectada em cada amostra foi comparada com uma curva padrão de endostatina que demonstra uma relação inversa entre a densidade óptica (D.O.) e a concentração da proteína. A determinação da concentração das amostras de endostatina e (his)₆-met-endostatina foi feita lendo as densidades óticas das amostras em uma curva obtida com amostras padrão de concentrações conhecidas versus suas respectivas densidades óticas. Foram realizadas duplicatas de cada amostra. A geração de cor foi monitorada em leitor de ELISA lendo-se a 490 nm até que o padrão de endostatina dose zero atingisse uma densidade ótica de 1,5 – 2,0.

3.2.8. Atividade biológica

Foi realizado um ensaio de proliferação das células C-PAE (célula endotelial de artéria do pulmão de bezerro), adquirida da ATCC (CCL-209). A

habilidade da (his)₆-met-endostatina em inibir a proliferação de células endoteliais de artéria de bezerro (C-PAE) foi testada pela determinação da porcentagem de incorporação de ³H-timidina. Foi utilizado meio condicionado de células CHO transfectadas com o vetor fechado como controle do ensaio. As células foram mantidas em meio mínimo essencial eagle's (EMEM) suplementado com 20% soro fetal bovino, 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 2 de mM L-glutamina e incubadas em ambiente úmido a 37°C, na presença de 5% CO₂. As incubações foram realizadas em placas de 96-poços com um volume final de 200 µL/poço de EMEM contendo 2% de soro fetal bovino, com concentrações iniciais de células de 5 x 10³ células/poço. Após 24 horas de incubação o meio foi trocado com EMEM fresco contendo 2% de soro fetal bovino e 10 ng/mL de bFGF (fator básico de crescimento de fibroblastos) com ou sem endostatina. As células foram incubadas com 1 µCi [³H-timidina] por 24 horas, seguido pela lise das células e filtração em filtros de fibra de vidro. A radioatividade associada às células foi determinada usando um contador de cintilação líquida.

4. RESULTADOS

4.1. Tratamento de tumores de Ehrlich induzidos em camundongos

O gráfico de espessura dos tumores dos animais apresentando tumores de Ehrlich tratados com células expressando (his)₆-met-endostatina é mostrado na figura 4.

Figura 4. Curvas de crescimento de tumor de Ehrlich em camundongos tratados com células CHO expressando (his)₆-met-endostatina (n = 5 e p = 0,925).

Podem-se verificar no gráfico da figura 4, as curvas obtidas do crescimento tumoral de Ehrlich. Quando comparamos a curva de crescimento tumoral dos camundongos tratados com 5×10^5 células expressando endostatina e a curva dos animais tratados com o mesmo número de células controle, que não produzem endostatina podemos verificar que na média o crescimento foi menor. No entanto, pode-se verificar que, aparentemente, não houve diminuição do crescimento tumoral nos camundongos tratados com $2,5 \times 10^5$ células expressando endostatina, se comparados com o crescimento tumoral obtido nos

camundongos tratados com o mesmo número de células transfectadas com o vetor fechado.

4.2. Tratamento de tumores Melanoma induzidos em camundongos

O gráfico da figura 5 mostra a espessura dos tumores dos animais apresentando melanomas (células B16F10) tratados com células expressando (his)₆-met-endostatina.

Figura 5. Curvas de crescimento de melanomas em camundongos tratados com células CHO expressando endostatina (n = 5 e p = 0,824).

O gráfico da figura 5 mostra as curvas obtidas do crescimento tumoral de melanomas e quando comparamos a curva de crescimento tumoral dos camundongos apresentando melanomas tratados com $2,5 \times 10^5$ e 5×10^5 células expressando (his)₆-met-endostatina e a curva dos animais controle, injetados com solução salina, podemos verificar que na média o crescimento foi menor, mas a

diferença não foi significativa. Durante o experimento muitos camundongos morreram por volta do 10º dia de tratamento, impossibilitando assim a continuidade do tratamento e indicando que o tratamento utilizando as células expressando (his)₆-met-endostatina também não foi eficaz no tratamento dos camundongos apresentando melanoma.

Devido ao fato de que não foram obtidos bons resultados no tratamento de tumores de Ehrlich ou melanoma e de que vários animais morreram durante o experimento quando se utilizou as células “livres” expressando endostatina, optamos por continuar os experimentos sem utilização de tumores nos modelos animais.

4.3. Atividade biológica

O meio condicionado produzido por células de ovário de hamster chinês expressando (his)₆-met-endostatina foi utilizado para avaliarmos a atividade inibitória sobre a proliferação celular de células endoteliais C-PAE utilizando o bFGF como estímulo. O decréscimo da incorporação de ³H-timidina ao DNA celular reflete o efeito inibitório da endostatina murina recombinante sobre a proliferação de células endoteliais, como mostra o gráfico da figura 6. As células endoteliais bovinas obtiveram uma inibição em sua replicação quando utilizamos a proteína recombinante, de um modo dose-dependente. A inibição foi de 0 a 91,4% do controle. A extensão da inibição foi proporcional ao incremento das concentrações de endostatina (de 0,8 a 114 µg/mL). Para termos a certeza de que a inibição do crescimento das células endoteliais fosse causado pelo produto secretado pelas células CHO (endostatina), o meio condicionado de células CHO transfectadas com o vetor pED sem o gene da endostatina, foi testado, sendo de 8% a inibição do crescimento das células C-PAE.

Figura 6. Ensaio de inibição da proliferação celular. Meio condicionado de células CHO (his)₆-met-endostatina (●); Meio condicionado de células CHO vetor fechado (■).

4.4. Injeção de células CHO expressando (his)₆-met-endostatina livres em camundongos

Foi realizado um Western Blotting utilizando-se anticorpo anti-endostatina das amostras de soro dos camundongos cujo sangue foi retirado no 1º dia, 7º dia, 15º dia e 23º dia após a injeção subcutânea de 10^6 células CHO expressando (his)₆-met-endostatina ou CHO transfectada com o vetor sem o gene da endostatina. Na figura 7 podem-se observar as bandas (20 KDa) correspondentes à endostatina presente no soro dos camundongos. Na coluna 2 temos o soro de camundongo com células CHO – Vetor Fechado, não apresentando banda. Nas colunas 4 e 5 observamos as bandas correspondentes à endostatina presente no soro do camundongo nº 1, 15 e 23 dias após a injeção das células e nas colunas 6 e 7 observamos as bandas de endostatina presentes

no soro do camundongo nº 2, 15 e 23 dias após a injeção das células. De acordo com a intensidade das bandas podemos dizer que os camundongos transfectados com as células CHO - (his)₆-met-endostatina apresentam maior quantidade de endostatina do que os camundongos nos quais foram injetadas células sem o gene da endostatina e que a expressão (his)₆-met-endostatina foi maior no 15º dia do que no 23º dia.

No soro dos camundongos tratados com as células livres foram obtidos níveis altíssimos de (his)₆-met-endostatina, chegando a 6,7 µg de endostatina/mL, com 15 dias de injeção, como podemos observar na tabela 1 e figura 8, enquanto o nível de endostatina dosado em camundongos normais foi de 0,45 à 0,53 µg de endostatina/mL.

Figura 7. Western Blotting dos soros dos camundongos nos quais foram injetadas 10⁶ células CHO-vetor fechado e CHO- (his)₆-met-endostatina. **Coluna 1**, controle positivo de endostatina; **Coluna 2**, soro do camundongo com células CHO-VF 7 dias após a injeção das células; **Coluna 3**, soro do camundongo nº 1 no 7º dia após a injeção das células; **Coluna 4**, soro do camundongo nº 1 no 15º dia após a injeção das células; **Coluna 5**, soro de camundongo nº 1 no 23º dia após a injeção das células; **Coluna 6**, soro de camundongo nº 2 no 15º dia após a injeção das células; **Coluna 7**, soro do camundongo nº 2 no 23º dia após a injeção das células.

Tabela 1.

Níveis de endostatina no soro dos camundongos injetados com as células “livres” expressando (his)₆-met-endostatina		
Camundongos nº	Endostatina (µg/mL)	
	Células CHO – (his) ₆ -met-endostatina	Células CHO – VF
1	4,90	0,49
2	6,75	0,45
3	5,32	0,34
Média	5,65 ± 1,0	0,43 ± 0,08

Figura 8. Níveis de endostatina no soro dos camundongos nos quais foram injetadas 10⁶ células CHO “livres”, sem dispositivos de imunisolamento.

4.5. Seleção de clones produtores de altos níveis de (his)₆-met-endostatina

Na tentativa de obtermos altos níveis de expressão de (his)₆-met-endostatina no soro dos animais foram realizados experimentos utilizando três clones de células para seleção daquele que produz maior nível desta proteína no soro dos animais, quando implantado nos dispositivos de imunisolamento Theracyte.

Os níveis de (his)₆-met-endostatina secretados pelas células CHO implantadas nos dispositivos de imunisolamento Theracyte, foram dosados nos plasmas dos camundongos, por Elisa (método imunoenzimático), são apresentados na tabela 2 e na figura 9.

Tabela 2.

Níveis de endostatina no soro de camundongos, nos quais foram injetados diferentes clones de células CHO implantadas nos dispositivos de imunisolamento Theracyte®			
Diferentes Clones	2ª semana µg/mL	4ª semana µg/mL	6ª semana µg/mL
<u>Clone 1</u> – (his) ₆ -met-endostatina	0,33	1,38	3,67
<u>Clone 2</u> – (his) ₆ -met-endostatina	0,25	0,42	0,33
<u>Clone 3</u> - endostatina	0,21	0,26	0,35

Figura 9. Níveis de endostatina no soro de camundongos, nos quais foram injetados diferentes clones de células CHO expressando (his)₆-met-endostatina, implantados anos dispositivos de imunisolamento Theracyte.

Conforme mostrado na tabela 2 e figura 9, foram obtidos os maiores níveis de expressão de (his)₆-met-endostatina com o clone 1 na 4^a e 6^a semanas de ensaio: 1,38 e 3,67 µg/mL respectivamente, sendo que níveis muito inferiores foram obtidos com os dois outros clones e por isso o clone número 1 foi escolhido para os ensaios subseqüentes.

4.6. Implante das células CHO nos dispositivos Theracyte *in vitro*

Nas lâminas histológicas dos dispositivos mantidos *in vitro* durante 4 dias (figura 10) foram observadas células aparentemente viáveis. Podemos observar a presença de células com seus núcleos celulares intactos e a presença de células fixadas na membrana interior dos dispositivos, indicando que essas células estavam aderidas às paredes do dispositivo.

No ensaio em que as células foram retiradas do dispositivo de imunisolamento, as placas de petri foram incubadas durante 6 dias e as colônias foram coradas com solução de Rodamina, foi encontrada 0,2% de viabilidade

celular. De acordo com informações da própria Theracyste, melhores resultados de viabilidade celular são obtidos nos ensaios realizados *in vivo*, com maior sobrevivência celular, quando comparados com as células implantadas no dispositivo e cultivadas *in vitro*.

Com a finalidade de observarmos a expressão e liberação de (his)₆-met-endostatina pelas células CHO expressando endostatina implantadas nos dispositivos, foi realizado um Western Blotting dos sobrenadantes dos meios de cultura colhidos das placas onde ficaram os dispositivos e as células livres. Na figura 11, colunas 2 e 6 respectivamente, observam-se bandas nítidas correspondentes à (his)₆-met-endostatina expressa por 10⁶ células CHO livres em garrafa de 75 cm² em um volume de 7 mL e uma banda mais fraca de (his)₆-met-endostatina expressa pelo mesmo número de células, no mesmo volume, implantadas nos dispositivos. O menor nível de expressão de endostatina secretada pelas células CHO implantadas no dispositivo é provavelmente um reflexo da menor viabilidade das células dentro do dispositivo. A ausência de bandas nas colunas 7 a 9, referentes aos sobrenadantes de 10³, 10⁴ e 10⁵ células, respectivamente, cultivadas por 4 dias no dispositivo, retiradas e cultivadas em placas de cultura, se deve possivelmente à mesma razão: à baixa viabilidade das células que foram cultivadas dentro do dispositivo.

Figura 10. Histologia por coloração de H&E dos dispositivos Theracyte mantidos *in vitro* durante 4 dias. Lâminas analisadas em microscópio óptico utilizando aumento de 20X (A e C) e 40X (B e D). Células aparentemente viáveis no interior dos dispositivos, com a presença de núcleos celulares intactos e células fixadas no interior da membrana dos dispositivos, indicando a viabilidade celular. Com a letra “L” indica-se o lúmen e com as letras “FE” a face externa dos dispositivos.

Figura 11. Western Blotting utilizando anticorpo anti-endostatina dos sobrenadantes de cultura de células CHO – (his)₆-met-endostatina, cultivadas por 4 dias (colunas 2 e 6) ou por 6 dias (colunas 3 a 5 e 7 a 9) . **Coluna 1**, controle positivo de endostatina; **Coluna 2**, sobrenadante da cultura de 10⁶ células cultivadas na garrafa; **Coluna 3**, sobrenadante da cultura de 10³ células; **Coluna 4**, sobrenadante da cultura de 10⁴ células; **Coluna 5**, sobrenadante da cultura de 10⁵ células; **Coluna 6**, sobrenadante da cultura de 10⁶ células implantadas no dispositivo de imunoisolamento; **Coluna 7**, sobrenadante da cultura de 10³ células retiradas do dispositivo; **Coluna 8**, sobrenadante da cultura de 10⁴ células retiradas do dispositivo; **Coluna 9**, sobrenadante da cultura de 10⁵ células retiradas do dispositivo de imunoisolamento.

4.7. Implante das células CHO nos dispositivos Theracyte *in vivo*

Foram realizados experimentos em duas condições: na primeira condição os dispositivos foram implantados e após o prazo de cicatrização (17 dias) as células foram injetadas nos dispositivos pré-implantados nos animais. Na outra condição os dispositivos foram implantados nos animais juntamente com as células.

As lâminas histológicas em que se podem ver as células coradas com hematoxilina/eosina dentro dos dispositivos, implantadas de acordo com a

primeira condição, são mostradas na figura 12. Pode-se observar a presença de núcleos celulares bem definidos e nítidos indicando a viabilidade celular e a grande quantidade de células fixadas na membrana interna dos dispositivos Theracyte quando retirados na 4ª semana (figura 12 A e B) e a 6ª semana (figura 12 C e D) semanas de ensaio. A presença de células aderidas à face interna do dispositivo é uma indicação de que essas células estão viáveis e que provavelmente a oxigenação nesta região, mais próxima da vascularização externa é mais eficaz, o que levaria também a uma maior liberação de endostatina para a circulação.

Figura 12. Histologia das células coradas por H&E dos dispositivos Theracyte mantidos *in vivo*. Lâminas analisadas em Microscópio Óptico utilizando aumento de A – 20X, B, C – 40X e D – 10X. Células aparentemente viáveis no interior dos dispositivos, com a presença de núcleos celulares intactos e células fixadas no interior da membrana dos dispositivos, indicando viabilidade celular. As setas no quadro D indicam a localização dos vasos sanguíneos. Com a letra “L” indica-se o lúmen e com as letras “FE” a face externa dos dispositivos.

Na figura 13 são mostradas as lâminas histológicas dos dispositivos que foram retirados dos camundongos implantados já contendo as células. Na figura 13 A são mostradas as células no interior de um dispositivo retirado do camundongo na 1ª semana de ensaio, onde podemos observar a presença de núcleos celulares nítidos e células fixadas na membrana dos dispositivos

indicando a viabilidade celular. Na figura 13 C podemos observar a lâmina de um dispositivo retirado do camundongo na 3ª semana, onde encontramos também a presença de poucos núcleos celulares nítidos e células fixadas na membrana dos dispositivos. Na figura 13 D, encontramos células fixadas na membrana do dispositivo que indica a viabilidade celular, mesmo havendo passado 11 semanas após a injeção das células no dispositivo. No entanto, aparentemente existem menos células viáveis nessa condição do que quando os dispositivos foram implantados antes das células.

Figura 13. Histologia das células coradas por H&E dos dispositivos Theracyte mantidos *in vivo*, retirados na 1ª, 3ª e 11ª semanas do implante. Lâminas analisadas em microscópio óptico utilizando aumento de A, B e C – 20X e D – 10X. Células aparentemente viáveis no interior dos dispositivos, com a presença de núcleos celulares intactos e células fixadas no interior da membrana dos dispositivos, indicando viabilidade celular. A seta no quadro D indica a localização do vaso sanguíneo. Com a letra “L” indica-se o lúmen dos dispositivos.

Ainda nas figuras 12 e 13 pode-se observar a presença de vasos sanguíneos na vizinhança da face externa do dispositivo, o que é uma indicação de que o esquema de duas lâminas de PTFE com poros de 5 e 0,4 micrômetros realmente estimula a vascularização na vizinhança do dispositivo. A presença de

vasos é importante tanto para a viabilidade das células no interior do dispositivo, quanto para o transporte da endostatina secretada pelas células no dispositivo para a circulação do camundongo.

Os dispositivos Theracyte retirados de camundongos SCID, foram submetidos a cortes histológicos e análise de lâminas coradas por hematoxilina-eosina e por imuno-histoquímica na qual se utilizou o anticorpo policlonal anti-endostatina, para verificar a presença de endostatina nas imediações dos dispositivos. Foram utilizados cortes dos dispositivos com células CHO expressando (his)₆-met-endostatina e dos dispositivos com células CHO-vetor fechado, o qual não expressa endostatina, os dispositivos foram retirados dos camundongos na 6ª semana de ensaio. Nas figuras 14 A e C pode-se observar as células CHO – (his)₆-met-endostatina e CHO-vetor fechado, respectivamente, nos quais foram feitos os controles da imuno-histoquímica, na ausência do anticorpo anti-endostatina e podemos verificar que não houve a formação de reação (coloração marrom). Na figuras 14 B e D se observam os cortes dos dispositivos nos quais foi feita a imuno-histoquímica utilizando o anticorpo anti-endostatina. Podemos verificar que a presença do anticorpo anti-endostatina resultou numa reação à endostatina expressa e secretada pelas células CHO - (his)₆-met-endostatina presentes no dispositivo Theracyte, como mostra a cor marrom das células na face interna do dispositivo em que foram implantadas as células produtoras de endostatina (figura 14 B). A presença de coloração marrom também na face externa do dispositivo demonstra que a endostatina produzida pelas células dentro do dispositivo extravasou do mesmo, alcançando suas imediações.

Na figura 14 D pode-se observar as células CHO-vetor fechado, que não expressam endostatina, no dispositivo que foi retirado de camundongos e não se observa reação dentro do dispositivo, tampouco fora do mesmo, confirmando a ausência de endostatina nesses cortes histológicos.

Esses dados confirmam a histologia das lâminas coradas com hematoxilina/eosina, a qual indica a presença de células viáveis que produzem endostatina.

Figura 14. Histologia por imuno-histoquímica dos dispositivos Theracyte mantidos *in vivo*. Microscópio Óptico utilizando aumento de A e B (células CHO expressando (his)₆-met-endostatina) – 40X e C e D (células CHO-VF) – 20X. A e C, controles da reação de imuno-histoquímica; B e D, reação de imuno-histoquímica utilizando-se o anticorpo anti-endostatina. Com a letra “L” indica-se o lúmen e com as letras “FE” a face externa dos dispositivos.

4.8. Dosagem por ELISA de endostatina no soro dos camundongos

Os níveis de endostatina, dosados por ELISA, no soro dos camundongos com dispositivos de imunisolamento contendo células CHO estão demonstrados na tabela 3 e nas figuras 15 e 16.

Tabela 3.

Níveis de endostatina no soro dos camundongos implantados com dispositivos de imunisolamento Theracyte contendo células CHO expressando (his) ₆ -met-endostatina						
Semanas	Células injetadas após 17 dias do implante dos dispositivos (µg/mL)			Células injetadas junto com os dispositivos (µg/mL)		
	Camundongos			Camundongos		
	1	2	3	1	2	3
1 ^a	0,37	0,85		1,54	1,20	1,35
2 ^a			0,33		1,71	
3 ^a	0,84	1,30			1,72	1,87
4 ^a			1,38			
5 ^a	2,48	2,80				1,65
6 ^a			3,67			
7 ^a						1,74
9 ^a						1,65
11 ^a						2,10
						Camundongo sem injeção de células CHO-endo µg/mL
						Camundongo
						0,43
						0,56

Figura 15. Níveis de endostatina no soro dos camundongos nos quais as células CHO foram introduzidas 17 dias após o implante do dispositivo de imunoisolamento.

Figura 16. Níveis de endostatina no soro dos camundongos nos quais as células CHO foram introduzidas junto com os dispositivos.

Foram obtidos níveis extremamente elevados de (his)₆-met-endostatina no soro dos camundongos tratados com células produtoras de endostatina em imunoisolamento nos dispositivos Theracyte nos dois modos de implante das células. Quando as células expressando endostatina foram injetadas 17 dias após

o implante dos dispositivos, foram obtidos até 3,67 µg de endostatina/mL (tabela 3 e figura 15) na 6ª semana. Quando os dispositivos foram implantados juntamente com as células expressando (his)₆-met-endostatina, obtivemos 1,87 a 2,10 µg de endostatina/mL, este último e mais alto resultado foi determinado no soro após 11 semanas de implantação (tabela 3 e figura 16). É provável que os menores níveis de expressão de endostatina observados no soro dos animais nos quais o dispositivo foi implantando junto com as células deva ao efeito de inibição da própria endostatina sobre a vascularização ao redor do dispositivo com conseqüente taxa menor de sobrevivência das células produtoras de endostatina no interior do dispositivo.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho foram utilizados dois modelos tumorais induzidos em camundongos SCID machos e células CHO expressando altos níveis de (his)₆-met-endostatina *in vitro*. Os tratamentos destes tumores (Ehrlich e Melanoma B16F10) pela injeção de células CHO “livres” expressando (his)₆-met-endostatina não foram eficazes, mesmo com a obtenção de altos níveis da proteína no soro dos animais. Não houve diminuição da taxa do crescimento tumoral e uma das possíveis explicações para a ausência de ação da endostatina pode ser devido a terem sido obtidos níveis extremamente elevados de endostatina no soro dos animais, chegando a 6,7 µg de endostatina/mL. Em trabalhos realizados anteriormente, foi estudado o crescimento de tumores de pâncreas induzidos em camundongos SCID, utilizando a endostatina humana e canina como um fator antiangiogênico. Nestes estudos, foi demonstrado que a melhor atividade da endostatina (fator antiangiogênico) no crescimento tumoral, não é obtida com níveis muito elevados desta proteína no soro dos camundongos, devido à presença de uma curva em “U”, na qual é mostrado que níveis intermediários da proteína são suficientes para retardar o crescimento tumoral. Em Celik e col., 2005, foi demonstrado que níveis muito baixos de endostatina (0,062 µg de endostatina/mL) foram necessários para obtenção do melhor resultado de inibição do crescimento tumoral quando foram injetadas 500 mg/Kg/dia de endostatina humana. Em Tjin Tham Sjin e col., 2006, também foi dosada a concentração de endostatina no soro dos camundongos tratados com a endostatina de origem canina. No intervalo de 0,126 a 0,173 µg de endostatina/mL no soro foi obtido o melhor resultado de inibição de crescimento tumoral. Nestes artigos a concentração de endostatina no soro dos animais que foi efetiva para o tratamento dos tumores está em níveis muito inferiores aos que encontramos no presente trabalho. Além disso, os níveis ótimos de endostatina como fator antiangiogênico variam de tumor para tumor, o que dificultaria a obtenção de regressão tumoral para o nosso sistema. Por esse motivo e também devido ao custo elevado e ao fato de que dispúnhamos de um estoque limitado dos dispositivos TheracYTE, os ensaios de tratamento tumoral utilizando células CHO expressando (his)₆-met-endostatina não foram levados a diante, e continuamos

com os ensaios *in vivo* para obtenção de altos níveis séricos da proteína utilizando as células CHO expressando (his)₆-met-endostatina injetadas nos dispositivos Theracyte.

As células CHO expressando 28 µg de (his)₆-met-endostatina/10⁶ células/24 horas foram mantidas em cultura celular e injetadas em dispositivos de imunisolamento Theracyte cultivados “*in vitro*” durante 4 dias. A amostra de sobrenadante do meio de cultura deste ensaio foi analisada por Western blotting como mostra a figura 9. Foi observada uma banda de (his)₆-met-endostatina demonstrando a expressão desta proteína pelas células CHO implantadas nos dispositivos Theracyte. Esta banda foi mais fraca do que a banda obtida de amostra coletada do meio de cultura sobrenadante das células cultivadas “livres” em garrafas, fato que consideramos esperado. Lâminas de histologia coradas com H&E destas células mantidas nos dispositivos cultivados *in vitro* mostraram a presença de algumas células aparentemente viáveis, com seus núcleos e membranas celulares intactos e poucas células fixadas na face interna dos dispositivos, o que indica uma possível sobrevivência das células no interior dos dispositivos. No mesmo ensaio *in vitro* as células que haviam sido mantidas no interior dos dispositivos foram tripsinizadas, retiradas dos mesmos e avaliadas no teste de formação de colônias para observarmos o grau de sobrevivência das células mantidas nos dispositivos. Somente 0,2% de células estavam viáveis após sua retirada dos dispositivos. Esta baixa viabilidade celular pode ser devido à dificuldade de tripsinização para retirada das células do dispositivo. Além disso, de acordo com a Theracyte[®] melhores resultados de viabilidade celular e de expressão de proteínas heterólogas são obtidos no sistema *in vivo*, pois a vascularização ao redor do dispositivo permite a oxigenação e o transporte de nutrientes e metabólitos necessários para a sobrevivência das células no interior dos dispositivos, o que não ocorre *in vitro*.

Partimos então para ensaios *in vivo* com a injeção de células “livres” em camundongos sem tumores, para verificarmos os níveis de (his)₆-met-endostatina no soro dos animais estudados, nos quais obtivemos resultados excelentes. Os níveis de (his)₆-met-endostatina obtidos no soro dos camundongos chegaram a 6,7 µg de endostatina/mL como mostra a tabela 1. Na literatura foram descritos ensaios em que foram injetadas células “livres” que expressam

proteínas com propriedades terapêuticas e os resultados mostram a baixa expressão destas proteínas quando comparada com a expressão de (his)₆-met-endostatina em nosso trabalho. Brauker e col. em 1998 obtiveram a expressão de 0,1 µg de Fator IX Humano/mL utilizando o mesmo método de injeção de células em animais e Josephs e col. (1999) também utilizando células livres, obtiveram 0,05 µg hormônio de crescimento humano/mL. A baixa expressão pode se dever a uma menor estabilidade da proteína heteróloga nos animais hospedeiros.

Dois modelos de implantação dos dispositivos Theracyte utilizando as células de ovário de hamster chinês expressando (his)₆-met-endostatina nos camundongos imunodeficientes (SCID) foram utilizados, com o intuito de avaliar com qual deles se obtém os maiores níveis de endostatina no soro dos animais. No primeiro modelo, implantaram-se os dispositivos nos animais e aguardou-se o prazo para a cicatrização das feridas, e neovascularização ao redor do dispositivo (17 dias). A seguir injetaram-se as células expressando endostatina. No segundo modelo implantaram-se os dispositivos juntamente com as células nos camundongos. Foram observados altos e crescentes níveis sistêmicos de (his)₆-met-endostatina nos dois modelos utilizando o dispositivo Theracyte. No primeiro modelo obtivemos uma expressão de 2,1 a 3,67 µg de endostatina/mL na 6ª semana de ensaio e no segundo modelo os níveis chegaram a 2,1 µg de endostatina/mL na 11ª semana de ensaio, sendo que o soro de um animal normal (sem dispositivo/células) foi dosado e o nível médio de endostatina endógena obtido foi de 0,45 µg de endostatina /mL. É importante também lembrar que os níveis de endostatina ainda se encontravam em elevação ou estáveis após dois meses do início do tratamento. Em Josephs e col. (1999), utilizando o sistema de terapia por imunisolamento em dispositivos Theracyte, com células expressando hormônio de crescimento humano, mostraram que significantes e constantes níveis da proteína foram detectados no soro dos camundongos ao final de 6 meses de estudos, demonstrando que a secreção da proteína com propriedades terapêuticas pode ser efetiva durante longos períodos de tempo.

Comparando também os dois modelos utilizados de implantação dos dispositivos nos camundongos com relação à viabilidade celular foram preparadas lâminas histológicas coradas com H&E e pudemos observar que no modelo em que as células foram injetadas após o período de cicatrização temos uma

quantidade razoável de células aparentemente viáveis, com seus núcleos e membranas citoplasmáticas intactos e células fixadas na face interna dos dispositivos, indicando a viabilidade celular. No caso da metodologia na qual implantamos as células já dentro do dispositivo, temos uma menor quantidade de células aparentemente viáveis, poucas células com seus núcleos e membranas citoplasmáticas visíveis e também uma menor quantidade de células fixadas na face interna dos dispositivos. Consideramos que a explicação para este fato é a de que a endostatina secretada pelas células CHO-(his)₆-met-endostatina pode ter interferido na vascularização ao redor do dispositivo, agindo negativamente na sobrevivência das mesmas células dentro do dispositivo.

Com o intuito de confirmarmos a expressão de (his)₆-met-endostatina pelas células no interior dos dispositivos, a viabilidade celular destas células e a expressão e liberação de endostatina para as imediações dos dispositivos implantados nos camundongos, foram preparadas lâminas de histologia com cortes dos dispositivos e feita reação de imuno-histoquímica, utilizando o anticorpo policlonal anti-endostatina (figura 14). A análise das lâminas de imuno-histoquímica indica que houve a reação à (his)₆-met-endostatina expressa e secretada pelas células presentes nos dispositivos Theracyte, mostrado a coloração marrom das células no lúmen dos dispositivos e nas imediações do mesmo, que demonstra a liberação da (his)₆-met-endostatina para fora do dispositivo. O mesmo resultado não foi observado no caso das lâminas dos dispositivos com células CHO-VF, em que foi observada ausência de reatividade nas duas faces do dispositivo, confirmando a ausência de endostatina murina nestas amostras. Os dados obtidos nestas lâminas podem corroborar os resultados anteriores de altos níveis de endostatina e as lâminas coradas com H&E que mostram células aparentemente viáveis.

Trabalhos anteriores semelhantes a este, mostraram a utilização dos dispositivos de imunoisolamento da Theracyte, implantados em animais, com a injeção de células recombinantes expressando proteínas com propriedades terapêuticas. Níveis sistêmicos relativamente baixos da expressão da proteína de interesse, por células implantadas nos dispositivos foram descritos por Josephs e col. (1999) e Brauker e col. (1998), que obtiveram 0,002 µg de hormônio de crescimento humano/mL e 0,2 µg de fator IX/mL, respectivamente. Artigos

recentes descrevem a utilização de microcápsulas de alginato, as quais são implantadas na cavidade peritoneal de camundongos, encapsulando células expressando endostatina. Estes trabalhos apresentaram também níveis baixos de endostatina: 0,257 µg/mL descrito por Zhang e col. (2007), 0,194 µg/mL descrito por Zhang e col, (2007) e 0,017 µg/mL descrito por Joki e col. (2001). No presente trabalho, obtivemos níveis muito acima dos citados, sendo que foram utilizados dispositivos de imunoisolamento Theracyte (macrocápsulas), as quais apresentam vantagens em relação às microcápsulas citadas.

O tratamento antitumoral utilizando células CHO expressando (his)₆-met-endostatina implantadas em dispositivos de imunoisolamento é um estudo muito promissor, pois foram obtidos níveis altos e constantes de endostatina no soro dos animais. Uma vantagem da utilização da endostatina é a de poder ser utilizada em diversos tipos de tumores sólidos, tendo em vista que a endostatina atua especificamente em células endoteliais ativadas e não nas células tumorais.

As células de ovário de hamster chinês (CHO) foram utilizadas como sistema de expressão de endostatina no presente trabalho. O animal escolhido como modelo para o transplante de células de CHO expressando endostatina, foi o de camundongos imunodeficientes (SCID), de modo a evitar a rejeição às células de origem xenogenica, pois, como descrito no artigo de Brauker e cols (1988), as células de origem xenogeneica não sobrevivem bem nos dispositivos Theracyte devido à rejeição. Portanto, no caso de um possível tratamento em humanos utilizando este mesmo sistema, células de origem humana deveriam ser utilizadas.

A vantagem do tratamento utilizando as células em imunoisolamento sobre injeções diárias de endostatina é a liberação constante da proteína na circulação, mantendo níveis sistêmicos desta proteína. Com relação ao tratamento utilizando células em imunoisolamento, envoltas em microcápsulas de alginato, a vantagem do sistema aqui descrito é a da possibilidade de retirada dos dispositivos no caso de reações adversas.

Os estudos utilizando este sistema poderão ser aplicados a sistemas semelhantes, utilizando células eucariotas recombinantes para secreção de outras proteínas com propriedades terapêuticas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bbutto, I.A.; Kim, S.Y.; Mcleod, D.S.; Merges, C.; Fukai, N.; Olsen, B.; Luty, G.A. Localization of Collagen XVII and the Endostatin Portion of Collagen XVIII in Aged Human Control Eyes and Eyes with Age-Related Macular Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 45, n. 5, p. 1544-1552.

Benjamin, L.E.; Hemo, I.; Keshet, E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development*, v. 125, n. 9, p. 1591-1598, 1998.

Bergers, G.; Benjamin, L.E. Tumorigenesis and the Angiogenic Switch. *Nature*, v. 3, p. 401-410, 2003.

Bergers, G.; Javaherian, K.; Lo, K.; Folkman, J.; Hanahan, D. Effects of Angiogenesis Inhibitor on Multistage Carcinogenesis in Mice. *Science*, v. 284, p. 808-812, 1999.

Bjerkvig, R.; Read, T. A.; Vajkoczy, P.; Aebischer, P.; Pralong, W.; Platt, S.; Melvik, J. E.; Hagen, A.; Dornish, M. Cell therapy using encapsulated cells producing endostatin. *Acta Neurochirurgica Supplementum*, v. 88, p. 137-141, 2003.

Bloch, W.; Huggel, K.; Sasaki, T.; Grose, R.; Bugnon, P.; Addicks, K.; Timpl, R.; Werner, S. The angiogenesis inhibitor endostatin impairs blood vessel maturation during wound healing. *FASEB Journal*, v. 14, n. 15, p. 2373-2376, 2000.

Boehm, T.; Folkman, J.; Browder, T.; O'Reilly, M.S. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*, v. 390, p. 404-407, 1997.

Brauker, J.H.; Carr, B.V.; Martinson, L.A.; Crudele, J.; Johnston, W.D.; Johnson, R.C. Neovascularization of synthetic membranes directed by membrane microarchitecture. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 29, p. 1517-1524, 1995.

Brauker, J.H.; Frost, G.H.; Dwarki, V.; Nijjar, T.; Chin, R.; Carr-Brendel, V.; Jasunas, C.; Hodget, D.; Stone, W.; Cohen, L.K.; Johnson, R.C. Sustained Expression of High Levels of Human Factor IX from Human Cells Implanted within an Immunoisolation Device into Athymic Rodents. *Human Gene Therapy*, v. 9, p. 879-888, 1998.

Brauker, J.H.; Martinson, L.A.; Young, S.K.; Johnson, R.C. Local inflammatory response around diffusion chambers containing xenografts nonspecific destruction of tissues and decreased local vascularization. **Transplantation**, v. 61, p. 1671-1677, 1996.

Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nature**, v. 6, n. 4, p. 389-395, 2000.

Celik, I.; Sürücü, O.; Dietz, C.; Heymach, J.V.; Force, J.; Höschele, I.; Becker, C.M.; Folkman, J.; Kisker, O. Therapeutic Efficacy of Endostatin Exhibits a Biphasic Dose-Response Curve. **Cancer Research**, v. 65, n. 23, p. 111044-11050, 2005.

Chick, W.L.; Like, A.A.; Lauris, V.; Galletti, P.M.; Richardson, P.D.; Panol, G.; Mix, T.W.; Colton, C.K. A hybrid artificial pancreas. **Transactions - American Society for Artificial Internal Organs**, p. 8-15, 1975.

Chick, W.L.; Perna, J.J.; Lauris, V.; Low, D.; Galletti, P.M.; Panol, G.; Whittemore, A.D.; Like, A.A.; Colton, C.K.; Lysaght, M.J. Artificial pancreas using living beta cells: effects on glucose homeostasis in diabetic rats. **Science**, v. 197, p. 780-782, 1977.

Christian, S.; Pilch, J.; Alkerman, M.E.; Porka, K.; Laakkonen, P.; Ruoslahti, E. Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. **Journal Cell Biology**, v. 163, p. 871-878, 2003.

Chura-Chambi, R.M.; Tornieri, P.H.; Spencer, P.J.; Nascimento, P.A. Mathor, M.B.; Morganti, L. High-level synthesis of recombinant murine endostatin in Chinese hamster ovary cells. **Protein Expression and Purification**, v. 35, p. 11-16, 2004.

Citrin, D.; Lee, A.K.; Scoot, T.; Sproull, M.; Ménard, C.; Tofilon, P.J.; Camphausen, K. *in vivo* tumor imaging in mice with near-infrared labeled endostatin. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 3, n. 4, p. 481-488, 2004.

Conway, E.M.; Collen, D.; Carmeliet, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. **Cardiovascular Research**, v. 49, n. 3, p. 507-521, 2001.

Donovan, D.; Brown, N.J.; Bishop, E.T.; Lewis, C. E. Comparison of three *in vitro* human 'angiogenesis' assays with capillaries formed *in vivo*. **Kluwer Academic Publishers**, v. 4, p. 113-121, 2001.

Dixelius, J.; Larsson, H.; Sasaki, T.; Holmqvist, K.; Lu, L.; Engstrom, A.; Welsh, H.; Claesson-Welsh, L. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the shb

adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. **Blood**, v. 95, p. 3403-3411, 2000.

Dvorak, H.F.; Brown, L.F.; Detmar, M.; Dvorak, A.M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 146, p. 1029-1039, 1995.

Elliott, R.B.; Escobar, L.; Calafiore, R.; Basta, G.; Garkavenko, O.; Vasconcellos A.; Bambra, C. Transplantation of micro and macroencapsulated piglet islet into mice and monkeys. **Transplantation Proceedings**, v. 37, p. 466-469, 2005.

Folkman, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?. **Nature**, v. 6, p. 273-286, 2007.

Folkman, J.; Brem, H. (1992). Angiogenesis and inflammation. In: Inflammation basic principles and clinical correlates. **2th, New York: Raven Press**, p. 821-839, 1992.

Folkman, J. Clinical Application of Research on Angiogenesis. **Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital**, Boston, v. 333, n. 26, p. 1757-1763, 1995.

Garkavenko, O.; Emerich, D.F.; Muzina, M.; Muzina, Z.; Vasconcellos, A.; Ferguson, A.B.; Cooper, I.J.; Elliot, R.B. Xenotransplantation of neonatal porcine liver cells. **Transplantation Proceedings**, v. 37, p. 477-480, 2006.

Good, D.J.; Polverini, P.J.; Rastinejad, F.; Le, B.M.; Lemons, R.S.; Frazier, W.A.; Bouck, N. P. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 6624-6628, 1990.

Hanahan, D.; Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Journal Cell Biothechnology**, v. 86, p. 353-364, 1996.

Hertig, A.T. Angiogenesis in the early human chorion and in the placenta of the macaque monkey. **Carnegie Contribution Embryology**, v. 25, p. 37-81, 1935.

Jain, R. K. Molecular regulation of vessel maturation. **Nature**, v. 9, p. 685-693, 2003.

Joki, T.; Machluf, M.; Atala, A.; Zhu, J.; Seyfried, N.T.; Dunn, I.F.; Abe, T.; Carroll, R. S.; Black, P.McL. Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy. **Nature**, v. 19, p. 35-39, 2001.

Josephs, S.F.; Loudovaris, T.; Dixit, A.; Young, S.K.; Johnson, R.C. In vivo delivery of recombinant human growth hormone from genetically engineered human fibroblasts implanted within Baxter immunoisolation devices. **Journal of Molecular Medicine**, v. 77, p. 211-214, 1999.

Kaufman, R.J. Selection and coamplification of heterologous genes in mammalian cells. **Methods Enzymology**, v. 185, p. 537-566, 1990.

Kerbel, R.; Folkman, J. Clinical Translation of Angiogenesis Inhibitors. **Nature**, v. 2, p. 727-739, 2002.

Kim, K.J.; Hwang, S.; Pyun, B.J.; Kim, T.Y.; Lee, S.T.; Gho, Y.S.; Kwon, Y.P. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/FI-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 27872-27879, 2002.

Kim, K.J.; Li, B.; Winer, J.; Armanini, M.; Gillett, N.; Phillips, H.S.; Ferrara, N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. **Nature**, v. 362, p. 841-844, 1993.

Kisker, O.; Becker, C.M.; Prox, D.; Fannon, M.; D'Amato, R.; Flynn, E.; Fogler, W.E.; Sim, B.K.L.; Alfred, E.N.; Pirie-Shepherd, S.R.; Folkman, J. Continuous Administration of Endostatin by Intraperitoneally Implanted Osmotic Pump Improves the Efficacy and Potency of Therapy in a Mouse Xenograft Tumor Model. **Cancer Research**, v. 61, p. 7669-7674, 2001.

Kong, H.L.; Crystal, R.G. Gene therapy strategies for tumor antiangiogenesis [see comments]. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, p. 273-286, 1998.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

Lee, S.J.; Jang, J.W.; Kim, Y.M.; Lee, H.I.; Jeon, J.Y.; Kwon, Y.G.; Lee, S. T. Endostatin binds to the catalytic domain of matrix metalloproteinase-2. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 519, p. 147-152, 2002.

Lysaght, M.J.; Frydel, B.; Gentile, F.; Emerich, D.; Winn, S. Recent progress in immunoisolated cell therapy. **Journal Cell Biochemistry**, v. 56, p. 196-203, 1994.

Macdonald, N.J.; Shivers, W.Y.; Narun, D.L.; Plum, S.M.; Wingard, J.N.; Fuhrmann, S.R.; Liang, H.; Holland-Linn, J.; Chen, D.H.T.; Sim, B.K.L. Endostatin binds tropomyosin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 27, p. 25190-25196, 2001.

O'Reilly, M.S.; Boehm, T.; Shing, Y.; Fukai, N.; Vasios, G.; Lane, W.S.; Flynn, E.; Birkhead, J.R.; Olsen, B.R.; Folkman, J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell**, v. 88, p. 277-285, 1997.

O'Reilly, M. S.; Holmgren, L.; Shing, Y.; Chen, C.; Rosenthal, R.A., Moses, M.; Lane, W.S.; Cao, Y.; Sage, E.H.; Folkman, J. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. **Cell**, v. 79, p. 315-328, 1994.

Padera, R.F.; Colton, C.K. Time course of membrane microarchitecture-driven neovascularization. **Biomaterials**, v. 17, p. 277-284, 1996.

Parangi, S.; O'Reilly, M.; Christofori, G.; Holmgren, L.; Grosfeld, J.; Folkman, J.; Hanahan, D. Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 2002-2007, 1996.

Pepper, M.S.; Ferrara, N.; Orci, L.; Montesano, R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis *in vitro*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 189, p. 824-831, 1992.

Perletti, G.; Concar, P.; Giardini, R.; Marras, E.; Pccinni, F.; Folkman, J.; Chen, L. Antitumor activity of endostatin against carcinogen-induced rat primary mammary tumors. **Cancer Research**, v. 60, p. 1793-1796, 2000.

Rastinejad, F.; Polverini, P. J.; Bouck, N.P. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. **Cell**, v. 56, p. 345-355, 1989.

Read, T.A.; Sorensen, D.R.; Mahesparan, R.; Enger, P.; Timpl, R.; Olsen, B.R.; Hjelstuen, M.H.B.; Haraldseth, O.; Bjerkvig, R. Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells. **Nature**, v. 391, p. 29-34, 2001.

Ren, B.; Hoti, N.; Rabasseda, X.; Wang, X. Z.; Wu, M. The antiangiogenic and therapeutic implications of endostatin. **Exposure Clinical Pharmacology**, v. 25, n. 3, p. 215-224, 2003.

Ribatti, D.; Ponzoni, M. Antiangiogenic strategies in neuroblastoma. **Cancer Treatment Reviews**, v. 31, p. 27-34, 2005.

Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v. 386, p. 671-674, 1997.

Sasaki, T.; Fukai, N.; Mann, K.; Olsen, B.R.; Timpl, R. Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v.17, n. 15, p. 4249-4256, 1998.

Shichiri, M.; Hirata, Y. Antiangiogenesis signals by endostatin. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 15, p. 1044-1053, 2001.

Shi, H.; Huang, Y.; Zhou, H.; Song, X.; Yuan, S.; Fu, Y.; Luo, Y. Nucleolin is a receptor that mediates antiangiogenic and antitumor activity of endostatin. **Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 110, p. 2899-2906, 2007.

Shweiki, D.; Itin, A.; Soffer, D.; Keshet, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. **Nature**, v. 359, p. 843-845, 1992.

Sottile, J. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. **Science**, v. 1654, p. 13-22, 2003.

Tandle, A.; Blazer, D.G.; Libutti, S.K. Antiangiogenic gene therapy of cancer: recent developments. **Journal of Translational Medicine**, v. 2, p. 1-20, 2004.

Tarta, C.; Teixeira, C.R.; Silva, V.D.; Chiele, N.C.C.; Prolla, J.C.; Gus, P. Angiogênese no Carcinoma Colorretal – Revisão e Perspectivas. **Revista Brasileira de Proctologia**, v. 20, n. 4, p. 227-230, 2000.

Teng, H.; Zhang, Y.; Wang, W.; Ma, X.; Fei, J. Inhibition of Tumor Growth in Mice by Endostatin Derived from Abdominal Transplanted Encapsulated Cells. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 39, p. 278-284, 2007.

Tjin Tham Sjin, R.M.; Naspinski, J.; Birsner, A.E.; Li, C.; Chan, R.; Lo, K-M.; Gillies, S.; Zurakowski, D.; Folkman, J.; Samulski, J.; Javaherian, K. Endostatin therapy reveals a U-shaped curve for antitumor activity. **Cancer Gene Therapy**, v. 13, p. 619-627, 2006.

Vos, P.; Faas, M.M.; Strand, B.; Calafiore, R. Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. **Biomaterials**, v. 27, p. 5603-5617, 2006.

Yanay, O.; Barry, S.C.; Flint, L.Y.; Brzezinski, M.; Barton, R.W. e Osborne, W.R.A. Long-term erythropoietin gene expression from transduced cells in bioisolator devices. **Human Gene Therapy**, v. 14, p. 1587-1593, 2003.

Zatterstrom, U.K.; Felbor, U.; Naomi, F.; Olsen, B.R. Collagen XVIII/Endostatin Structure and Functional Role in Angiogenesis. ***Japan Society for Cell Biology***, v. 25, p. 97-101, 2000.

Zetter, B.R. Angiogenesis and tumor metastasis. ***Annual Review of Medicine***, p. 407-427, 1998.

Zhang, Y.; Wang, W.; Xie, Y.; Yu, W.; Teng, H.; Liu, X.; Zhang, X.; Guo, X.; Fei, J.; Ma, X. In vivo Culture of Encapsulated Endostatin-Secreting Chinese Hamster Ovary Cells for Systemic Tumor Inhibition. ***Human Gene Therapy***, v. 18, p. 474-481, 2007.

Zhang, Y.; Wang, W.; Zhou, J.; Yu, W.; Zhang, X.; Guo, X.; Ma, X. Tumor Anti-angiogenic Gene Therapy with Microencapsulated Recombinant CHO Cells. ***Annals of Biomedical Engineering***, v. 4, p. 605-614, 2007.

Projeto financiado pela FAPESP (Processo 00/04658-0).

Bolsa de estudos financiada pelo CNPq.