INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**TERAPIA ANTIANGIOGÊNICA DE TUMORES UTILIZANDO
CÉLULAS PRODUTORAS DE ENDOSTATINA ENCAPSULADAS EM
DISPOSITIVOS DE IMUNOISOLAMENTO.**

DANIELLE BORIM RODRIGUES

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

Orientadora:

Lígia Ely Morganti Ferreira Dias

SÃO PAULO

2008

Às minhas avós, exemplo de vida, e aos meus
pais, sempre presentes.

AGRADECIMENTOS

À orientadora Dra. Lúcia Ely Morganti Ferreira Dias pelo voto de confiança, incentivo, pela fundamental contribuição no desenvolvimento deste trabalho e pelos ensinamentos.

Ao professor Dr. Roger Chammas pelos ensinamentos, pela ampla ajuda e colaboração, auxiliando enormemente na execução deste trabalho.

À Patrícia Luiza Nunes da Costa pela grande ajuda e apoio na execução dos experimentos realizados na Faculdade de Medicina, da qual surgiu uma grande amizade. A todos os amigos da FMUSP que também estiveram presentes na execução deste.

À Natália, Keli e Rosa, grandes amigas e colegas de bancada, pela imensa ajuda, pelos incentivos, lamentações, risadas e pela companhia no dia a dia ao longo de toda esta etapa.

À Juliana e Camila pela presença, dicas, ajudas e grande amizade.

Ao Daniel Perez e Elier Cristo pelas valiosas dicas.

À “Neidinha” pelo auxílio e por todos os cuidados com os animais do biotério no IPEN e à Cláudia do biotério da Faculdade de Veterinária da Universidade de São Paulo.

A todos os orientadores do Centro de Biotecnologia do IPEN que de alguma maneira contribuíram neste trabalho.

Aos animais que contribuem para o avanço dos conhecimentos.

Aos demais amigos e companheiros de estudo: Bia, Bruno Simões, Claudinha, Cris, Eduardo, Flavinha, Felipe Lino, Jana, Alberto, Johnny, Karina, Kiki, Marcos Júnior, Murilo, Mosca, Priscila, Renata, Rodrigo Teodoro, Tais, Tiago, Solange, Susana..e todos os demais, simplesmente por serem amigos e por fazerem das horas, agradáveis momentos no laboratório e fora deste.

À grande amiga de faculdade Talita Rojas Sanches, pela ajuda e por sempre estar presente em todas as etapas deste processo.

Aos amigos, presentes e distantes, que de alguma maneira contribuíram na finalização de mais uma etapa da minha vida.

Ao André pelo amor, apoio e pela presença.

À vovó Vilma, pelo exemplo de mulher, à vovó Guigui por toda a sua imensurável sabedoria e por ser um exemplo de ser humano. À minha mãe, por ser mãe e por estar sempre presente. Meu pai, por ser um exemplo, um incentivo, um orgulho e por me dar a oportunidade de concluir mais um passo da minha jornada. À toda minha família.

Ao programa de Pós-Graduação da USP e do Instituto de pesquisas Energéticas e Nucleares e seus professores.

Ao Centro de Biotecnologia pelo espaço e por fornecer todos os subsídios necessários para a execução deste trabalho.

A Capes e Fapesp pelo auxílio financeiro.

TERAPIA ANTIANGIOGÊNICA DE TUMORES UTILIZANDO CÉLULAS PRODUTORAS DE ENDOSTATINA ENCAPSULADAS EM DISPOSITIVOS DE IMUNOISOLAMENTO.

Danielle Borim Rodrigues

RESUMO

Endostatina é um inibidor específico de proliferação de células endoteliais, migração e um potente inibidor de angiogênese. Foi demonstrado que a administração contínua de endostatina é mais efetiva na supressão tumoral do que a mesma dose administrada s.c. diariamente. Encontrar a concentração de endostatina para combater o crescimento tumoral é complicado pela pequena meia vida da proteína. O transplante de células encapsuladas em dispositivos de imunoisolamento é uma abordagem promissora para muitas doenças, pois permite uma liberação por longo tempo da proteína com propriedades terapêuticas. A membrana semipermeável pode proteger as células da rejeição do sistema imune, para evitar o problema de toxicidade, meia vida limitada e variação nos níveis circulantes. O dispositivo Theracyte[®] é um sistema de membranas semipermeáveis para macroencapsulamento que permite o implante de células geneticamente modificadas para liberação de proteínas terapêuticas *in vivo* sem a necessidade de imunossupressão do hospedeiro. Foi demonstrado neste estudo que fibroblastos murinos (células LM) expressando 0,4 µg de endostatina murina/10⁶ células em 24 horas se apresentam como uma abordagem promissora para terapia tumoral. O sistema de liberação é composto de células LM produtoras de endostatina encapsuladas em macrocápsulas Theracyte para imunoisolamento de células. Para demonstrar a utilidade deste sistema, modelos de camundongos com tumores de Ehrlich e melanoma foram tratados com 10⁷ células encapsuladas expressando endostatina. Foram analisados dois protocolos para o implante dos dispositivos: No primeiro, os dispositivos foram implantados nos animais e após 14 dias (cicatrização das feridas), as células expressando endostatina foram implantadas no interior destes dispositivos. Em um segundo, os dispositivos contendo as células foram implantados nos animais. O crescimento do tumor melanoma foi reduzido de 42% pela utilização do primeiro protocolo de implante e de 54% quando o segundo protocolo foi utilizado. O crescimento do tumor de Ehrlich foi reduzido de 25% utilizando o primeiro protocolo de implante. A imunohistoquímica utilizando anticorpo anti-endostatina demonstrou a liberação da endostatina para o estroma ao redor do dispositivo, mostrando que a endostatina, secretada pelas células recombinantes confinadas permeou através da membrana, atingindo os tecidos adjacentes. A efetividade da ação da endostatina na neovascularização de melanoma (B16-F10) foi determinada pela análise do número de estruturas vasculares, analisadas por imunohistoquímica utilizando anticorpo anti-CD34. Foi demonstrado um decréscimo de 41,5% no número de estruturas vasculares, 35,9% no número de vasos viáveis e de 33,5% na extensão da área vascular no grupo tratado. Os resultados descritos são promissores e podem oferecer uma alternativa para uma variedade de tipos de tumores.

ANTIANGIOGENIC THERAPY USING ENDOSTATIN PRODUCER CELLS ENCAPSULATED IN IMMUNOISOLATION DEVICES.

Danielle Borim Rodrigues

ABSTRACT

Endostatin is a specific inhibitor of endothelial cell proliferation, migration and a potent angiogenesis inhibitor. It has been shown that continuous administration of endostatin is more effective in tumor suppression than the same dose administered s.c. daily. Achieving concentration of endostatin to combat tumor growth is complicated by the short life of the protein. Transplantation of encapsulated cells in immunoisolation devices is a promising approach for many diseases since it allows a long-term delivery of the therapeutic protein and the semi-permeable membrane can protect cell from host's immune rejection, to circumvent the problem of toxicity, limited half life and variation in circulating levels. The Theracyte[®] device is a semi-permeable membrane macro-encapsulation system for implantation of genetically engineered cells for therapeutic proteins delivery *in vivo* and which does not require host immunosuppression. It was shown in this study that encapsulated recombinant murine fibroblasts (LM) expressing 0.4 μ g of murine endostatin/10⁶ cells in 24 hours presents a feasible approach to tumor therapy. The delivery system was composed of recombinant endostatin-producing LM murine cells encapsulated into Theracyte macrocapsule for immunoisolation of cells. To demonstrate the usefulness of this system, experimental mice models with Ehrlich and Melanoma tumors were treated with 10⁷ encapsulated endostatin-expressing cells. Two protocols were used for the implant of the devices: 1) The devices were implanted in the animals and after 14 days (wound healing), the cells expressing endostatin were implanted into the device and 2) the devices were implanted in the animals containing the cells. Melanoma tumor growth was reduced by 42% using the first implant protocol and by 54% when the second protocol was used. Ehrlich tumor growth was reduced by 25% using the first device implant protocol. As revealed by anti-endostatin immunostaining, there was a release of endostatin to the tissue outside the devices, demonstrating that endostatin, secreted by the confined recombinant cells, permeated through the membrane, reaching the surrounding tissues. The effectiveness of endostatin delivery on the neovascularization of melanoma (B16-F10) was determined by analysis of the number of vascular structures, accessed by immunohistochemistry using anti-CD-34 antibody. It was shown that there was a decrease of 41.5% in the number of vascular structures, 35.9% in the number of viable vessels and 33.5% in the extension of vascular area in the treated group. The results described are quite promising and may offer an alternative for the treatment of a variety of tumor types.

LISTA DE ABREVIATURAS

bFGF- Fator de crescimento de fibroblasto básico.

DAB - 3-3' Diaminobenzidina tetrahidrocloro.

DEPC- Dietil pirocarbonato.

DMSO- Dimetilsulfóxido.

D.O.- Densidade ótica.

EDTA- Ácido etileno diamino tetraacético.

EOMA- Hemangiotelioma

ELISA- Ensaio imunoenzimático de ligação enzimática

FGF- Fator de crescimento de fibroblasto.

H₂O₂- Peróxido de hidrogênio.

HUVEC-EC-C - Células endoteliais normais do cordão umbilical humano.

INF α - Interferon α .

IL- Interleucina

LM(pSecTag) - Fibroblastos murinos transfectados com o vetor pSecTag.

LM(pSecTag)- endo – Fibroblastos murinos transfectados com o vetor pSecTag contendo o gene da endostatina.

LM(tk-) – Fibroblastos murinos.

MOPS - 3-(N-morfolino)-ácido propanosulfônico.

MTS- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazólico).

PBS- Tampão fosfato salina.

PCR- Reação em cadeia da polimerase.

PCR em tempo real- Reação em cadeia da polimerase em tempo real.

PDGF- Fator de crescimento derivado de plaquetas.

PEDF- Fator de pigmento derivado do epitélio.

PTFE- Politetrafluoretileno.

SFB (s.f.b.)- Soro fetal bovino.

TEB - Tris-HCl, EDTA e ácido bórico.

TGF- Fator de crescimento tumoral.

VEGF- Fator de crescimento de endotélio vascular.

VEGF A- Fator de crescimento de endotélio vascular (A).

VPF- Fator de permeabilidade vascular

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	01
2.	OBJETIVO.....	12
2.1-	Objetivo Geral.....	12
2.2-	Objetivos Específicos.....	12
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1-	MATERIAIS.....	13
3.1.1 -	Equipamentos principais.....	13
3.1.2 –	Materiais e reagentes.....	14
3.1.2.1-	Cultura celular	14
3.1.2.2-	Ensaio <i>in vivo</i>	16
3.1.2.3-	Ensaio de dosagem de endostatina e de cDNA de VEGF.....	16
3.1.2.4-	Imunohistoquímica.....	17
3.1.3-	Ferramentas de Bioinformática.....	18

3.2-	MÉTODOS.....	19
3.2.1-	Obtenção do clone LM (pSecTag)- endo.....	19
3.2.2 –	Manutenção das células em cultura	19
3.2.3 -	Análise ação da endostatina sobre a viabilidade de células endoteliais.....	20
3.2.4-	Inoculação das células tumorais nos animais.....	21
3.2.5 -	Tratamento dos camundongos com tumores pelo implante das células LM(pSecTag)-endo.....	22
3.2.6-	Dosagem da Endostatina nos soros dos animais.....	28
3.2.7-	Análise histológica e imunohistoquímica dos tumores e dos dispositivos.....	28
3.2.8 –	Análise da expressão das diferentes isoformas de VEGF murino.....	31
4.	RESULTADOS.....	35
4.1-	Análise da ação da endostatina sobre a viabilidade de células endoteliais.....	35
4.2-	Inoculação das células do tumor de Ehrlich.....	36
4.3 -	Tratamento dos camundongos com tumores pelo implante de células LM(pSecTag)-endo.....	37
4.3.1-	Tratamento pelo implante de células LM(pSecTag)-endo inoculadas livremente.....	37
4.3.2-	Tratamento pelo implante de células LM(pSecTag)-endo em dispositivos de imunisolamento pré-implantados.....	43

4.3.3- Tratamento pelo implante de células LM(pSecTag)-endo inoculadas no dispositivos de imunoisolamento.....	48
4.4- Dosagem da endostatina nos soros dos animais.....	51
4.5- Análise histológica e imunohistoquímica dos tumores, dos dispositivos e dos vasos sanguíneos	53
4.6 - Análise da expressão das diferentes isoformas de VEGF murino.....	58
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÃO.....	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

Cânceres são doenças genéticas resultantes de mutações acumuladas no genoma. Essas mutações estão associadas ao descontrole de funções essenciais como a proliferação, diferenciação e morte celular, gerando células cujo genoma apresenta-se instável. Hanahan e cols. (2000) classificaram essas características em seis grupos: auto-suficiência quanto aos fatores de crescimento, insensibilidade a fatores inibitórios de proliferação, evasão de apoptose, potencial replicativo infinito, invasão tecidual e metástase, e angiogênese sustentada (Melo e cols., 2003).

Durante a embriogênese os vasos sanguíneos se desenvolvem mediante dois tipos de processos: a vasculogênese, que ocorre na embriogênese e consiste no processo de diferenciação inicial de células mesenquimais em hemangioblastos (que são os precursores das células endoteliais e sanguíneas depois da segregação com a mesoderme); e a angiogênese, formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. A angiogênese é um processo necessário tanto para a embriogênese como para o crescimento somático, cicatrização, regeneração de órgãos e tecidos, crescimento do corpo lúteo e do endotélio, consiste em uma cascata de processos que se refere basicamente na degradação da matriz extracelular, proliferação e migração das células endoteliais (capilares). O desenvolvimento dos vasos sanguíneos pode gerar a angiogênese patológica auxiliando, por exemplo, o crescimento de tumores. A hipótese de que o crescimento de tumores e metástases são dependentes de angiogênese foi primeiramente proposta por Judah Folkman em 1971 (Folkman, 1971; Folkman, 1995). Esta hipótese é hoje em dia apoiada por extensas evidências experimentais.

Em um estágio pré-vascular, as células tumorais podem obter nutrientes e oxigênio por difusão passiva na distância aproximada de 0,2 a 0,5 mm levando a um crescimento tumoral de aproximadamente 2 a 3 mm³, contendo alguns milhões de células. A taxa de crescimento de células em tumores sem neovascularização fica em equilíbrio com a sua taxa de mortalidade. Os novos vasos sanguíneos suprem as células tumorais de oxigênio, nutrientes e remove os produtos de seu metabolismo, com isso, tem-se o crescimento dos tumores, o que

pode inclusive facilitar a formação de metástases. Ao contrário da angiogênese vista em tecidos normais, a angiogênese tumoral apresenta vasos vazantes, diâmetros irregulares, paredes finas, fluxo sanguíneo aberrante e áreas de necrose. Também são observadas diferenças com relação à expressão de moléculas de superfície das células endoteliais dos vasos sanguíneos tumorais e normais. (Melo e cols., 2003; Folkman, 1995).

O balanço entre os fatores pró e antiangiogênicos controla a geração de novos vasos e, portanto, o suplemento sanguíneo no tecido. Moléculas que estimulam a angiogênese podem ser geradas pelas células normais e também células tumorais devido a estímulos como: inflamações, hipóxia e presença de tumores. Exemplo destas moléculas são os Fatores de Crescimento de Fibroblastos (FGF), Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF), Angiopoitina (Ang 1), Fator de Crescimento Tumoral (TGF) e Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF). A liberação endógena de fatores inibitórios da angiogênese, dentre eles: interferons, angiostatina (fragmento proteolítico derivado do plasminogênio), endostatina (fragmento proteolítico derivado do colágeno XIII) e trombospondina (derivado do colágeno IV), podem ocorrer sob condições fisiológicas ou patológicas (Geller e cols., 1997 [A]; Good e cols., 1990; O'Reilly e cols., 1994; O'Reilly e cols., 1997). A formação de novos vasos sanguíneos é decorrente do desequilíbrio desses fatores gerados por alterações dos fatores genéticos e ambientais. A inibição das condições necessárias para a formação de novos vasos sanguíneos pode ser uma estratégia para diminuir o crescimento tumoral. Assim, as células endoteliais, recrutadas por células tumorais, se tornaram importantes alvos em terapias antitumorais (Bergers e cols., 2003; Geller e cols., 1997 [A]; Geller e cols., 1997 [B]). Uma vantagem deste tipo de tratamento é a possibilidade de efetividade para diferentes tipos de tumores sólidos dependentes de angiogênese, pois o alvo da terapia não seriam as células tumorais, que possuem características heterogêneas. Outra vantagem seria a maior estabilidade genética das células alvo, as células endoteliais, se comparadas às células tumorais. Além disso, a expressão de moléculas específicas na vascularização tumoral sugere que esses vasos poderiam ser seletivamente destruídos sem afetar a integridade dos vasos normais (Geller e cols., 1997 [A]; Melo e cols., 2003). Vale ressaltar que tumores são microambientes heterogêneos que apresentam, além do tecido tumoral, as células estromais (fibroblastos, adipócitos, células da musculatura lisa, do sistema imune e inflamatórias) e que juntos, participam do processo de progressão tumoral (Hanahan e cols., 2000).

De acordo com Shimizu e cols. (2004), as terapias antiangiogênicas podem ser subdivididas em diversos tipos considerando a característica dos inibidores de angiogênese como, por exemplo, a terapia por bloqueio de integrinas, terapia por inibidores pró-angiogênicos, terapia antineovascular, terapia baseada em outros inibidores e a terapia antiangiogênica endógena, que se baseia na elevação dos fatores antiangiogênicos para suprimir o crescimento tumoral.

Fatores antiangiogênicos vêm sendo amplamente estudados (Celik e cols., 2005; Shimizu e cols., 2004). Dentre eles tem-se a endostatina, um fragmento proteolítico de 20 kDa com 184 aminoácidos, cuja seqüência NH₂-terminal corresponde à porção COOH-terminal do colágeno XIII (figura 1). Esta proteína foi primeiramente isolada de uma linhagem celular de hemangiotelioma murino (EOMA) (O'Reilly e cols., 1997) e apresenta vantagens devido às suas propriedades de inibir a proliferação, migração e permeabilidade das células endoteliais, e induzir apoptose de células endoteliais em proliferação (alterando a densidade e diâmetro vascular). Esta proteína é caracterizada como inibidor endógeno específico para células endoteliais em angiogênese e apresenta baixa toxicidade (Boehm e cols., 1997; Dhanabal e cols., 1999 [A]; Herbst e cols., 2002; O'Reilly e cols., 1997). Foi demonstrado que esta endostatina recombinante, tanto na forma solúvel como insolúvel, induz indiretamente a inibição do crescimento de uma variedade de modelos tumorais, tanto utilizada sozinha, quanto em combinação com terapias convencionais (O'Reilly e cols., 1997). Foi evidenciado que o tratamento com endostatina murina (20 mg/Kg/dia) levou à quase completa regressão (estado de microtumores) de diferentes modelos tumorais estabelecidos como, por exemplo: carcinoma de pulmão de Lewis, fibrosarcoma T241, hemangiotelioma (EOMA) e melanoma (Dhanabal e cols., 1999 [B]; O'Reilly e cols., 1997).

Apesar do seu mecanismo de ação ainda permanecer incerto, Mac Donald e cols. (2001) demonstraram que a endostatina se liga a microfilamentos de tropomiosina presente na superfície das células endoteliais, o que resulta em rompimento da integridade destes, levando à inibição da mobilidade celular, indução de apoptose e, conseqüentemente, inibição do crescimento tumoral. Recentemente, Shi e cols. (2007) confirmaram que a endostatina se liga, com alta afinidade, ao receptor nucleolina também presente na superfície de células endoteliais de vasos sangüíneos em angiogênese no microambiente tumoral. A nucleolina se localiza na superfície das células endoteliais em angiogênese e não daquelas em estado quiescente. Desta maneira, ocorre a internalização e o transporte da endostatina para o núcleo

celular, onde acontece a inibição da fosforilação da nucleolina, processo crítico para a proliferação celular. Alguns trabalhos descrevem a ação da endostatina, na inibição do crescimento tumoral em animais, como uma proteína dose-dependente, ou seja, para um melhor resultado, necessita-se de uma maior quantidade de endostatina (Dhanabal e cols., 1999 [A]; Herbst e cols., 2002; Feldman e cols., 2001). No entanto, artigos recentes demonstraram que a endostatina não age na forma dose-dependente, mas sim na forma de curva dose-resposta bifásica com formato em sino, onde observa-se uma maior eficácia na diminuição do crescimento tumoral utilizando doses intermediárias (entre uma baixa e uma alta concentração da proteína). Tal concentração apresentou-se desigual para diferentes modelos tumorais, ratificando a hipótese de que existe variação do efeito de acordo com as características específicas de cada tumor (Celik e cols., 2005; Tjin Tham Sjin e cols., 2006). Existe um fator complicador para a obtenção da concentração ideal de endostatina no tratamento de tumores que é a baixa meia vida de sete horas desta no organismo (Joki e cols., 2001). Assim, para uma maior eficiência da ação da endostatina, o ideal é utilizar um sistema que mantenha a concentração sistêmica constante no organismo, pois já foi comprovado que os inibidores de angiogênese apresentam maior eficácia quando ministrados de tal maneira, ao contrário da injeção de uma única dose, que provoca um pico do nível desta proteína no plasma (Joki e cols., 2001; Kisker e cols., 2001; Read e cols., 2001 [A]). Alguns artigos já descreveram sistemas de liberação contínua de endostatina, empregando diversos métodos incluindo o transplante de células recombinantes produtoras desta proteína (Read e cols., 2001[A]; Read e cols., 2001[B]; Zhang e cols., 2007; Zhang e cols., 2008), transdução de células com vetores virais e retrovirais contendo o gene da endostatina (Coutinho e cols., 2007; Feldman e cols., 2001; Wang e cols., 2002; Yamanaka e cols., 2001), o uso de bomba osmótica para a liberação de endostatina (Kisker e cols., 2001) métodos estes capazes de manter níveis constantes desta proteína no plasma para tratamento de tumores (Zhang e cols., 2007; Zhang e cols., 2008).

Figura 1: Figura representando a estrutura da endostatina, um fragmento proteolítico do colágeno XVIII com 184 resíduos de aminoácidos e duas pontes disulfídicas em um padrão de ninho. A sua estrutura é composta fundamentalmente de folhas β (em azul), mas também possui duas α hélices (vermelho) e, em amarelo as pontes disulfídicas. A endostatina se dobra em um domínio globular simples e compacto (Hohenester e cols., 1998).

O transplante de células primárias ou células geneticamente modificadas de origem xenogênica ou alogênica é uma alternativa para a liberação regular e com capacidade potencial para tratar diversas doenças. No entanto, a aplicação clínica do transplante de células permanece limitada, em parte, pelos efeitos deletérios de regimes de imunossupressão, necessários para prevenir a rejeição de células transplantadas. A necessidade de imunossupressão poderia ser eliminada se as células e tecidos transplantados fossem isolados fisicamente do sistema imune do hospedeiro utilizando membranas semipermeáveis ou dispositivos de imunisolamento. Pesquisas têm sido focadas no desenho e aplicações de dispositivos de imunisolamento capazes de proteger células alogênicas e xenogênicas do sistema imune do hospedeiro, enquanto facilitam o transporte adequado de oxigênio, nutrientes e moléculas terapêuticas secretadas (Josephs e cols., 1999; Joki e cols., 2001; Peirone e cols., 1998; Read e cols., 2001 [A]; Read e cols., 2001[B]; Zhang e cols., 2007). A terapia por imunisolamento baseia-se 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 restringe a passagem de moléculas maiores e células do sistema imune do hospedeiro, permitindo assim, o transplante de células que normalmente seriam rejeitadas pelo sistema imune do indivíduo para produzirem a proteína com propriedades terapêuticas sem a necessidade de imunossupressão (Josephs e cols., 1999).

Os primeiros dispositivos de imunoisolamento (ou biohíbridos) descritos foram aqueles contendo ilhotas de Langherans xenogênicas para o tratamento de diabetes, tipo-1, dependente de insulina (De Vos e cols., 2002; Chick e cols., 1975; Chick e cols., 1977). Já foram também descritos biohíbridos baseados em linhagens celulares geneticamente modificadas para produção de proteínas recombinantes: fator IX para utilização em tratamento de hemofilia B (Hortelano e cols., 1996), eritropoetina no tratamento de anemia (Dalle e cols., 1999; Regulier e cols., 1998), hormônio de crescimento para tratamento de nanismo (Brauker e cols., 1995), IL-4 e IL-3 para tratamento da artrite induzida por colágeno em camundongos (Bessis e cols., 1999) e endostatina para o tratamento de tumores (Joki e cols., 2001; Kisker e cols., 2001; Read e cols., 2001[A]; Read e cols., 2001[B]). Os tipos de dispositivos para imunoisolamento de células mais citados na literatura são:

- As microcápsulas, no qual as células são imobilizadas em hidrogel e envoltas por membranas seletivamente permeáveis. As microcápsulas são injetadas no músculo, no tecido subcutâneo ou no peritônio. A variação do tipo de alginato usado, processo de encapsulamento, linhagem celular transfectada e a estabilidade desta podem afetar a expressão da proteína de interesse. Uma desvantagem é que este tipo de dispositivo não pode ser retirado no caso de efeitos colaterais (Joki e cols., 2001; Lysaght e cols., 1994; Read e cols., 2001[B]; Teng e cols., 2007).
- As macrocápsulas, que são implantes macroscópicos feitos de membranas semipermeáveis onde ficam retidas as células. Podem ser implantadas subcutânea ou intraperitonealmente. Para o encapsulamento das células, as macrocápsulas são feitas de material polimérico semipermeável, biologicamente inerte e resistente, de maneira que não ocorra vazamento de material. Uma grande vantagem do uso de macrocápsulas é a

possibilidade de retirada no caso de efeitos indesejáveis ou quando o tratamento for completado (Morris e cols., 1996).

Brauker e cols. (1995) e Josephs e cols. (1999), demonstraram, por meio de análises histológicas, que quando uma variedade de diferentes materiais (acetato de celulose, ésteres mistos de celulose, politetrafluoretileno (PTFE) e copolímeros de acrílico), com poros pequenos (até 0,8 μm), foram implantados subcutaneamente em ratos, houve a formação de tecido fibrótico com espessura de 30 a 100 μm ao redor do polímero. Este tecido fibrótico aumenta a distância entre os vasos sangüíneos e as células no interior no implante, levando as células heterólogas à hipóxia, mas, 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), houve uma neovascularização na interface membrana/tecido. Ao utilizarem a membrana de PTFE apresentando diferentes tamanhos de poros, observou-se que 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. Isto foi observado mesmo quando utilizaram a membrana de poros maiores laminada com uma membrana com poros menores, que tem a propriedade de barrar a entrada de células do hospedeiro no protótipo de dispositivo de imunoisolamento. Observaram também que o nível maior de vascularização foi mantido por no mínimo um ano no tecido subcutâneo dos animais. Dessa maneira a deficiência no fornecimento de oxigênio às células no interior dos dispositivos de imunoisolamento, 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 neovascularização na interface membrana de biomaterial/tecido do hospedeiro. Brauker e cols. (1996), utilizando este sistema de dispositivos de imunoisolamento com duas lâminas, demonstraram a viabilidade de células isogênicas e alogênicas (células embrionárias de pulmão de ratos Sprague-Dawley implantadas em ratos Lewis) no dispositivo *in vivo* durante pelo menos um ano. Assim, para um efetivo tratamento com os fibroblastos murinos produtores de endostatina optou-se por utilizar o sistema de imunoisolamento fornecido pela TheraCyte®: uma macrocápsula com volume interno nominal de 20 μl , que utiliza a classe de membranas microporosas de politetrafluoretileno (PTFE) composta de duas camadas (Figura 2[A], [C]).

Os dispositivos TheraCyte[®], compostos de duas lâminas de PTFE, oferecem um sistema simples e seguro de liberação de moléculas com propriedades terapêuticas, permite a remoção ou implantação de novos dispositivos e não requerem imunossupressão do hospedeiro. O processo de neovascularização ao redor do dispositivo leva de duas a três semanas para ser completado e, aparentemente, as estruturas vasculares permanecem por um período indefinido (Padera e col., 1996) (Figura 2[B]).

Yanay e cols. (2003), utilizando sistema de imunoisolamento da TheraCyte[®], demonstraram uma elevação dos níveis de hematócrito de ratos quando tratados com células vasculares de músculo liso alogênicas transduzidas com um vetor retroviral para secreção de eritropoietina (EPO). 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 provenientes de porcos na cavidade intraperitoneal de camundongos imunocompetentes e observou-se que as células transplantadas permaneceram viáveis e funcionais no período de oito semanas após seu implante (Garkavenko e cols., 2006). Foi também descrita a comparação entre o implante de ilhotas porcinas implantadas em dispositivos TheraCyte[®] e em microcápsulas de alginato para tratamento de diabetes em camundongos onde os resultados obtidos foram similares para os dois sistemas onde observou-se a sobrevivência das células das ilhotas e a reversão da diabetes em até 16 semanas em camundongos autoimunes não obesos (Elliott e cols., 2005). Portanto, o sistema de imunoisolamento da TheraCyte[®] já foi estudado utilizando diversos animais como roedores e babuínos com distintos agentes terapêuticos liberados por células geneticamente modificadas como: o hormônio de crescimento, hemofilia fator IX, citocinas, anticorpos monoclonais, eritropoietina e estudo de diabetes em roedores. Nestes trabalhos foram realizadas a implantação das células geneticamente modificadas ou produtoras de proteínas com propriedades terapêuticas juntamente com o dispositivo e estes mostraram-se eficaz por vários meses, sem a necessidade da administração de drogas imunossupressoras. O dispositivo foi bem tolerado, e fácil de remover do organismo. (Elliott e cols., 2005; Yanay e cols., 2003; Theracyte, 2008 ⁽¹⁾).

⁽¹⁾ - www.theracyte.com.br

[A]

[B]

[C]

Figura 2: [A]- Fotos dos dispositivos de imunoisolamento da TheraCyte®. O modelo de dispositivo utilizado apresenta aproximadamente 2 centímetros com capacidade interna de 20µL (1). [B]- Esquema representando o funcionamento do dispositivo de imunoisolamento da TheraCyte®. [C]- Esquema mostrando as membranas microporosas de politetrafluoroetileno (PTFE) composta de duas camadas sendo a interna com poros de 0,4 µm e a externa de 5 µm.

Fonte: TheracYTE, 2008 ⁽²⁾; Josephs e cols., 1999.

⁽²⁾- www.theracyte.com

Um dos modelos tumorais mais utilizado em estudos antiangiogênicos é o melanoma, uma neoplasia altamente maligna, que tem origem no melanoblasto da pele. Os resultados insatisfatórios obtidos com as modalidades tradicionais de tratamento do melanoma cutâneo metastático têm estimulado a realização de estudos experimentais com novos métodos. Uma das linhagens celulares mais utilizadas para esses estudos é o melanoma murino B16-F10, derivado de um tumor que ocorre espontaneamente em camundongos da linhagem C57Bl/6 e que apresenta propriedades metastáticas, oferecendo vantagem ao se tratar de uma terapia antiangiogênica pois, seu crescimento e progressão são altamente dependentes de um adequado suplemento sanguíneo; além disso é de fácil manipulação, sendo cultivado em laboratório de cultura celular, apresenta rápido crescimento e é facilmente transplantado em camundongos C57BL/6, cepa esta de fácil manejo em biotério. A inoculação subcutânea deste tumor provoca o desenvolvimento de um nódulo hipodérmico que se torna palpável em torno de uma a duas semanas, sendo facilmente mensurado. Esse nódulo evolui para um tumor sólido, podendo chegar a grandes dimensões (Junqueira e cols., 1997).

Outro modelo tumoral, o tumor de Ehrlich, vem sendo empregado no estudo da ação de componentes físicos, químicos e biológicos sobre o crescimento, patogênese, cinética, imunologia, bioquímica e análise terapêutica dos tumores. É um adenocarcinoma mamário indiferenciado de camundongo fêmea, mas é possível que sofra algumas influências de certos hormônios como estrógeno, prolactina, dentre outros. Pode também ser visto como um bom candidato à terapia, pois é um tumor transplantável, que permite a análise e a contagem inicial das células a serem inoculadas; apresenta um rápido desenvolvimento da neoplasia, restringindo o tempo de estudo, e já foi estudado com relação à formação da neovascularização. Além disso, é um tumor que tem a característica de desenvolver em qualquer linhagem de camundongo e de não regredir espontaneamente, podendo crescer na forma ascítica, quando inoculado no peritônio, e na forma sólida quando inoculado no tecido subcutâneo (Lago e cols., 2000; Silva e cols., 2004; Silva e cols., 2006).

O VEGF, uma glicoproteína homodimérica de 45 KDa, fator de crescimento específico e um dos principais reguladores da angiogênese sob condições normais e patológicas. Foi inicialmente identificado baseado na sua habilidade de estimular a permeabilidade vascular, sendo então chamado VPF – (Fator de Permeabilidade Vascular) e, posteriormente, demonstrou tratar-se de um fator angiogênico e um mitógeno específico de células endoteliais e, portanto, regulando diversos passos do processo angiogênico, incluindo

proliferação e migração das células endoteliais. Pertence à família VEGF/PDGF, sendo subdividido em VEGF-A (VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (Ferrara e cols., 1997; Takahashi e cols., 2005). O subtipo VEGF-A é mais conhecido por sua relação com a angiogênese, amplamente distribuído no organismo. Assim, este fator emerge como um mediador de eventos relacionados à vasculogênese e angiogênese associado à diversos eventos biológicos e, por isso, um dos mais estudados na angiogênese tumoral, seja como forma de terapia antiangiogênica ou como objeto para análise da mesma. Assim, investigações recentes têm focado na provável função das isoformas do VEGF como controladores de angiogênese durante o desenvolvimento tumoral, principalmente em tumores sólidos que geralmente não se desenvolvem sem o aporte de novos vasos sangüíneos (Cramer e cols., 2004; Ferrara e cols., 1997; Ferrara e cols., 2000; Grunstein e cols., 1999; Grunstein e cols., 2000; Novak e cols., 2003; Shima e cols., 1996; Stalmans e cols., 2002; Yang e cols., 2006; Yu e cols., 2002). Yang e cols. (2004, 2006) evidenciaram a liberação deste fator *in vitro* por células de melanoma.

No Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares em São Paulo (IPEN), foram desenvolvidos fibroblastos murinos imortalizados (LM) transfectados com os plasmídeos pSecTag (Invitrogen®) secretando endostatina murina (~4µg de endostatina murina/10⁶ células em 24 horas) (Tornieri e cols., 2003). O implante destas células recombinantes, a qual mantém uma liberação constante de endostatina, em dispositivo de imunoisolamento para tratamento de modelos de tumores de Ehrlich e melanoma apresenta potencial vantagem de poder ser utilizado em diversas terapias e com a possibilidade de retirada no caso de efeitos colaterais graves ou ao término do tratamento

O presente trabalho foi realizado no IPEN em parceria com o Laboratório de Oncologia da Faculdade de Medicina de São Paulo (FMUSP), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (C.E.P.A.) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, projeto n°: 18. Com apoio financeiro do IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) projeto n°: 00/04658 e Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

3. OBJETIVO

2.1- Objetivo Geral:

Realizar o tratamento antiangiogênico dos modelos de tumores de Ehrlich e melanoma em camundongos pelo implante de fibroblastos murinos recombinantes produtores de endostatina em dispositivo de imunoisolamento da TheraCyte® e avaliar a eficácia deste tratamento.

2.2- Objetivos Específicos:

- Analisar a eficácia do tratamento utilizando fibroblastos murinos expressando endostatina em dois modelos tumorais: Tumor de Ehrlich e Melanoma.
- Realizar um estudo comparativo entre os tratamentos utilizando as células produtoras de endostatina implantadas no dispositivo com o tratamento em que as células foram inoculadas livremente no tecido subcutâneo ventral do animal.
- Comparar a eficácia dos diferentes métodos de implantação do dispositivo com as células produtoras de endostatina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.2- MATERIAIS

3.1.1 - Equipamentos principais:

- Agitador, modelo Genic 2 - G560, Daigger e Co.inc., EUA
- Aparelho Milli-Q-Plus (Millipore, Belford, MA, EUA): purificador de água em sistema Milli Q (18 Ω).
- Autoclave, modulo: Kahoolawe II, Blackburn.
- Banho-maria, modelo: 100, Fanem, São Paulo, Brasil.
- Banho-maria, modelo: Tape 16500 Dri-Bath, Thermolyne, Iowa, EUA
- Balança analítica, modelo: Bel Engineering, Bel equipamentos LTDA, São Paulo, Brasil.
- Balança analítica, modelo: AW 220, Shimadzu, Japão.
- Balança de precisão, modelo: P1200, Mettler, São Paulo, Brasil.
- Banho a seco, modelo: Thermomixer, Eppendorf, Hamburg, Alemanha.
- Centrífuga refrigerada automática, modelo: 5818, Eppendorf, Alemanha.
- Centrífuga, modelo: CELM LS 3 PLUS, Barueri, São Paulo, Brasil
- Centrífuga, modelo: Centrifuge 5415-D, Eppendorf, Hamburg, Alemanha
- Estufa de CO₂ para cultura celular, modelo: 3158, Farma Scientific, Ohio, EUA
- Espectrofotômetro, modelo: ND-1000, Nanodrop, Wilmington, EUA
- Fluxo laminar, modelo: 2256, TROX, Curitiba, Brasil.
- Freezer -80°C, modelo: 939, Forma Scientific. Inc., Waltham, EUA
- Freezer -80 °C, modelo: NV- 65126, Nuaire, Japão.
- Freezer -80 °C, modelo: AL 880 E, American Lab., São Paulo, Brasil.
- Leitor de Elisa, modelo: MR4000, Dynatech Biotech, EUA

- Máquina de PCR (Polymerase Chain Reaction), modelo: GeneAmp PCR System 9700, Applied BioSystem, Campinas, SP, Brasil.
- Microscópio invertido, modelo: TMS, Nikon, Düsseldorf, Alemanha.
- 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.
- Polytron, Kinematica, Canada.
- Sistema de eletroforese horizontal, modelo LCH 12X14, Locus Biotecnologia, São Paulo, Brasil.
- Sistema de estocagem de Criotubos em Nitrogênio líquido, Thermolyne, Dubuque, IA, EUA
- Sistema de imagem para géis, modelo: Image máster UDS, Pharmacia Biotech, GE HeathCare, São Paulo, Brasil.

3.1.2 – Materiais e reagentes:

3.1.2.1- Cultura celular:

- Água purificada em sistema Milli Q (18 Ω).
- Antibióticos (Penicilina e Estreptomicina), Gibco, Invitrogen, Filial: São Paulo, SP, Brasil.
- Antimicótico: Anfotericina B (Fungisona), Gibco, Invitrogen, Filial: São Paulo, SP, Brasil.
- Bicarbonato de sódio, Gibco-BRL, Gathersburg, EUA
- Fator Básico de Crescimento de Fibroblastos Recombinante. Gentilmente doado pelo pesquisador Paulo Lee Ho, do Instituto Butantã, São Paulo, Brasil.

- Câmara de Neubauer, modelo: Tiefe Depth Profondeur, Loptik Labor - Suíça, Filial: São Paulo, SP, Brasil.
- Corante vital MTS, (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazólico), Promega, EUA
- Dimetilsulfóxido (DMSO), MERCK, São Paulo, Brasil.
- Garrafas de cultura celular de 25cm², 75 cm² ou 175 cm², TPP, São Paulo, SP, Brasil.
- Hygromycin B (Higromicina) em PBS, Invitrogen, Carlsbad, E.U.A
- L-Glutamina, Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA
- Meio de cultura celular: Dulbecco's Modified Eagle Médium (DMEM), Cultilab, Campinas, Brasil.
- Meio Mínimo Essencial Eagle's (E-MEM), Cultilab, Campinas, Brasil.
- PMS- Fenazina Metosulfato, Promega, EUA
- Piruvato de sódio, Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA
- Soro fetal bovino (S.F.B.) Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA
- Tripsina, SIGMA, St. Louis, EUA.

Linhagens celulares

- Células HUVE-EC-C, Células Endoteliais Normais do Cordão Umbilical Humano, (ATCC- American Type Tissue Collection, n° CRL-1730™, Manassas, VA, EUA).
- Células B16-F10 (linhagem celular experimental do tumor melanoma), ATCC, n° CRL-6475™, Manassas, VA, EUA
- Fibroblastos murinos, designados: LM(tk-) (ATCC n°: CCL-1.3™, Manassas, VA, EUA), transfectados com o vetor pSecTag2, fornecido pela Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA), contendo ou não o gene da endostatina (ATCC, n° 63404, Manassas, VA, EUA), com cauda de poli-histidinas ((his)₆-met-endostatina).

3.1.2.3- Ensaios *in vivo*:

- Adesivo de silicone: medical adhesive silicone tipe A, Silastic, EUA
- Anestésico e relaxante muscular: Xilasina (Xilasin), Rhabiofarma Ind. Farmacêutica, Hortolândia, Brasil.
- Anestésico e relaxante muscular: Cetamina (Cetamin), Rhabiofarma Ind. Farmacêutica, Hortolândia, Brasil.
- Dispositivo TheraCyte[®] Baxter Healthcare, Deerfield, EUA
- Heparina- Lique mine, Roche, São Paulo, Brasil.
- Seringa Hamilton, Hamilton Company, Nevada, EUA

3.1.2.4- Ensaios de dosagem de endostatina e de cDNA de VEGF

- Kit de ELISA: para determinação de endostatina murina, modelo: CYT 160, Chemicon, EUA .
- Iniciadores de VEGF-A (murino) e β -actina Humana, produzidos pela Invitrogen, filial: São Paulo, SP, Brasil, gentilmente cedidos pelo professor Doutor Roger Chammas (LIM 24 – FMUSP).

VEGF-A (murino):

Iniciador *sense*: 5' CGG ATC AAA CCT CAC CAA AG 3'

Iniciador *antisense*: 5' TTT CTG GCT TTG TTC TGT CTT TC 3'

Tamanho do fragmento: 100pb

β -actina Humana:

Iniciador *sense*: 5' CTG TGG CAT CCA CGA AAC TA 3'

Iniciador *antisense*: 5' AGT ACT TGC GCT CAG GAG GA 3'

Tamanho do fragmento: 188pb

- Os reagentes utilizados para a obtenção de RNA e cDNA, listados abaixo, foram obtidos da Promega ou Invitrogen, filiais: São Paulo, SP, Brasil, gentilmente doados pelo professor Doutor Roger Chammas (LIM 24 – FMUSP)
 - Trizol, Clorofórmio, RNase free DNase, água DEPC (40µg/µL); RNase OUT, Oligo (dT), dNTP (10mM) (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), tampão 5X para PCR, DTT, Superscript III.
- Os reagentes utilizados para a reação de PCR (Reação em cadeia da polimerase) e PCR em tempo real, listados abaixo, foram obtidos da Invitrogen, filial: São Paulo, SP, Brasil, gentilmente cedidos pelo professor Doutor Roger Chammas (LIM 24 – FMUSP)
 - Tampão para PCR 10X, MgCl₂ (50mM), dNTP (10mM) Taq Polimerase Platinum, DMSO (dimetilsulfóxido), Syber Green.

3.1.2.5- Imunohistoquímica:

- Anticorpo de coelho anti-endostatina murina, modelo: AB1880, Chemicon, EUA
- Anticorpo anti-CD34 (Cabra, Santa Cruz) e anticorpo anti-CD31 (Rato, Chemicon); SuperPicture Poly HRP conjugada (Zymed, Carlsbad, EUA), StreptABC – HRP 1:200 (Dako Duet), Albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, EUA), Dimetilsulfóxido (DMSO), Diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB-Sigma, EUA) – Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil.

3.1.3- Ferramentas de Bioinformática:

- BLAST –Basic Local Alignment Search Tool ⁽³⁾ (BLASTn- nucleotídeos e BLASTp- proteína).
- Programa Bio Edit- Biological sequence alignment editor, versão 7.0.8.
- Programa Graphic Pad Prism, Versão 3.0.
- Programa Origin, versão 6.0.
- Programa Primer 3 ⁽⁴⁾
- Programa Rotor-Gene 6 versão 6.0 (Corbet Research).

⁽³⁾ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

⁽⁴⁾ <http://frodo.wi.mit.edu/>

3.2- MÉTODOS

3.2.2- Obtenção do clone LM (pSecTag)- endo.

Em um trabalho realizado anteriormente a este, no Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares em São Paulo (2003), obteve-se a transfecção de fibroblastos murinos (LM(tk⁻)) provenientes da linhagem C3H-HePas, com o gene da endostatina. Para tanto, utilizou-se o vetor pSecTag, que possibilita expressão e secreção de proteínas heterólogas em células de mamífero. Este plasmídeo apresenta a sequência da β -lactamase, que propicia a resistência à ampicilina e é utilizada para a amplificação do plasmídeo em *Escherichia coli*, e o gene que confere resistência à Higromicina-B, que possibilita a seleção das células de mamíferos transfectadas (Tornieri e cols., 2003).

Os fibroblastos murinos LM(tk⁻), os fibroblastos murinos transfectados com o vetor pSecTag (LM(pSecTag)), e aqueles com o vetor contendo o gene da endostatina (LM(pSecTag)-endo) foram utilizados no presente trabalho. O sobrenadante do clone produtor de endostatina apresentou uma produção de aproximadamente 0,4 μ g de endostatina murina/ 10^6 células em 24 horas (Tornieri e cols., 2003; Chura-Chambi e cols., 2003).

3.2.2 – Manutenção das células em cultura

Os fibroblastos murinos, LM(tk⁻), assim como as mesmas células transfectadas com o vetor pSecTag, LM(pSecTag), e os transfectados com o vetor pSecTag mais o gene da endostatina (LM(pSecTag)- endo), foram cultivados em meio de cultura DMEM[®], acrescido de 10 % de soro fetal bovino (s.f.b.), L-glutamina 2mM, antibióticos: 50 μ g/mL de streptomomicina e 50 μ g/mL de penicilina, 2,5 μ g/mL de anfotericina, 2,2 g/L de bicarbonato de sódio e 110 mg/L de piruvato de sódio. A seleção das células transfectadas foi realizada por 14 dias e utilizou-se meio de cultura com 600 μ g de higromicina/mL.

As células foram amplificadas até a semi-confluência em garrafas de cultura celular apropriadas (na proporção 1:4), mantidas em estufa a 37 °C, com 5 % de CO₂, e manuseadas de maneira asséptica no fluxo laminar, trocando-se o meio a cada 48 horas. Estas células foram destacadas da parede da garrafa de cultura com solução de tripsina (0,05 % tripsina e 0,02% EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetraacético)), contadas em câmara de Neubauer, centrifugadas por 5 minutos a 227 g e ressuspensas em 20 µL de meio DMEM[®] para implantação no dispositivo de imunisolamento ou para inoculação livre no tecido subcutâneo da região ventral do animal.

As células tumorais B16-F10 também foram mantidas em cultura celular nas mesmas condições.

3.2.3 - Análise da ação da endostatina sobre a viabilidade de células endoteliais

A habilidade da endostatina em inibir a viabilidade das células endoteliais foi testada pela determinação da quantidade de células HUVEC-EC-C (Células Endoteliais Normais do Cordão Umbilical Humano) viáveis através da incorporação do corante vital MTS. Para isso, as células HUVE-EC-C foram cultivadas em meio MEM[®], contendo 10 % de soro fetal bovino, 50 µg/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e L-glutamina 2 mM, mantidas em estufa a 37 °C na presença de 5 % de CO₂. As células foram contadas em Câmara de Neubauer e 3000 células foram semeadas em 200 µl de meio MEM[®] na presença de 2 % de soro fetal bovino para cada poço de uma placa de 96 poços e mantidas por 24 horas. O meio foi trocado por meio MEM[®] fresco contendo 2 % de soro fetal bovino e 3 ng/ml de bFGF na presença de 10 µl sem diluição ou em diluições seriadas do sobrenadante de células LM(pSecTag)-endo ou LM(pSecTag) por 24 horas. Como controle negativo utilizou-se o meio MEM[®] com 2 % de soro fetal bovino e 3 ng/ml de b-FGF. Foram realizadas análises em duplicata.

A viabilidade das células endoteliais foi quantificada utilizando-se o corante vital MTS (que apresenta ação sobre a desidrogenase mitocondrial) com leitura de absorbância em comprimento de onda de 490 nm. A análise estatística foi feita no programa GraphicPad-Prism utilizando o teste não paramétrico de Wilcoxon.

3.2.5- Inoculação das células tumorais nos animais

Foram utilizados animais machos com idade entre 6 a 10 semanas, os quais foram devidamente identificados, mantidos em microisoladores, em salas controladas e manipulados de maneira asséptica, utilizando capela de fluxo laminar, recebendo a mesma ração especial e água *ad libitum*.

- *Células do tumor de Ehrlich*

Camundongos da linhagem Balb/c contendo tumor de Ehrlich na forma ascítica foram doados pela Faculdade de Veterinária da USP, onde os tumores são mantidos regularmente por meio de passagens intraperitoneais subseqüentes, o que ocorre aproximadamente a cada 9 ou 10 dias.

Para este ensaio foram utilizados primeiramente animais Scid (imunodeficientes para a produção de células T e B do sistema imune) (Thomsen e cols., 2005) e, posteriormente, camundongos C3H-HePas, animais imunocompetentes, os quais foram utilizados para os demais procedimentos com tumor de Ehrlich.

Foram realizadas, previamente, três passagens intraperitoneais do líquido ascítico, proveniente dos camundongos Balb/c (aproximadamente 1.260.000 células em 300 µL) em camundongos da linhagem C3H-HePas antes das células tumorais serem inoculadas subcutaneamente nos coxins plantares para o crescimento dos tumores na fase sólida e, assim, iniciar o tratamento. No caso do ensaio com os camundongos imunodeficientes (Scid), linhagem derivada de Balb/c, essa etapa não foi realizada.

Desenvolveu-se inicialmente uma análise para se verificar qual a quantidade ideal de células a serem injetadas deste tumor para o desenvolvimento do tumor sólido. Para isso, o líquido ascítico, extraído do peritônio do animal, foi centrifugado por 5 minutos a 227 g e as células tumorais foram ressuspensas em PBS 1x (Tampão Fosfato-salina). As células foram contadas e, volumes correspondentes a $2,5 \times 10^5$, 5×10^5 , 10^6 , 2×10^6 e 4×10^6 células foram

centrifugadas novamente, ressuspensas em um volume de 40µl de PBS e inoculadas nos coxins plantares posteriores direito dos animais, os quais foram divididos em grupos contendo dois camundongos.

A avaliação do crescimento tumoral foi desempenhada mediante mensuração da espessura do membro posterior direito utilizando paquímetro digital, duas vezes por semana, até o sacrifício dos animais. Os valores utilizados de espessura tumoral foram obtidos pela diferença entre as medidas das patas posteriores contendo os tumores e das patas controle.

Analisou-se a curva de crescimento tumoral utilizando-se o programa GraficPad – Prism e, nos ensaios subseqüentes, os animais da linhagem celular Scid receberam $2,5 \times 10^5$ células tumorais ressuspensas em 40 µL de PBS, e injetadas no tecido subcutâneo na região do coxim plantar do membro posterior direito, para crescimento de tumor sólido. No caso dos camundongos C3H-HePas, foram injetadas 4×10^6 células.

- *Células B16-F10*

Para a inoculação do tumor melanoma foram utilizados os animais C57Bl/6. As células em cultura foram contadas, centrifugadas, ressuspensas em 40 µL PBS e foram injetadas 10^6 células tumorais nos coxins plantares posteriores direito dos animais, de acordo com os protocolos descritos na literatura (Novak e cols., 2003; Yang e cols., 2004).

3.2.5 - Tratamento dos camundongos com tumores pelo implante das células LM(pSecTag)-endo.

Quando os tumores atingiram a espessura aproximada de 0,5 mm iniciou-se o tratamento pela inoculação (livre) das células expressando endostatina, LM(pSecTag)-endo,

no tecido subcutâneo, na região ventral. Como controles foram utilizadas as células transfectadas com o vetor pSecTag, o meio de cultura DMEM[®] 10 % s.f.b. e os fibroblastos não transfectados (LM(tk-)).

Analizou-se, em um primeiro momento, a quantidade de células produtoras de endostatina que levaria a um melhor resultado na diminuição da evolução tumoral. Para tanto, animais Scid e C3H-HePas, com tumor de Ehrlich, foram tratados com diferentes quantidades as células produtoras de endostatina inoculadas livremente (sem o uso do dispositivo) no tecido subcutâneo na região abdominal. Foram utilizadas 10^7 e 3×10^7 células. Nos ensaios posteriores, com ambos os tumores, foram inoculadas 10^7 células produtoras de endostatina, quantidade esta que apresentou um melhor resultado na diminuição da curva de crescimento tumoral.

Para o implante do dispositivo na região subcutânea no dorso dos animais, realizaram-se procedimentos cirúrgicos em salas controladas. Antes da implantação, os dispositivos TheraCyte[®] estéreis foram lavados em etanol a 95 %, etanol 70 % e 0,9 % de NaCl (Cloreto de Sódio) (Brauker e cols., 1995; Josephs e cols., 1999). Posteriormente, os camundongos foram manipulados de maneira asséptica, sendo devidamente anestesiados (65 mg de cloridrato de Cetamina/kg/animal e 5 mg de cloridrato de Xilazina/kg/animal). Foi feita uma incisão de 1,5 cm com o auxílio de tesoura cirúrgica sem ponta para a abertura, de aproximadamente 3,0 cm, na região subcutânea dorsal e implantação do dispositivo. A inoculação das células no interior do dispositivo foi realizada através do cateter do dispositivo onde fora acoplado um tubo de silicone para evitar entrada de ar (formando um sistema a vácuo). Os fibroblastos, ressuspensos em 20 µl de meio de cultura DMEM[®], foram inseridos utilizando a seringa Hamilton e, em sequência, o cateter foi selado com adesivo de silicone (figura 3). Os cortes foram fechados com pontos cirúrgicos utilizando-se linha cirúrgica estéril.

A fim de se obter maior eficácia do tratamento, foram considerados dois esquemas de implante do dispositivo com as células produtoras de endostatina em animais com tumores em desenvolvimento. Em um esquema, o dispositivo foi implantado primeiramente e aguardou-se a cicatrização e neovascularização ao redor do dispositivo por um período de aproximadamente 14 dias. Durante esse tempo foram injetadas as células tumorais nos coxins plantares e, quando as espessuras tumorais atingiram aproximadamente 0,5 mm (com o tecido cicatrizado), iniciou-se o tratamento pela inoculação das células no interior do dispositivo já

implantado (figura 4). Este protocolo foi utilizado porque a neovascularização ao redor do dispositivo é importante para a sobrevivência das células no seu interior e se de alguma maneira a presença de níveis elevados de endostatina nas redondezas do dispositivo interferissem na vascularização, as próprias células produtoras de endostatina iriam sofrer com a hipóxia no interior do dispositivo. Em um segundo, seguiu-se a recomendação dos técnicos da fabricante (TheraCyte[®]), pois estes relatam uma maior viabilidade das células encapsuladas in vivo quando implantadas juntamente com o dispositivo. Assim, primeiramente injetou-se as células tumorais e, ao atingir 0,5mm, os dispositivos foram inseridos já contendo as células em seu interior (figura 5).

Devido ao pequeno volume interno deste sistema de imunisolamento, realizou-se um experimento piloto para tratamento de camundongos C3H-HePas com tumor de Ehrlich utilizando diferentes quantidades de células produtoras de endostatina: 10^6 e 10^7 células, na qual estas foram implantadas no interior do dispositivo após a formação de uma neovascularização e cicatrização da ferida ao redor deste (aproximadamente 14 dias) e avaliou-se a curva de crescimento tumoral. Com base nestes dados e nos resultados dos tratamentos sem o uso do dispositivo, utilizaram-se 10^7 células nos ensaios subseqüentes com o dispositivo de imunisolamento para ambos os modelos tumorais.

A análise estatística foi realizada no programa GraftPad-Prism utilizando o teste não paramétrico de Wilcoxon, e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Figura 3: Injeção das células no interior do dispositivo. O dispositivo é acoplado a um tubo de silicone [A e B] formando um sistema de vácuo que permite a entrada da seringa Hamilton [C] até o interior do dispositivo para a injeção das células. Após a injeção das células a agulha da seringa Hamilton foi retirada até a saída do cateter e uma agulha acoplada a uma seringa de 1 mL contendo cola de silicone foi introduzida no canal selando a passagem, após, o tubo de silicone é retirado. Este esquema refere-se ao processo onde as células são inoculadas juntamente com o dispositivo. No caso do experimento onde as células são inoculadas após a cicatrização e neovascularização ao redor do dispositivo. Este processo é realizado no dorso do animal (aproximadamente após 14 dias da inserção do dispositivo da TheraCyte®).

Figura 4: Procedimento cirúrgico em camundongos da linhagem C57Bl/6 com melanoma representando a inoculação das células após 14 dias do implante do dispositivo. Primeiramente foi feita uma incisão (1,5 cm) e com o auxílio de tesoura cirúrgica sem ponta foi aberto espaço na região subcutânea dorsal (3,0 cm) e realizou-se o implante do dispositivo [A]. O corte foi fechado com pontos cirúrgicos [B]. Após cicatrização e neovascularização (aproximadamente após 14 dias) e, [C] quando os tumores nas patas atingiram aproximadamente 0,5 mm de espessura (dado não mostrado), realizou-se uma nova incisão no dorso do animal, as células foram injetadas no dispositivo utilizando-se uma seringa Hamilton [D e E] (procedimento semelhante ao mostrado na figura anterior) e o corte foi novamente suturado [F]. O corte foi novamente suturado.

Figura 5: Procedimento cirúrgico em camundongos da linhagem C57Bl/6 com melanoma representando a inoculação do dispositivo juntamente com as células (na qual foi feito o implante do dispositivo contendo as células quando os tumores atingiram aproximadamente 0,5 mm de espessura) [A]. Realizou-se um corte (1,5 cm) na região dorsal e com o auxílio de tesoura cirúrgica sem ponta foi aberto um espaço (3 x 1,5 cm) da região subcutânea [B] e implante do dispositivo contendo as células, como mostrado na figura 3 [C]. Os cortes foram fechados com pontos utilizando-se linha cirúrgica estéril [D].

3.2.6- Dosagem da endostatina nos soros dos animais.

A dosagem de endostatina nos soros dos animais foi realizada utilizando-se kit de Elisa específico para determinação de endostatina murina, que permite uma leitura entre 1,95 e 500ng/mL. As leituras de absorbância das amostras foram comparadas com as absorbâncias obtidas com uma curva padrão de endostatina, a qual demonstra uma relação inversa entre a densidade óptica (D.O.) e a concentração da proteína. Como controle de valores de endostatina normais, foram utilizados soros de animais tratados com as células transfectadas com o vetor pSecTag e animais não tratados.

3.2.7- Análise histológica e imunohistoquímica dos tumores e dos dispositivos.

Animais apresentando melanoma e tumor de Ehrlich, tratados com 10^7 células livres LM(pSecTag) ou LM(pSecTag)-endo, foram sacrificados para análise da presença e morfologia dos vasos tumorais. Os tumores do grupo controle, nos quais injetou-se células transfectadas com o vetor (LM(pSecTag)), e os do grupo tratados com as células produtoras de endostatina (LM (pSecTag)-endo) foram removidos das patas, mensurados, pesados, fixados e embebidos para análise histológica de acordo com o protocolo de rotinas histopatológicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os cortes histológicos foram fixados e corados por imunohistoquímica utilizando-se os anticorpos anti-CD31 e anti-CD34 nos tumores de Ehrlich e melanoma.

Para a análise do número de vasos tumorais e da área vascular foram adquiridas fotos de cada lâmina correspondente a toda a extensão tumoral sem sobreposições (de 10 a 18 fotos). Com o auxílio de um retículo de hemocítômetro, foram contados, para análise da área vascular, o número de pontos que incidiam dentro da área tumoral relacionando-os com o número de pontos incidentes nas estruturas vasculares e, para análise no número de vasos tumorais, contou-se o numero de estruturas vasculares com luz visível em seu interior (com ou sem hemácias) comparando-se com a área tumoral. Também foram verificados os vasos funcionais, onde foram considerados como funcionais apenas os vasos com hemácias em seu

interior. A análise estatística foi realizada no programa Gnumeric-Prism utilizando o teste Wilcoxon, e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Os dispositivos também foram retirados ao final do experimento (entre o décimo quarto e vigésimo primeiro dia após o início do tratamento) e fixados de acordo com o protocolo de rotinas histopatológicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para a realização da análise histológica utilizando o corante H.E; análise da produção de endostatina através de imunohistoquímica com anticorpo policlonal anti-endostatina murina.

Esta etapa foi realizada com a colaboração do laboratório de Oncologia (Lim24- Dr. Roger Chammas) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

- *Processamento dos tecidos para obtenção das Lâminas:*

Os fragmentos dos tumores (Ehrlich e Melanoma) e os dispositivos foram embebidos em formol 10 % tamponado (por 24 horas) e em etanol 70 % para fixação. Posteriormente, o tecido foi desidratado utilizando álcool absoluto, álcool a 95 % e em álcool a 70 %. O clareamento, que consiste na remoção do agente desidratante, foi realizado com xilol. O agente clareador foi completamente removido e a amostra foi saturada e emblocada em parafina bruta. Para a inclusão, o tecido foi colocado na posição dentro do molde (quadro de Leuckhart ou peças em L) contendo o meio de solidificação na temperatura aproximada de 60 à 65 °C e esperou-se solidificar. O material foi processado em Auto-Técnico (Aotec). Para a microtomia utilizou-se um micrótomo rotativo ou um micrótomo elétrico ótimo, obtendo-se cortes histológicos de 3 a 5 µm de espessura.

Para a coloração do Material com Hematoxilina – Eosina a lâmina foi desparafinizada em xilol por 5 minutos, embebida em álcool a 99 %, 95 %, 70 % e em água corrente. O corante de hematoxilina foi aplicado por 5 minutos, seguido de lavagem em água corrente. Acrescentou-se álcool a 70 % acrescido de 1 % de ácido clorídrico e água com amoníaco a 1%. Foi realizada lavagem em água corrente até o tecido atingir coloração azulada seguida de lavagem em álcool 95 %. A lâmina foi colocada na solução de Eosina Floxina a 1 % por 1 minuto (controlando a coloração). Foi realizada a desidratação das lâminas em álcool a 70 %, 95 %, 100 % e em xilol.

95 % e 99 % (absoluto) até o xilol. A lâmina foi então montada com resina, rotulada e identificada.

No caso da preparação para imunohistoquímica, as lâminas foram banhadas com acetona e com organo-silano a 6 %, sendo posteriormente lavadas com água destilada. (Protocolo este gentilmente cedido pelo laboratório de patologia da Universidade de São Paulo onde os tecidos foram processados). Obtidas essas lâminas, o processo de imunohistoquímica foi realizado pelo Instituto Adolfo Lutz conforme o protocolo a seguir:

As lâminas silanizadas foram submetidas à pressão em placas de pressão contendo tampão citrato 10mM, pH 6,0 e, após 4 minutos de pressurização total, as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente por 10 minutos, lavadas em água corrente e água destilada. Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena utilizando peróxido de hidrogênio 3 % por 5 minutos em quatro repetições seguida de lavagem com água corrente, destilada e PBS 10mM pH: 7,4 por 5 minutos. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário, diluídos em tampão PBS contendo soro albumina bovina (BSA) 1 % e azida sódica (NaN_3) 0,1 %, por 18 horas a 4 °C em câmara úmida. Utilizou-se o anticorpo anti-endostatina (coelho) na titulação: 1:100; o anticorpo anti-CD31 (rato), (1:100) e o anticorpo anti-CD34 (cabra), 1:1000. Após as lavagens em PBS com três trocas de 3 minutos cada, foi realizada, para o anticorpo anti-endostatina e anti CD31, a incubação por 30 minutos a 37 °C com SuperPicture Poly HRP conjugado. No caso do anticorpo anti-CD34 incubou-se com o anticorpo secundário 1:500 (coelho anti-Ig de cabra biotinizado) diluído em PBS, por 10 minutos a 37 °C. Em seguida, incubou-se com o complexo – reagente A (Estreptoavidina) e reagente B (Peroxidase biotinizada) na titulação 1:200 em PBS por 30 minutos a 37 °C e lavou-se com tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em solução substrato: 60mg de 3-3' diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB – Sigma) diluído em 100 mL de PBS, contendo 1 mL de H_2O_2 a 6% e 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO), durante 5 minutos a 37 °C, ao abrigo da luz. A oxidação do DAB resulta em um produto de reação castanho dourado. Contracorou-se com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavou-se em água corrente e destilada, imergiu-se duas vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5 %), lavando em seguida em água corrente e destilada.

3.2.8 – Análise da expressão das diferentes isoformas de VEGF murino.

- *Extração do RNA Total e obtenção do cDNA*

Como nos tratamentos com o melanoma citados anteriormente, animais da linhagem C57Bl/6 foram inoculados com 10^6 células tumorais (B16-F10) no tecido subcutâneo do coxim plantar e, quando as espessuras dos tumores atingiram aproximadamente 0,5mm, iniciou-se o tratamento no qual um grupo recebeu as células produtoras de endostatina inoculadas livremente (10^7 células LM(pSecTag)- endo) (n=5), em um segundo inoculou-se 10^7 células LM(pSecTag) (n=5) e, em um terceiro, apenas meio de cultura DMEM[®] com 10 % de soro fetal bovino (n=2). Após sete dias de tratamento estes animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e o tumor retirado de maneira asséptica. Os tumores foram divididos, uma parte destinou-se para a extração do RNA e a outra para a imunohistoquímica.

Os tecidos tumorais foram submetidos à extração do RNA total e precipitação segundo protocolo consolidado do reagente Trizol da Invitrogen[®]. O RNA obtido foi ressuspensão em 80 µL de água livre de RNase. A quantificação e avaliação da integridade do RNA foi confirmada através do espectrofotômetro de absorvância em 260 nm e 280 nm, considerando-se de boa qualidade a razão 260/280 nm entre 1,8 e 2,0, e após eletroforese em gel de agarose a 1% (agarose, tampão MOPS 1X, 5mL de formaldeído 37% e 1µL de Brometo de etídeo). As amostras foram acrescidas de 2 µL de tampão de RNA contendo azul de bromofenol a 10%. A partir da análise do RNA total realizou-se um tratamento com DNase para obtenção do cDNA (RNA(1 µL), Tampão (1 µL) 10X para a enzima, DNase (2 µL) e água RNase Free para um volume final de 10µL. Após permanecer por 30 minutos a 60 graus Celsius, adicionou-se 1 µL de Oligo (dT), 1 µL de dNTP (10 mM) (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) e água DEPC para um volume total de 20 µL. A reação foi processada a 70°C por 10 minutos e resfriada por 1 minuto em gelo. A seguir foram adicionados 4 µL de tampão 5X, 1 µL de DTT, 1 µL de RNase Out, 1 µL de Superscript III (Invitrogen[®]) por 50 minutos à 50 °C e a reação foi inativada por 15 minutos a 70 °C). O cDNA foi ressuspensão em 70 µL de água (tratada com DEPC) e as amostras foram quantificadas no espectrofotômetro de comprimento

de 260 nm. Após análise, este cDNA foi diluído a fim de se obter uma concentração de aproximadamente 200 ng/μL e armazenado à -20 °C.

- *Definição dos iniciadores para as isoformas: VEGF 120, VEGF 164 e VEGF 188 de VEGF- A murino.*

O VEGF-A murino apresenta 3 principais isoformas: VEGF 120, VEGF 164 e VEGF 188. Estas correspondem às isoformas humanas: VEGF 121, VEGF 165 e VEGF 189, que se diferem quanto à massa molecular, solubilidade, receptores e à expressão dos 3 últimos exons (Fukumura e cols., 1998; Grunstein e cols., 1999; Stalmans e cols., 2002; Takahashi e cols., 2005; Yang e cols., 2006; Zhang e cols., 2002).

Com a finalidade de verificar e comparar a presença do RNAm das três principais isoformas de VEGF-A presentes no melanoma dos animais, foram realizados ensaios de Polimerização em Cadeia em Tempo Real com amostras tumorais dos grupos tratados com as células LM(pSecTag)- endo e LM(pSecTag). Para isso, foram verificadas, em banco de dados, as seqüências de nucleotídeos do RNAm (BLASTn), proteínas(BLASTp) e do gene (GeneBank) depositadas para as 3 isoformas do VEGF-A murino. O alinhamento de todas as seqüências do RNAm total das respectivas isoformas com o gene do VEGF foi realizado com o auxílio do programa BioEdit[®] e de acordo com os iniciadores citados na literatura (Cramer e cols., 2004; Zhang e cols., 2002). Com o auxílio do programa Primer3[®], obtivemos um par de iniciadores complementares aos nucleotídeos do Exon 4 e 5.

Iniciador *sense*: 5' CGG ATC AAA CCT CAC CAA AG 3'

Iniciador *antisense*: 5' TTT CTG GCT TTG TTC TGT CTT TC 3'

Tamanho do fragmento: 100 pb

Como controles da reação foram utilizados os iniciadores de β-actina Humana:

Iniciador *sense*: 5' CTG TGG CAT CCA CGA AAC TA 3'

Iniciador *antisense*: 5' AGT ACT TGC GCT CAG GAG GA 3'

Tamanho do fragmento: 188 pb

Realizou-se a reação de PCR (2 μ L de tampão de PCR 10X, 0,6 μ L de $MgCl_2$, 0,4 μ L de dNTP (10 mM) (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,6 μ L dos respectivos iniciadores tanto o primer sense como antisense (10 mM), 1 μ L da amostra de cDNA (~ 200 ng/ μ L), 0,22 μ L de Taq Platinum, e 14,58 μ L de água, obtendo um volume final de 20 μ L para cada amostra). As amostras foram aquecidas à 95 °C por 5 minutos e depois foram realizados 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos para desnaturar o DNA molde, 59 °C por 1 minuto para o anelamento dos iniciadores, 72 °C por 1 minuto de polimerização e por fim, um ciclo de extensão de 72 °C por 5 minutos. Analisou-se em gel de agarose a 1,5 % (agarose, tampão T.E.B com pH 8,3, adicionando-se 1 μ L de Brometo de etídeo (0,5 mg/mL). Adicionaram-se 20 μ L da amostra acrescidos de 4 μ L de tampão de DNA (xilenocianol) contendo azul de bromofenol 10 % juntamente com o marcador de DNA de 100 pb “*DNA ladder*”).

- *Análise quantitativa pela PCR em tempo real:*

A reação foi padronizada utilizando curvas de determinação da eficiência da amplificação. Foi analisada a quantidade ideal das amostras de cDNA e de iniciadores a serem adicionados. Para a determinação da quantidade ideal de iniciadores, foram aplicadas diferentes quantidades de iniciadores (em duplicata) em diluições seriadas. O mesmo foi feito na curva de calibração das amostras, sendo variadas as concentrações das amostras de cDNA, considerando-se a eficiência da amplificação entre 0,9 e 1,0. Este processo foi realizado tanto para a amostra em que foram utilizados os iniciadores alvo (VEGF) como para a amostra em que se utilizou iniciadores de referência (β -actina), obtendo-se as respectivas quantidades: 0,3 mM de iniciadores por reação, 169 ng de amostra para o teste com os iniciadores de VEGF e 220 ng para o teste com os iniciadores de β -actina. Para a reação de PCR em tempo real foram necessários 2 μ L de tampão de PCR, 0,6 μ L de $MgCl_2$, 0,4 μ L de dNTP (10 mM) (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,4 μ L dos respectivos iniciadores *sense e antisense* (10 mM), 1 μ L da amostra de cDNA, 0,2 μ L de Taq Platinum, e água pura, obtendo um volume final de 20 μ L para cada amostra. Foram realizados 40 ciclos apresentando 94 °C por 30 segundos, 59 °C por 40 segundos e 72 °C por 30 segundos. Utilizou-se as amostras dos grupos LM(pSecTag)-endo e LM(pSecTag) (n=5).

Os resultados da PCR em tempo real foram obtidos com o auxílio do programa Rotor Gene[®] (versão 6.0). Para a análise utilizou-se o modelo matemático proposto por Pfaffl (2001), que baseia-se na quantificação relativa da transcrição de um gene alvo (VEGF) em comparação com a transcrição de um gene referência (β -actina). A expressão relativa é calculada baseada na eficiência e no *Crossing Point* (CP- ponto em que a fluorescência aumenta sensivelmente superior à base de fluorescência (Threshoud)) da amostra alvo versus a controle. Montou-se o gráfico no programa GraphicPad-Prism e para a análise utilizou-se o teste Wilcoxon. Esta etapa foi realizada com a colaboração do laboratório de Oncologia (Lim24- Dr. Roger Chammas) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

4. RESULTADOS

4.1- Análise da ação da endostatina sobre a viabilidade de células endoteliais

O efeito inibitório da endostatina murina, secretada pelos fibroblastos transfectados, foi determinada empregando-se o corante vital MTS para análise da viabilidade das células endoteliais HUVE-EC-C. Utilizando-se o volume de sobrenadante de 7.500 células produtoras de endostatina observou-se uma diminuição da viabilidade das células endoteliais proporcional à concentração de sobrenadante, sendo de 46,7 %, na fração não diluída, quando comparada com o controle negativo. A perda de viabilidade das células endoteliais quando incubadas com o sobrenadante das células transfectadas com o vetor sem o gene da endostatina foi pequena em comparação com o controle negativo, no qual foi colocado o meio de cultura, principalmente para as amostras diluídas (figura 6).

Figura 6: Viabilidade celular com a presença da endostatina proveniente do sobrenadante das células transfectadas na proliferação das células endoteliais (HUVEC). ■ - Sobrenadante das células produtoras de endostatina (LM(pSecTag)-endo), ■ - Sobrenadantes das células transfectadas com o vetor (LM(pSecTag)), ■ - Controle negativo: meio MEM® 2% s.f.b. As diferenças entre os grupos LM(pSecTag)-endo com LM(pSecTag) e com o controle negativo foram consideradas estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

4.2- Inoculação das células do tumor de Ehrlich

Foram injetadas diferentes quantidades de células de tumor de Ehrlich em animais imunodeficientes (Scid) e imunocompetentes (C3H-HePas) para análise da evolução tumoral. As quantidades de células selecionadas para os ensaios subsequentes foram $2,5 \times 10^5$ células para os camundongos imunodeficientes e 4×10^6 células para os animais imunocompetentes, quantidades estas que apresentaram uma evolução de crescimento tumoral semelhante (com diferença aproximada de 0,5 mm a 1,0 mm na espessura tumoral para um mesmo período) nos camundongos C3H-HePas em comparação com as $2,5 \times 10^5$ células tumorais utilizadas em Scid.. Foi observada uma menor sobrevida dos animais imunodeficientes utilizando-se maiores quantidades de células tumorais.

Figura 7: Espessura dos tumores de Ehrlich. [A]- Curva de crescimento nos animais imunodeficientes Scid. ($\blacklozenge$) 2×10^6 células, ($\bullet$) 4×10^6 células, ($\blacklozenge$) 10^6 células, ($\blacktriangle$) 500.000 células, ($\blacksquare$) 250.000 células tumorais; (n=2). [B]- Curva de crescimento nos animais imunocompetentes C3H-HePas. ($\blacklozenge$) 4×10^6 células, ($\blacklozenge$) 2×10^6 células, ($\blacklozenge$) 500.000 células, ($\bullet$) 10^6 células, ($\blacktriangle$) 250.000 células tumorais; (n=2).

4.3 - Tratamento dos camundongos com tumores pelo implante de células LM(pSecTag)-endo.

4.3.1- Tratamento pelo implante de células LM(pSecTag)-endo inoculadas livremente.

- *Tratamento de camundongos Scid com tumores de Ehrlich:*

No tratamento no qual foram inoculadas subcutaneamente as células LM expressando endostatina (LM(pSecTag)-endo) em camundongos imunodeficientes com tumor de Ehrlich, não foram observadas variações significativas na evolução do crescimento tumoral quando comparadas com os grupos controles (tratados com meio de cultura DMEM[®] 10 % s.f.b., 10^7 células LM(pSecTag) e 10^7 células LM(tk-)). Este resultado foi observado em ambos os grupos tratados, tanto quando se utilizou 10^7 células LM(pSecTag)-endo, como quando se utilizou um número maior de células, 3×10^7 células LM(pSecTag)-endo, indicando que o tratamento não foi efetivo, como mostrado na figura 8.

Neste ensaio foram utilizados inicialmente 4 animais por grupo. A diferença com relação ao menor número de animais no final do experimento (figura 8) deve-se à morte destes ao longo do tratamento, o que não foi observado com o grupo tratado com as células produtoras de endostatina. No local da inoculação das células recombinantes observou-se um tumor, indicando a tumorigênese dos fibroblastos murinos transfectados.

Figura 8: Espessura dos tumores de Ehrlich nos camundongos Scid tratados com diferentes quantidades de células produtoras de endostatina. (▼) – Grupo controle: tratado com 10^7 células LM(pSecTag) (n=1), (◆) – Grupo controle: tratado com 10^7 células LM(tk-) (n=3), (♦) – Grupo controle: tratado com meio DMEM® 10% s.f.b. (n=2), (▲) – Grupo tratado com 3×10^7 células LM(pSecTag)-endo (n=4), (●) – Grupo tratado com 10^7 células LM(pSecTag)-endo (n=4).

- *Tratamento de camundongos C3H-HePas com tumores de Ehrlich:*

As curvas de crescimento tumoral dos animais imunocompetentes apresentando tumores de Ehrlich, tratados pela injeção dos fibroblastos murinos expressando endostatina (LM(pSecTag)-endo), mostram que, ao contrário dos resultados obtidos com os animais imunodeficientes, houve um menor crescimento tumoral do grupo tratado com as células produtoras de endostatina quando comparados com a espessura dos tumores dos grupos controles.

Nos ensaios em animais C3H-HePas com tumores de Ehrlich foram utilizados diferentes grupos controles: Animais tratados apenas com as células transfectadas com o vetor

(LM(pSecTag)), animais tratados com meio de cultura DMEM[®] 10 % Soro Fetal Bovino e animais tratados com fibroblastos murinos (LM(tk-)). Esses grupos controles foram unificados em um único gráfico observando-se uma evolução semelhante (figura 9). O grupo LM(pSecTag) foi então utilizado como controle para fins comparativos com o grupo tratado (LM(pSecTag)-endo).

Figura 9: Espessura dos tumores de Ehrlich nos grupos controles de camundongos C3H-HePas. (■) - Grupo controle (DMEM[®] 10 % s.f.b.) (n=10), (▼) - Grupo controle com 10⁷ células LM(pSecTag) (n=6), (★) - Grupo tratado com 10⁷ fibroblastos murinos (LM(tk-)) (n=6). Observa-se uma evolução semelhante entre os grupos.

Primeiramente analisou-se a ação de diferentes quantidades de células produtoras de endostatina, inoculadas livremente no tecido subcutâneo dos animais C3H-HePas com tumor de Ehrlich (0,5 mm). Houve uma redução de aproximadamente 39 % no grupo tratado com 10⁷ células produtoras de endostatina e 17 % nos animais tratados com 3x10⁷ células LM(pSecTag)-endo, quando comparado com o grupo controle LM(pSecTag) no décimo quarto dia de tratamento (figura 10).

Figura 10: Espessura dos tumores de Ehrlich nos camundongos C3H-HePas tratados utilizando diferentes quantidades de células LM(pSecTag)-endo. (♦) - Grupo controle: tratado com 10^7 células LM(pSecTag) (n=6), (▼) - Grupo tratado com 3×10^7 células LM(pSecTag)-endo (n=6), (▲) - Grupo tratado com 10^7 células LM(pSecTag)-endo (n=7). A diferença do grupo tratado com 10^7 células LM(pSecTag)-endo com relação ao grupo controle utilizando 10^7 células LM(pSecTag) foi considerada estatisticamente significativa para $p < 0,06$.

Com base nesses dados, mais um ensaio foi realizado utilizando animais tratados com 10^7 células produtoras de endostatina. Comparando o grupo tratado com o grupo controle (LM(pSecTag)) observou-se uma redução de 43 % da espessura dos tumores, no décimo quarto dia (figura 11). Notou-se uma maior sobrevivência desses animais tratados em relação ao experimento utilizando animais imunodeficientes. No local da inoculação das células recombinantes também observou-se um tumor local.

Figura 11: Espessura dos tumores de Ehrlich nos camundongos C3H-HePas tratados 10^7 células LM(pSecTag)-endo. (▼) – Grupo controle: tratado com 10^7 células LM(pSecTag) (n=6), (♦) - Grupo tratado com 10^7 células produtoras de endostatina (LM(pSecTag)-endo) inoculadas livremente (n=4). As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

- *Tratamento em camundongos C57Bl/6 com melanoma:*

Com base nos resultados obtidos com os animais apresentando os tumores de Ehrlich, nos ensaios com as células B16-F10 foram utilizadas 10^7 células produtoras de endostatina para o tratamento. Assim como anteriormente, foram utilizados diferentes grupos controles (animais tratados apenas com as células transfectadas com o vetor (LM(pSecTag)) e animais tratados com meio de cultura DMEM® com 10 % s.f.b) e observou-se uma evolução semelhante entre estes grupos, sendo por essa razão, unificados em um único gráfico, como mostrado na figura 12. Utilizou-se o grupo LM(pSecTag) como controle para fins comparativos com o grupo tratado com as células LM(pSecTag)-endo. Nos ensaios com melanoma os tumores do grupo controle tiveram um comportamento mais agressivo nesses animais pois, em torno do décimo quinto dia, apresentavam grandes dimensões levando ao

aparecimento de feridas. Além disso, o peso do tumor nesses animais dificultou a locomoção e, conseqüentemente, sua alimentação, dificultando a continuidade do experimento por um período maior.

Figura 12: Espessura do melanoma nos camundongos C57Bl/6 dos grupos controle. (■) – Grupo controle: utilizando 10^7 células LM(pSecTag) (n=4), (▲) - Grupo controle com meio de cultura DMEM® 10 % s.f.b. (n=4).

No tratamento dos camundongos C57Bl/6 com melanoma utilizando 10^7 células produtoras de endostatina pode-se notar (figura 13) que o grupo tratado com 10^7 células LM(pSecTag)-endo inoculadas livremente no tecido subcutâneo apresentou um menor crescimento tumoral, com uma redução de 50,3 % na sua espessura, quando comparado com as médias das espessuras dos tumores dos camundongos controles nos quais foram utilizados os fibroblastos LM(pSecTag) no décimo quarto dia de tratamento. Assim como nos ensaios anteriores também foi observado um pequeno tumor no local da inoculação das células LM(pSecTag) e LM(pSecTag)-endo.

Figura 13: Espessura do melanoma nos camundongos C57Bl/6 tratados utilizando células 10^7 células LM(pSecTag)-endo. (■) – Grupo controle: tratado com 10^7 células LM(pSecTag) (n=4), (■) - Grupo tratado com 10^7 células LM(pSecTag)- endo (n=4). As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

4.3.2- Tratamento pelo implante de células LM(pSecTag)-endo em dispositivos de imunoisolamento pré-implantados.

Nos ensaios com dispositivo de imunoisolamento foram considerados dois tipos de implante dos dispositivos nos animais. Em um primeiro protocolo o dispositivo foi implantado e, após o período de 14 dias, as células foram inseridas. Para o segundo protocolo, seguiu-se a recomendação do fabricante (TheraCyte[®]), na qual as células foram implantadas juntamente com o dispositivo (item 4.3.3).

Em um primeiro ensaio, devido à pequena capacidade interna do dispositivo, foram colocadas diferentes quantidades de células LM(pSecTag)-endo (10^6 e 10^7 células) em camundongos C3H-HePas com tumores de Ehrlich. O gráfico da figura 14 mostra que o tratamento utilizando 10^7 células LM(pSecTag)-endo foi mais efetivo do que ao utilizar 10^6

células. Neste ensaio utilizou-se um animal por grupo apenas para a verificação da funcionalidade do dispositivo ao implantar um grande número de células (10^7 células) em seu interior. Para analisar o efeito do tratamento utilizando as células encapsuladas faz-se necessário um ensaio com um maior número de animais que será relatado a seguir. Por estarem encapsuladas, não foi observado o crescimento de tumores no local de injeção das células LM(pSecTag)-endo como observado nos ensaios anteriores.

Figura 14: Espessura dos tumores de Ehrlich nos camundongos C3H-HePas tratados com diferentes quantidades de células LM(pSecTag)-endo em dispositivos de imunisolamento (TheraCyte®). (▼) - Grupo controle: utilizou-se 10^7 células LM (pSecTag) (n=3), (■) - Animal tratado com 1 milhão de células LM(pSecTag)- endo encapsuladas no dispositivo (n=1), (▲) - Animal tratado com 10^7 células LM(pSecTag)-endo (n=1).

- *Tratamento de camundongos C3H-HePas com tumores de Ehrlich*

Realizou-se um ensaio utilizando 10^7 células LM(pSecTag)-endo inoculadas em dispositivos de imunisolamento após a cicatrização da ferida no organismo do animal. Neste ensaio foram empregados diferentes grupos controles: animais tratados apenas com 10^7 células transfectadas com o vetor (LM(pSecTag)), animais tratados com meio de cultura

DMEM® 10% s.f.b., animais onde inoculou-se o dispositivo sem células em seu interior e animais tratados com o dispositivo e as células LM(pSecTag) em seu interior. Esses grupos controles foram unificados em um único gráfico observando-se uma evolução semelhante (figura 15). A partir disto utilizamos o grupo LM(pSecTag) inoculadas no interior do dispositivo como controle para fins comparativos com o grupo tratado (LM(pSecTag)-endo.

Figura 15: Espessura dos tumores de Ehrlich nos grupos controles de camundongos C3H-HePas. (▲) - Grupo com dispositivo inoculado sem células no interior (n=2), (■) - Grupo controle (DMEM® 10 % s.f.b.) (n=10), (▼) - Grupo controle com 10⁷ células LM(pSecTag) (n=6), (◆) - Grupo tratado com 10⁷ células LM(pSecTag) inoculadas no interior do dispositivo (n=3). Observa-se uma evolução semelhante entre os grupos.

No ensaio observou-se (figura 16) uma redução de aproximadamente 25% na média da espessura dos tumores dos camundongos tratados com as células produtoras de endostatina encapsuladas quando comparadas às médias de espessura tumoral obtidas do grupo controle, no décimo quarto dia de tratamento. No grupo onde foram inoculadas células produtoras de endostatina não encapsuladas, observou-se uma redução de 32% no mesmo período. A diferença entre os dois grupos tratados, um com células produtoras de endostatina inoculadas livremente e o outro com as células encapsuladas, foi de 7% para o mesmo período.

Figura 16: Espessura do tumor de Ehrlich nos camundongos C3H-HePas tratados com células LM(pSecTag)-endo livres ou em dispositivos de imunoisolamento (TheraCyte®). (▼) – Grupo controle onde foram implantados dispositivos e, após 14 dias, inoculou-se 10^7 células LM(pSecTag) no interior (n=3), (♥) – Grupo tratado com 10^7 células LM(pSecTag)- endo no interior do dispositivo de imunoisolamento inoculadas após a cicatrização do mesmo (n=5), (♦) – Grupo tratado com 10^7 células LM(pSecTag)- endo inoculadas livremente (n=5). As diferenças entre os grupos LM(pSecTag) e LM(pSecTag)-endo inoculadas no interior do dispositivo foram consideradas estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

- *Tratamento em camundongos C57Bl/6 com melanoma:*

Devido à evolução semelhante dos grupos controles nos ensaios utilizando B16-F10 tanto no experimento onde as células produtoras de endostatina foram inoculadas após a 14 dias da inserção do dispositivo, como no ensaio em que estas foram inoculadas juntamente com o dispositivo, estes grupos controles foram unificados em um único gráfico, como mostrado abaixo. A partir disto, utilizamos o grupo LM(pSecTag) inoculadas no interior do dispositivo como controle para fins comparativos com o grupo tratado com as células produtoras de endostatina LM(pSecTag)-endo (figura 17).

Figura 17: Espessura do melanoma nos grupos controles de camundongos C57Bl/6 com melanoma. (■) - Grupo controle (DMEM® 10% s.f.b.) (n=4), (▼) - Grupo controle: tratado com 10⁷ células LM(pSecTag) (n=4), (▲) Grupo controle: dispositivo inoculado sem células no interior (n=2), (◆)- Grupo controle: tratado com 10⁷ células LM(pSecTag) inoculadas no interior do dispositivo (n=2). Observa-se uma evolução semelhante entre os grupos.

No tratamento dos animais com melanoma em que as células foram implantadas após 14 dias da inoculação do dispositivo de imunoisolamento, observou-se (figura 18), uma redução média de 42% da espessura dos tumores nos camundongos tratados, no décimo quarto dia, quando comparado com o grupo controle. A redução foi de 47%, no mesmo período, no caso do tratamento com o mesmo número de células produtoras de endostatina inoculadas livremente. Até o sétimo dia a evolução tumoral foi semelhante entre os grupos tratados mas, a partir desse dia, observa-se um resultado menos expressivo no grupo utilizando o dispositivo (em azul).

Figura 18: Espessura do melanoma nos camundongos C57Bl/6 tratados com células LM(pSecTag)-endo livres ou em dispositivos de imunisolamento (TheraCyte®). (▼) – Grupo controle: tratado com 10^7 células LM(pSecTag) inoculadas no dispositivo (n=2), (■) – Grupo tratado com 10^7 células LM(pSecTag)-endo inoculadas livremente (n=4), (♦) – Grupo tratado com 10^7 células LM(pSecTag)-endo inoculadas no interior do dispositivo de imunisolamento (n=2). As diferenças entre os grupos tratados com LM(pSecTag)-endo inoculadas livremente e LM(pSecTag)-endo encapsuladas comparados com o grupo controle LM(pSecTag) foram consideradas estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

4.3.3- Tratamento pelo implante de células LM(pSecTag)-endo inoculadas no dispositivos de imunisolamento.

Nesse experimento seguiu-se as instruções do fabricante dos dispositivos TheraCyte®, que sugere uma maior sobrevivência das células dentro do sistema quando estas são implantadas nos animais juntamente com os dispositivos. Para este ensaio foram utilizados animais C57Bl/6 com melanoma. Após o crescimento do tumor, até espessura aproximada de

0,5 mm, o dispositivo foi implantado na região subcutânea dos animais já contendo 10 milhões de células LM(pSecTag)-endo em seu interior.

Observa-se na figura 19 que houve uma evolução de crescimento tumoral parecida entre os grupos tratados com as células produtoras de endostatina com e sem o uso do dispositivo de imunoisolamento, sendo que, ao contrário dos ensaios anteriores, observa-se um melhor resultado no grupo tratado utilizando o dispositivo de imunoisolamento após o sétimo dia. Nota-se uma regressão na curva de crescimento tumoral de 46 %, no décimo quarto dia, no grupo tratado sem o uso do dispositivo e, 54,7 % no grupo tratado com o dispositivo de imunoisolamento em comparação com os controles, sendo este processo portanto, mais eficiente do que na inoculação das células produtoras de endostatina após o período de cicatrização da ferida e neovascularização ao redor do dispositivo da TheraCyte[®].

Figura 19: Espessura do melanoma nos camundongos C57Bl/6 tratados com células LM(pSecTag)-endo livres ou em dispositivos de imunoisolamento (TheraCyte[®]). (♦) - Grupo controle: tratado com 10^7 células LM(pSecTag) inoculadas no interior do dispositivo (n=2), (■) - Grupo tratado com 10^7 LM(pSecTag)-endo inoculadas livremente (n=4), (◆) - Grupo tratado com 10^7 células LM(pSecTag)-endo inoculadas no interior do dispositivo TheraCyte[®] previamente à implantação deste (n=3). As diferenças entre os grupos tratado as células produtoras de endostatina inoculadas no interior do dispositivo e grupo tratado com as células produtoras de endostatina inoculadas livremente em

comparação com o grupo controle LM(pSecTag) foram consideradas estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

Pode-se notar, em um mesmo gráfico, a comparação entre as duas metodologias utilizadas na implantação do dispositivo para o tratamento de animais C57Bl/6 com melanoma (figura 20). Apesar de o número de animais tratados ser muito pequeno, devido ao custo elevado e ao fato de que dispúnhamos de um número limitado de dispositivos, acreditamos que este processo foi mais eficiente do que na inoculação das células produtoras de endostatina após o período de 14 dias de implantação do dispositivo da TheraCyte®.

Figura 20: Espessura do melanoma nos camundongos C57Bl/6 dos tratados com dispositivo utilizando ambas as metodologias em comparação com o grupo controle. (↗) - Grupo utilizando 10 milhões de células LM(pSecTag) no dispositivo (n=4), (■) – Grupo tratado com 10⁷ células LM(pSecTag)-endo inoculadas no dispositivo de imunisolamento após a cicatrização deste (n=2), (▲) – Grupo tratado com 10⁷ células LM(pSecTag)-endo já encapsuladas no dispositivo de imunisolamento (n=3).

Alguns animais C3H-HePas com tumor de Ehrlich foram sacrificados por deslocamento cervical no 17º dia, e seus tumores foram mensurados, retirados e pesados. Nos

gráficos da figura 21 podemos observar a diferença entre o peso e diâmetro dos tumores, ratificando os resultados anteriores.

Figura 21: [A] Peso (g) dos tumores de Ehrlich dos animais após a retirada do mesmo no 17º dia (n=5). [B] Espessura (mm) dos tumores de Ehrlich no 17º dia de tratamento para os primeiros ensaios com C3H-HePas dos respectivos grupos (n=5). Observou diferenças consideradas estatisticamente significantes entre os grupos LM(pSecTag) e LM(pSecTag)-endo (como mostradas no histograma).

4.4- Dosagem da endostatina nos soros dos animais.

As células transfectadas produtoras de endostatina apresentaram, em seu sobrenadante, uma concentração de 0,4 $\mu\text{g}/10^6$ células/24 horas (Tornieri e cols., 2003). As tabelas 1 e 2 mostram a análise de endostatina nos soros dos animais:

Tabela 1: Análise quantitativa da endostatina presente no soro dos animais C3H/HePas com tumor de Ehrlich utilizando kit de ensaio imunoenzimático para determinação de endostatina murina da Chemicon: CYT 160[®]

Dosagem da endostatina (ng/mL)							
Grupo	Animais controles	Animais tratados com LM(pSecTag)		Animais tratados com LM(pSecTag)-endo			
				com dispositivo		Sem dispositivo	
Data da sangria	7º dia	7º dia	14º dia	7º	14º	7º	14º
Endostatina (ng/ mL no soro)	48,4 (+/-) 2,8	52 (+/-) 2,0	60 (+/-) 3,8	166 (+/-) 14,1	80 (+/-) 2,8	84 (+/-) 3,0	79 (+/-) 14,2
				P<0,05			
				P<0,05			
				P<0,05			
				P<0,1			

Tabela 2: Análise quantitativa da endostatina presente no soro dos animais C57Bl/6 com melanoma utilizando kit de ensaio imunoenzimático para determinação de endostatina murina da Chemicon: CYT 160[®]

Dosagem da endostatina (ng/mL)					
Grupo	Animais controles	Animais tratados com LM(pSecTag)		Animais tratados com LM(pSecTag)-endo	
Data da sangria	7º dia	7º dia	14º dia	7º	14º
Endostatina (ng/ mL no soro)	75 (+/-) 2,8	76 (+/-) 2,0	73 (+/-) 3,8	108 (+/-) 14,1	76 (+/-) 2,8
		P<0,05		P<0,2	

Para a realização da dosagem de endostatina, foram analisados animais dos grupos controles (um conjunto de soros de 8 animais), animais tratados com LM(pSecTag), (soro de

3 animais), assim como nos casos dos tratados com as células produtoras de endostatina com e sem dispositivo. A data da sangria refere-se aos dias após inoculação das células para o tratamento.

Nota-se nas tabelas 1 e 2 que a diferença entre os grupos tratados e controles é menor principalmente no décimo quarto dia de tratamento. Pode-se observar uma boa efetividade da imunocontenção com o dispositivo visto que há uma maior dosagem desta proteína neste grupo em comparação com o grupo tratado com as células inoculadas livremente. No caso dos animais com melanoma não realizou-se a análise nos dois procedimentos com dispositivo devido à descontinuidade deste kit analisado.

4.6- Análise histológica e imunohistoquímica dos tumores, dos dispositivos e dos vasos sanguíneos.

Na análise histológica por hematoxilina-eosina dos dispositivos retirados dos animais após 17 dias de tratamento. Observa-se a presença de uma camada de células no interior próximas à membrana do dispositivo, referente às células produtoras de endostatina, mas não se pode confirmar a viabilidade das mesmas. Nota-se também a presença de vasos sanguíneos ao redor do dispositivo ratificando a capacidade da membrana do dispositivo de permitir uma neovascularização ao seu redor (figura 22).

Figura 22: Análise histológica por Hematoxilina-Eosina de lâminas dos cortes do dispositivo de imunisolamento implantado nos animais com células produtoras de endostatina em seu interior. [A] Corte evidenciando os vasos sanguíneos formados ao redor do dispositivo (setas). Na parte superior (L) temos a região interna do dispositivo (Lúmen) com as células produtoras de endostatina. Abaixo temos a membrana do dispositivo (M) e (F.E) refere-se à porção externa a este, onde encontram-se os vasos sanguíneos.

Analisando as lâminas dos dispositivos (retirado no 14º dia) com anticorpo anti-endostatina (figura 23) nota-se que há a liberação da proteína endostatina pelas células LM(pSecTag)-endo presentes no interior do dispositivo e que esta vai se difundindo gradativamente. O mesmo não é observado na lâmina controle da reação e na lâmina onde se analisou as células não produtoras de endostatina (LM(pSecTag)) presentes no interior do dispositivo.

Figura 23: Ensaio imunohistoquímico utilizando anticorpo anti-endostatina. **[A]** Corte da região de inoculação do dispositivo de imunoisolamento retirado no 14º dia do animal C57Bl/6 com melanoma tratados com as células produtoras de endostatina encapsuladas. Pode-se observar a coloração marrom referente à endostatina e a difusão gradativa desta no estroma ao redor do dispositivo, provavelmente esta endostatina apresenta-se relacionada ao núcleo das células estromais. **[B]** Reação controle (BSA- albumina bovina) ratificando que a coloração refere-se à liberação da endostatina. **[C]** Corte do dispositivo de imunoisolamento com células não produtoras de endostatina (LM(pSecTag)) presentes em seu interior no 14º dia de tratamento do animal C57Bl/6 com melanoma. Neste pode-se observar que não há a produção de endostatina, assim como no controle da reação deste (BSA), observado na foto **[D]**. (L)- Lúmen; (FE) referente à face externa (estroma).

Com relação à análise do possível efeito da endostatina na angiogênese, verificou-se primeiramente a área vascular. Nos ensaios com tumor de Ehrlich (utilizando imunohistoquímica com anticorpos anti-CD31 e anti-CD34), apesar deste ser analisado em diversas etapas do crescimento tumoral, praticamente não foram observadas estruturas vasculares não sendo possível esse procedimento. Na análise do melanoma, retirado no sétimo dia de tratamento, através da imunohistoquímica utilizando anticorpo anti-CD34, não foram observadas diferenças significativas na extensão da área vascular do grupo tratado com as células produtoras de endostatina ($2,928 \pm 0,4082$) em comparação com o grupo controle ($4,398 \pm 0,9087$) (tratados com células transfectadas apenas com o vetor) (figura 24).

Figura 24: Análise da área vascular de cortes histológicos de melanomas de animais C57Bl/6 em que foi feita imunohistoquímica utilizando anticorpo anti-CD31 (n=5). Gráfico referente à média aritmética e os dados de cada animal. As diferenças entre os grupos não foram consideradas estatisticamente significantes ($p=0,22$).

Em outra análise, referente ao número de estruturas vasculares, nas quais foram consideradas como estruturas vasculares aqueles vasos com luz interior ou com hemácias, observou-se um menor número dessas estruturas nos tumores dos animais do grupo tratado ($4,84 \times 10^{-3} \pm 0,44 \times 10^{-3}$) em comparação com os animais do grupo controle ($8,26 \times 10^{-3} \pm$

$1,44 \times 10^{-3}$). Com relação à análise dos vasos funcionais (aqueles que apresentam hemácias em seu interior), também nota-se uma diferença significativa entre o grupo tratado com as células produtoras de endostatina ($2,68 \times 10^{-3} \pm 0,55 \times 10^{-3}$) em relação ao grupo controle ($4,18 \times 10^{-3} \pm 0,32 \times 10^{-3}$), como mostrado na figura 25.

Figura 25: Análise de vasos sangüíneos em cortes histológicos de melanomas de animais C57Bl/6 em que foi feita imunohistoquímica utilizando anticorpo anti-CD34. **[A]** Números de estruturas vasculares por área tumoral ($p=0,008$) ($n=5$). **[B]** Número de vasos funcionais em relação à área tumoral ($p=0,047$) ($n=5$). Gráfico referente à média aritmética e os dados de cada animal. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes em ambos os gráficos.

Na figura seguinte temos fotos de cortes histológicos de melanoma nos quais utilizou-se imunohistoquímica com anticorpos anti-CD34, podemos visualizar as áreas tumorais e os vasos sanguíneos presentes no grupo tratado com células produtoras de endostatina e o grupo controle (animais tratado com as células transfectadas com o vetor).

[A]

[B]

Figura 26: Foto de lâminas do melanoma representando as estruturas vasculares em que realizou-se a imunohistoquímica com anticorpos anti-CD34. [A] Melanoma do grupo tratado com células produtoras de endostatina e observam-se pequenas estruturas vasculares não funcionais, evidenciada pela seta. [B] Melanoma o grupo tratado com as células LM(pSecTag) e observa-se estruturas vasculares funcionais, evidenciados pelas setas.

4.6 – Análise da expressão das diferentes isoformas de VEGF murino.

As extrações dos RNAs totais das amostras de melanoma ocorreram com sucesso pois as bandas recombinantes dos RNAs encontraram-se íntegras. Os cDNAs provenientes dos RNAs extraídos das amostras do melanoma foram obtidos com êxito. Estes foram diluídos a

fim de se obter uma concentração de cerca de 200 ng para um melhor aproveitamento da reação PCR. Ao utilizar o par de iniciadores de VEGF pode-se observar que houve a amplificação, em todas as amostras analisadas, do fragmento alvo (tamanho:100pb) pertencente às 3 isoformas de VEGF. Como controle da reação foi utilizado um par de primer de β -actina. Após a obtenção dos valores da fluorescência (C_t) nas reações de PCR em tempo real, utilizando-se o programa ROTOR gene6[®] (figura 28), utilizou-se o modelo matemático proposto por Pfaffl (2001) para quantificar a expressão da proteína VEGF nos tumores dos animais do grupo tratado com as células produtoras de endostatina e do grupo tratado com as células transfectadas com o vetor (n=4).

Observou-se certa diferença entre o grupo tratado (5.560 ± 2.055) e o grupo controle (11.24 ± 4.295), não sendo estas consideradas significativas, e com grande variação entre os animais de um mesmo grupo, como mostrado na figura 29. Neste ensaio não foram analisadas amostras do grupo controle (onde inoculou-se meio de cultura DMEM[®]), devido ao pequeno numero de animais analisados (n=2).

Figura 27: Representação gráfica do aumento relativo da fluorescência resultante da ligação do Syber Green ao cDNA de todas as amostras, mostrando a efetividade da quantificação da proteína VEGF extraída dos tumores dos grupos tratados com as células produtoras de endostatina e controle (tratados com LM(pSecTag)) (n=4) pela PCR em tempo Real.

Figura 28: Gráfico representando a análise quantitativa de cDNA de VEGF amplificados por PCR em tempo real. Os resultados foram calculados no programa GraficPad-Prism pelo teste T (n=4). Gráfico referente à média aritmética e os dados de cada animal. Obteve-se $p=0,48$.

5. DISCUSSÃO

Muitos artigos demonstram a efetividade terapêutica do uso de endostatina na supressão de angiogênese tumoral. O uso da terapia antitumoral envolvendo a endostatina é explicado devido à sua característica de se apresentar com ação antiangiogênica endógena com baixa ou nenhuma toxicidade, inibindo a proliferação e migração e indução de apoptose em células endoteliais ativadas, estáveis geneticamente e presentes nos vasos que dão o aporte nutritivo para o desenvolvimento tumoral, podendo assim ser utilizada em diversos modelos tumorais (Boehm e cols., 1997; Dhanabal e cols., 1999; Herbst e cols., 2002; O'Reilly e cols., 1997).

Diferentes sistemas foram descritos com a finalidade de obtenção de liberação constante de endostatina e mostraram eficiência nos tratamentos tumorais como, por exemplo, o uso de adenovirus, sistemas virais e retrovirais (Coutinho e cols., 2007; Wang e cols., 2002; Yamanaka e cols., 2001) mas, em alguns casos, seu uso pode ser limitado devido à possível toxicidade e imunogenicidade (Feldman e cols., 2001). Em 2001, dois artigos (Read e cols. [B]; Joki e cols.) mostraram que a injeção de microcápsulas de alginato, contendo células secretando endostatina nas imediações de gliomas de origem humana, inibiram o crescimento dos tumores em 35 e 80 % respectivamente, em camundongos atímicos (Nude). Outros trabalhos, utilizando gliomas induzidos em ratos, também demonstram a ação do implante local de microcápsulas contendo células produtoras de endostatina, principalmente sobre a neoformação de vasos tumorais (Read e cols., 2001 [A]; Read e cols., 2001 [B]). O uso de microcápsulas implantadas localmente, no entanto, limita a liberação de endostatina para futuro uso clínico, pois a liberação local de drogas pode não ser factível para o tratamento de muitos tipos de tumores, especialmente para o caso de metástases. Estudos recentes demonstraram ainda a utilidade do uso de microcápsulas contendo Células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) expressando endostatina quando implantadas na cavidade abdominal para o tratamento de melanomas (B16-F10) em camundongos C57Bl/6 em que foram obtidas reduções de 77 a 80% no tamanho dos tumores (Teng e cols, 2007; Zhang e cols, 2007). As

células CHO, de origem xenogênica, foram utilizadas para que, em caso de ruptura das microcápsulas na cavidade abdominal, as células fossem rapidamente rejeitadas sem formarem tumores *in vivo*. O uso de microcápsulas, no entanto, ainda é limitado pois a sobrevivência das células dentro das microcápsulas por longos períodos de tempo ainda é um problema que talvez esteja relacionado ao suprimento insuficiente de oxigênio para as células encapsuladas, à falta de pureza do alginato, entre outros (Teng e cols, 2007). Outro problema relacionado ao uso de microcápsulas de alginato é a impossibilidade de retirada das células ao final do tratamento ou no caso de efeitos colaterais indesejáveis.

Neste trabalho foi descrito um protocolo terapêutico para o tratamento antiangiogênico de tumores em modelos animais utilizando células expressando endostatina em macrocápsulas de imunoisolamento. Foram utilizados dois modelos tumorais, Ehrlich e Melanoma (B16-F10), induzidos nos camundongos C3H-HePas e C57Bl/6, respectivamente. Para o tratamento foram utilizados fibroblastos de origem murina expressando endostatina encapsuladas em dispositivos de imunoisolamento TheraCyte[®]. Os tratamentos foram eficazes pois houve diminuição da taxa do crescimento tumoral de até 25 % para o tumores de Ehrlich e de até 54 % para o melanoma, quando comparadas com o crescimento dos tumores em camundongos tratados com as mesmas células transfectadas com o vetor sem o gene da endostatina. Realizou-se primeiramente o implante destas células livremente nos animais para verificarmos se esta apresenta eficácia no tratamento visto que o implante de células geneticamente modificadas de origem isogênica para os animais C3H e alogênica para os camundongos C57Bl/6 apresentam implicações quanto à uma imunossupressão e possível mutação e multiplicação dessas células no organismo, não sendo uma terapia viável.

Foram testados dois métodos de implante dos dispositivos de imunoisolamento: em um protocolo, implantamos primeiramente o dispositivo e, após cicatrização da ferida, neovascularização ao redor do dispositivo e desenvolvimento tumoral (aproximadamente 14 dias), inoculamos as células LM(pSecTag)-endo em seu interior. Observou-se uma redução de 25 % na espessura dos tumores nos animais com tumor de Ehrlich e 42 % nos animais com melanoma no décimo quarto dia de tratamento. O implante do dispositivo antes da injeção das células expressando endostatina teve como objetivo melhorar a vascularização na interface membrana do dispositivo/tecido do hospedeiro antes da implantação das células que secretam endostatina, o que poderia possivelmente interferir negativamente na formação dos vasos sanguíneos, prejudicando assim a vascularização ao redor do dispositivo, a difusão da proteína

e conseqüentemente a resposta ao tratamento. Em um segundo protocolo seguiu-se a sugestão da TheraCyte[®] que, em seus trabalhos, obtiveram melhores resultados implantando o dispositivo nos animais contendo as células em seu interior, no qual os dispositivos foram implantados juntamente com as células LM(pSecTag)-endo e observou-se uma redução média de 54% na espessura dos tumores no décimo quarto dia de tratamento, comparada com a espessura média dos tumores do grupo controle. Optou-se por realizar esse tratamento em animais com melanoma devido ao melhor resultado deste no processo anterior. Apesar de o número de animais tratados ser muito pequeno, devido ao custo elevado e ao fato de que dispúnhamos de um número limitado de dispositivos, acreditamos que este processo foi mais eficiente do que a inoculação das células produtoras de endostatina após o período de cicatrização e neovascularização ao redor do dispositivo da TheraCyte[®].

Artigos que analisaram o efeito da endostatina sobre a vascularização de feridas em tecidos não tumorais (cicatrização de feridas) descreveram que esta proteína apresenta um pequeno efeito na formação de um tecido menos denso e com um número maior de vasos não funcionais e diminuição na força de tensão das cicatrizes (Berger e cols., 2000; Bloch e cols., 2000). No entanto, no presente trabalho a presença de vasos sangüíneos ao redor dos dispositivos (dado não mostrado) que foram implantados já contendo as células em seu interior e também os bons resultados de inibição de crescimento dos melanomas, indicam que se houve uma ação deletéria da endostatina secretada pelas células LM(pSecTag)-endo sobre a neovascularização, ao redor do dispositivo, ela foi pequena ou foi sobrepujada por outros fatores, como uma maior sobrevivência das células expressando endostatina obtida com este processo de implante dos dispositivos, quando comparado com o processo em que os dispositivos foram pré-implantados e por uma maior ação na vasculatura tumoral visto que há moléculas expressas especificamente por estas em comparação com a vasculatura normal, sugerindo que estas possam ser seletivamente destruídas (Melo e cols., 2003)

Nos ensaios em que foram utilizados animais imunodeficientes não foi observada eficácia do tratamento utilizando as células produzindo endostatina livres, apesar de notar-se uma maior sobrevivência destes animais tratados em comparação com o grupo controle, na curva de crescimento tumoral, talvez por se tratarem de tumores mais agressivos nesses animais, visto o grande número de animais que morreram ao longo do tratamento do grupo controle bem como do tratado.

Em trabalhos realizados anteriormente, foi estudado o crescimento de tumores de pâncreas humanos 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 é obtida com níveis intermediários desta proteína no soro dos camundongos. Celik e cols. (2005) demonstraram que níveis de endostatina de somente 62ng de endostatina/mL de soro foram necessários para obtenção do melhor resultado de inibição do crescimento do tumoral (câncer pancreático humano) quando foram injetados 500 mg/Kg/dia de endostatina humana, em comparação com doses maiores ou menores. No estudo de Tjin Tham Sjin e cols. (2006) também foi observada um melhor resultado de inibição do crescimento tumoral no tratamento com a dosagem no intervalo de 126 a 173µg de endostatina/mL de soro em camundongos. Tais dados sugerem uma possível justificativa para o fato de termos obtido melhores resultados de regressão dos tumores quando foram utilizadas 10 milhões de células produtoras de endostatina nos tratamentos tumorais ao invés de uma quantidade maior (30 milhões) ou menor (1 milhão) de células livres (figura 10 e 20 respectivamente). Notou-se, em nossos ensaios, que a concentração endógena de endostatina em camundongos normais, sem tumores, variaram de 43 a 58 ng/ml de soro para os camundongos C3H e de 56 a 98 ng/ml para os camundongos C57Bl/6 (dados não mostrados). A diferença entre os grupos tratados e controles é menor principalmente no décimo quarto dia de tratamento. Isso provavelmente esta relacionada à provável morte destas células produtoras de endostatina após 14 dias, como foi visualizado pela histologia com H.E dos dispositivos onde não foi observada viabilidade das células nesse período. Pode-se também observar, com relação à esta dosagem, que a imunocontenção foi eficiente visto que há maior quantidade de endostatina no soro dos animais com dispositivo do que sem, nos camundongos com tumor de Ehrlich. Também observou-se resultado melhor no sétimo dia de tratamento dos animais com melanoma, mas as análises dos dois processos com dispositivo não foi realizada devido à descontinuidade do uso do Kit de imunoensaio. Os níveis ótimos de endostatina como fator antiangiogênico variam de tumor para tumor, de acordo com Tjin Than Sjin e cols (2006), é quase certo afirmar que, quanto mais angiogênico o tumor, maior será a quantidade de endostatina necessária para se ter um tratamento eficaz. Assim, a obtenção uma dose ideal e de um sistema que possibilite a liberação desta proteína por um longo período são estratégias necessárias para obtenção de um melhor resultado de regressão tumoral.

Analisando os diversos experimentos *in vivo* realizados observou-se que os animais imunocompetentes com tumor de Ehrlich e melanoma tratados com as células LM(pSecTag)-endo, tinham um acréscimo no tempo de sobrevida quando comparados com o grupo controle que, devido ao estado avançado do tumor, encontravam-se muito debilitados e por isso normalmente eram sacrificados antes dos animais do grupo tratado (normalmente a partir do décimo quinto dia). Observou-se um melhor resultado nos ensaios utilizando o melanoma e isto pode ser justificado devido à característica do tumor de Ehrlich de apresentar grandes regiões de necrose, pontos hemorrágicos e praticamente nenhuma atividade angiogênica no tumor na forma ascítica, sendo esta um pouco evidenciada no tumor na fase sólida (Jiang e cols., 1989; Lage e cols., 2000; Silva e cols., 2004; Silva e cols., 2006). Estes dados fornecem subsídios para a ineficácia de se tentar analisar os vasos presentes nos tumores, mesmo em diversos estágios tumorais utilizando anticorpos anti-CD31 e anti-CD34. Portanto, obtivemos uma regressão na espessura tumoral, mas não sabemos justificar qual foi o mecanismo de ação da proteína endostatina. Coutinho e cols., 2007 recentemente observaram, em tratamento de camundongos SCID com tumores renais (NIH/3T3), que a endostatina pode não atuar somente nas células endoteliais, mas também células inflamatórias como os leucócitos e estes auxiliam na ação antitumoral desta proteína, análises com animais imunocompetentes estão sendo realizadas por esses pesquisadores para confirmarem o observado. Neste trabalho observou-se uma grande presença de infiltrados inflamatórios nos tumores de Ehrlich analisados por imunohistoquímica com anti CD-31 (dado não mostrado), sendo necessária uma análise comparativa desses infiltrados nos grupos controles e tratados para avaliarmos esta provável ação da endostatina.

O efeito da endostatina expressa por células LM(pSecTag)-endo na neovascularização do melanoma em camundongos foi determinado pela análise do número de estruturas vasculares, que se apresentou menor nos camundongos tratados com as células expressando endostatina ($4,84 \times 10^{-3} \pm 0,44 \times 10^{-3}$) do que nos camundongos controle ($8,26 \times 10^{-3} \pm 1,44 \times 10^{-3}$). O número de vasos viáveis por área tumoral também foi menor nos camundongos tratados com as células LM(pSecTag)-endo ($2,68 \times 10^{-3} \pm 0,55 \times 10^{-3}$) do que nos camundongos tratados com as células LM(pSecTag) ($4,18 \times 10^{-3} \pm 0,32 \times 10^{-3}$). Com relação à extensão da área vascular, os tumores do grupo tratado apresentaram uma menor área vascular ($2,93 \pm 0,41$) do que o grupo controle ($4,40 \pm 0,91$), embora a diferença obtida não seja estatisticamente significativa.

Com o intuito de confirmarmos a expressão de 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 retirados dos animais e foi feita reação de imunohistoquímica utilizando-se anticorpo anti-endostatina. A coloração marrom nas imediações do dispositivo nas lâminas coradas por imunohistoquímica indica que houve a ligação do anticorpo à endostatina expressa e secretada pelas células presentes nos dispositivos TheraCyte[®], demonstrando a produção da endostatina, sua liberação e difusão pelo estroma nas imediações do dispositivo (figura 23). Observou-se uma provável ligação desta proteína liberada com o núcleo das células estromais, e isto poderia ser justificado pela ligação da endostatina com o receptor de membrana celular nucleolina, também existentes nas células quiescentes, essa proteína é então transportada para o núcleo celular onde ocorre a fosforilação da nucleolina (Shi e cols., 2007), mas seriam necessários testes mais específicos para confirmarmos a presença desta proteína no núcleo das células estromais. O mesmo resultado não foi observado no caso das lâminas dos dispositivos com células LM(pSecTag), confirmando a ausência de endostatina murina nestas amostras. Esses resultados endossam a hipótese de que a obtenção de regressão dos tumores foi obtida pela ação da endostatina liberada pelas células expressando esta proteína em imunoisolamento. Pode-se, no entanto, observar nas lâminas de imunohistoquímica (figura 23) que houve reação, inespecífica, obtida tanto com as células LM(pSecTag)-endo quanto com as células LM(pSecTag) dentro dos dispositivos. Nas diversas lâminas analisadas pode-se observar células LM principalmente na membrana na face interior do dispositivo, para aderência e também por ser a região que provavelmente apresenta maior disponibilidade de oxigênio e nutrientes.

Brauker e cols. (1996) utilizando membrana de PTFE, semelhante à utilizada no sistema TheraCyte[®], demonstraram que células embrionárias pulmonares, de origem xenogênica (de camundongos), em imunoisolamento em ratos Lewis, foram destruídas dentro de 3 semanas, enquanto as células de origem alogênica (ratos Sprague Dawley) ou isogênica sobreviveram durante um ano. Os autores sugerem a possibilidade de que os tecidos xenogênicos são mortos pelo acúmulo local de células inflamatórias mediadas pela liberação de antígenos dos tecidos dentro do dispositivo e apresentação por uma via indireta. Outros autores (Yanay e cols., 2003) também descreveram alta viabilidade de células isogênicas ou alogênicas recombinantes expressando eritropoietina em dispositivos TheraCyte[®] um ano após o implante e sem evidências de resposta imune do hospedeiro. Por essa razão no presente

trabalho foram utilizadas células (LM (tk-)) isogênicas para o tratamento de camundongos C3H-HePas e alogênicas para camundongos C57Bl/6. A análise dos dispositivos corados por hematoxilina/eosina mostra a presença de grandes vasos sanguíneos nas imediações dos dispositivos, ratificando a suposição de que os dispositivos TheraCyte® possibilitam a neovascularização ao seu redor. No entanto, as lâminas de histologia observadas demonstram que as células utilizadas para o tratamento se encontravam aparentemente inviáveis. Acreditamos que a pequena duração da viabilidade das células dentro dos dispositivos de imunoisolamento foi o maior problema que encontramos para o nosso sistema e que provavelmente não está associado à rejeição, pois foi observado mesmo quando células isogênicas foram utilizadas e também não foram observadas células do sistema imune ao redor do dispositivo. Segundo o pessoal técnico da TheraCyte®, alguns tipos de células resistem melhor ao implante nos dispositivos de imunoisolamento e talvez obtivéssemos maior viabilidade das células e melhores resultados de inibição de tumores se fosse utilizado outro tipo de células expressando endostatina. No caso de um possível tratamento em humanos utilizando este mesmo sistema, células de origem humana deveriam ser utilizadas.

A quantificação de VEGF nos tecidos tumorais por *PCR* em tempo real foi realizada comparando os tumores do grupo controle com os tratados com as células produtoras de endostatina, mostrando uma expressão levemente menor nos animais tratados, mas este resultado não apresentou nível de significância aceitável. Muito provavelmente devido à ação específica da endostatina pelas células endoteliais, e não nas células tumorais produtoras de VEGF, não tendo portanto uma ação direta na produção deste.

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 mecanismo poderão ser aplicados a sistemas semelhantes.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi pela primeira vez descrito o tratamento antiangiogênico de tumores em modelos animais utilizando células expressando endostatina em imunoisolamento em macrocápsulas. A liberação de endostatina pelas células produtoras, mantendo um suprimento persistente da proteína em circulação, apresenta vantagem potencial sobre a administração intermitente da proteína, na qual se obtém picos de concentração da droga. Os resultados descritos são bastante promissores, pois foram obtidos decréscimos significativos do crescimento dos tumores de Ehrlich em camundongos C3H-HePas e também de melanoma em camundongos C57Bl/6 quando as células foram implantadas no dispositivo de imunoisolamento da TheraCyte[®], cujo melhor resultado foi obtido no procedimento utilizando a implantação das células já encapsuladas no dispositivo de imunoisolamento. Este sistema apresenta a vantagem de liberação constante de endostatina na circulação dos animais, evitando a necessidade de injeções constantes da proteína com propriedades terapêuticas. Outra vantagem muito importante deste dispositivo em comparação com a utilização de vetores virais ou do uso de células recombinantes em microcápsulas para o tratamento antiangiogênico de tumores é a possibilidade de retirada dos dispositivos no caso de efeitos colaterais graves e também a diminuição a quase zero da possibilidade de escape e transformação das células utilizadas para tratamento em células potencialmente malignas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BESSIS, N.; HONIGER, J.; DAMOTTE, D.; MINTY, A.; FOURNIER, C.; FRADELIZI, D.; BOISSIER, M., Encapsulation in hollow fibres of xenogeneic cells engineered to secrete IL-4 or IL-13 ameliorates murine collagen-induced arthritis (CIA). **Clin Exp Immunol.**, v.117, p. 376-82, 1999.
2. BERGER, A. C.; FELDMAN, A. L.; GNANT, M. F.; KRUGER, E. A.; SIM, B. K.; HEWITT, S.; FIGG, W. D.; ALEXANDER, H. R.; LIBUTTI, S. K., The angiogenesis inhibitor, endostatin, does not affect murine cutaneous wound healing. **J Surg Res.**, v.91, p.26-31, 2000.
3. BERGERS G.; BENJAMIN L. E., Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nat Rev Cancer.**, v.3, p. 401-10, 2003.
4. 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 J.**, v.15, p.2373-6, 2000. porn a discussao
5. 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.404-7, 1997.
6. BRAUKER, J. H.; CARR-BRENDEL, V. E.; MARTINSON, L. A.; CRUDELE, J.; JOHNSTON, W. D.; JOHNSON, R. C., Neovascularization of synthetic membranes directed by membrane microarchitecture. **J Biomed Mater Res.**, v.29, p.1517-24,1995.
7. 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.1671-7, 1996.
8. 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 Res.**, v.65, p.11044-50, 2005.
9. 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. **Trans Am Soc Artif Intern Organs**, v.21, p.8-15. 1975.
10. 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.4305, p.780-2, 1977.
11. 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 Expr Purif.**,v. 35,p. 11-6, 2004.

12. COUTINHO, E. L.; ANDRADE L. N.; CHAMMAS, R.; MORGANTI, L.; SCHOR, N.; BELLINI M. H., Anti-tumor effect of endostatin mediated by retroviral gene transfer in mice bearing renal cell carcinoma. **FASEB J.** vol 21, p. 3153-61, 2007.
13. CRAMER, T.; SCHIPANI, E.; JOHNSON, R. S.; SWOBODA, B.; PFANDER, D., Expression of VEGF isoforms by epiphyseal chondrocytes during low-oxygen tension is HIF-1 alpha dependent. **Osteoarthritis Cartilage**, v.12, p.433-9, 2004.
14. DALLE, B.; PAYEN, E.; REGULIER, E.; DEGLON, N.; ROUYER-FESSARD, P.; BEUZARD, Y.; AEBISCHER, P., Improvement of mouse beta-thalassemia upon erythropoietin delivery by encapsulated myoblasts. **Gene Ther.**, v.6, p.157-61, 1999.
15. DE VOS P.; HAMEL A. F.; TATARKIEWICZ K., Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets. **Diabetologia**. v.45, p.159-73, 2002.
16. DHANABAL, M.; VOLK, R.; RAMCHANDRAN, R.; SIMONS, M.; SUKHATME, V. P., Cloning, expression, and in vitro activity of human endostatin. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.258, P.345-52, 1999.- [A]
17. DHANABAL, M.; RAMCHANDRAN, R.; VOLK, R.; STILLMAN, I. E.; LOMBARDO, M.; IRUELA-ARISPE, M. L.; SIMONS, M.; SUKHATME, V. P., Endostatin: yeast production, mutants, and antitumor effect in renal cell carcinoma. **Cancer Res.**, v. 59, p.189-97, 1999.- [B]
18. ELLIOTT RB, ESCOBAR L, CALAFIORE R, BASTA G, GARKAVENKO O, VASCONCELLOS A, BAMBRA C. Transplantation of micro- and macroencapsulated piglet islets into mice and monkeys. *Transplant Proc.*, v.37, p.466-9, 2005.
19. FELDMAN A. L.; ALEXANDER H. R.; HEWITT, S. M.; LORANG, D.; THIRUVATHUKAL, C. E.; TURNER, E. M.; LIBUTTI, S. K., Effect of retroviral endostatin gene transfer on subcutaneous and intraperitoneal growth of murine tumors. **J Natl Cancer Inst.**, v. 93, p. 965-7, 2001.
20. FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. **Recent Prog Horm Res.**, v. 55, p.15-36, 2000.
21. FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T., The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocr Rev.**, v.18, p.4-25, 1997.
22. FOLKMAN J., Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N Engl J Med.**, v. 285, p.1182-6, 1971.
23. FOLKMAN J.; Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. **N Engl J Med.**, v. 333, p.1757-63, 1995.
24. FUKUMURA, D.; XAVIER, R.; SUGIURA, T.; CHEN, Y.; PARK, E. C.; LU, N.; SELIG, M.; NIELSEN, G.; TAKSIR, T.; JAIN, R. K.; SEED, B., Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. **Cell.**, v.94, p.715-25, 1998.
25. 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. **Transpl Proceedings**, v. 37, p. 477-480, 2006.

26. GELLER R. L.; LOUDOVARIS T.; NEUENFELDT S.; JOHNSON R. C.; BRAUKER J. H., Use of an immunoisolation device for cell transplantation and tumor immunotherapy. **Ann N Y Acad Sci.** Gene Therapy Unit, v.831, p.438-51, 1997.
27. GELLER, R. L.; NEUENFELDT, S.; LEVON, S. A.; MARYANOV, D. A.; THOMAS, T. J.; BRAUKER, J. H., Immunoisolation of tumor cells: generation of antitumor immunity through indirect presentation of antigen. **J Immunother.**, v.20, p.131-7, 1997.- [A]
28. GOOD D. J.; POLVERINI P. J.; RASTINEJAD F.; LE BEAU M. M.; LEMONS R. S., FRAZIER W. A.; BOUCK., A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 87, p. 6624- 28, 1990. – [B]
29. GRUNSTEIN, J.; ROBERTS, W. G.; MATHIEU-COSTELLO, O.; HANAHAN, D.; JOHNSON, R. S., Tumor-derived expression of vascular endothelial growth factor is a critical factor in tumor expansion and vascular function.1: **Cancer Res.**, v.59, p.1592-8, 1999.
30. GRUNSTEIN, J.; MASBAD, J. J.; HICKEY, R.; GIORDANO, F.; JOHNSON, R. S., Isoforms of vascular endothelial growth factor act in a coordinate fashion to recruit and expand tumor vasculature. **Mol Cell Biol.**, v.20, p.7282-91,2000.
31. HANAHAN. D.; WEINBERG R. A., The hallmarks of cancer. **Cell.** , v.100, p.57-70, 2000.
32. HERBST, R. S.; HESS, K. R.; TRAN, H. T.; TSENG, J. E.; MULLANI, N. A.; CHARNSANGAVEJ, C.; MADDEN, T.; DAVIS, D. W.; MCCONKEY, D. J.; O'REILLY, M. S.; ELLIS, L. M.; PLUDA, J.; HONG, W. K.; ABBRUZZESE, J. L., Phase I study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors. **J Clin Oncol.**, v.20, p.3792-803, 2002.
33. HOHENESTER, E.; SASAKI, T.; OLSEN, B. R., Timpl R.Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 Å resolution. **EMBO J.**, v.17, p.1656-64, 1998.
34. HORTELANO, G.; AL-HENDY, A.; OFOSU, F. A.; CHANG, P. L., Delivery of human factor IX in mice by encapsulated recombinant myoblasts: a novel approach towards allogeneic gene therapy of hemophilia B. **Blood.**,v.87, p.5095-103, 1996.
35. JIANG Z. G.,Angiogenesis activity of tissues and cells of different malignancies, **Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.**, v.11, p.165-7, 1989.
36. JOKI, T.; MACHLUF, M.; ATALA, A.; ZHU, J.; SEYFRIED, N. T.; DUNN, I. F.; ABE, T.; CARROLL, R. S.; BLACK, P. M., Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy. **Nat Biotechnol.**, v.19, p.35-9, 2001.
37. JOSEPHS, S. F., In vivo delivery of recombinant human growth hormone from genetically engineered human fibroblasts implanted within Baxter immunoisolation devices. **J. mol.med.**, v.77, p. 211-4, 1999.
38. JUNQUEIRA G.; BRAGA, L. M. G. M.; MOTTA, M. S., PILLA, H. S., Modelo experimental de melanoma murino em camundongos. **An bras Dermatol.**, v.72, p.487-489,1997.
39. KISKER, O.; BECKER, C. M.; PROX, D.; FANNON, M.; D'AMATO, R.; FLYNN, E.; FOGLER, W. E.; SIM, B. K.; ALLRED, 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 Res.** v.61, p.7669-74, 2001.

40. LAGE, A. P.; SILVA, P. A., Assessment of angiogenesis and tumor growth in conscious mice by fluorimetric method. **Microvascular Research**, v.59, p:278-285, 2000.
41. LYSAGHT, M. J.; FRYDEL, B.; GENTILE, F.; EMERICH, D.; WINN, S., Recent progress in immunoisolated cell therapy. **J Cell Biochem**, v.56, p.196-203. 1994.
42. MAC DONALD, 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. **J. of Biol. Chemistry**, v. 276, n. 27, p. 25190-25196, 2001.
43. MELO, F. H. M.; JUNQUEIRA, M. S.; CHAMMAS, R., Mecanismos de Invasão e metástases. In: BRENTANI, M.M; KOWALSKI, L.P.; COELHO, F.R.G., **Bases da Oncologia**, 2 ed., Editora Marina e Tedmedd Editora, São Paulo, v. 2, p. 201-226, 2003.
44. MORRIS, P. J., Immunoprotection of therapeutic cell transplants by encapsulation. **Trends Biotechnol.**, v.14, p.163-7, 1996.
45. NOVAK, E. M.; METZGER, M.; CHAMMAS, R.; DA COSTA, M.; DANTAS, K.; MANABE, C.; PIRES, J.; DE OLIVEIRA, A. C.; BYDLOWSKI, S. P., Downregulation of TNF-alpha and VEGF expression by Sp1 decoy oligodeoxynucleotides in mouse melanoma tumor. **Gene Ther.** V.10, p.1992-7, 2003.
46. 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.315-28, 1994.
47. 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.277-85, 1997.
48. PADERA, R. F.; COLTON, C. K., Time course of membrane microarchitecture-driven neovascularization. **Biomaterials**. v.17, p.277-84, 1996.
49. PEIRONE, M.; ROSS, C. J.; HORTELANO, G.; BRASH, J. L.; CHANG, P. L., Encapsulation of various recombinant mammalian cell types in different alginate microcapsules. **J Biomed Mater Res.**, v.42, p.587-96. 1998.
50. PFAFFL, M. W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v.29, p 2003-7, 2001.
51. READ, T.; FARHADI, M.; BJERKVIG, R.; OLSEN, B. R.; ROKSTAD, A. M.; HUSZTHY, P. C.; VAJKOCZY, P., Intravital microscopy reveals novel antivascular and antitumor effects of endostatin delivered locally by alginate-encapsulated cells. **Cancer Res.** v.61, p.6830-7, 2001.- [A]
52. READ, T.; SORENSEN, D. R.; MAHESPARAN, R.; ENGER, P. O.; TIMPL, R.; OLSEN, B. R.; HJELSTUEN, M. H.; HARALDSETH, O.; BJERKVIG, R., Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells. **Nat Biotechnol.** v.19, p.20-1, 2001. - [B]
53. RÉGULIER, E.; SCHNEIDER, B. L.; DÉGLON, N.; BEUZARD, Y.; AEBISCHER, P., Continuous delivery of human and mouse erythropoietin in mice by genetically engineered polymer encapsulated myoblasts. **Gene Ther.** V.5, p.1014-22, 1998.

54. 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. **Blood**. V.110., p. 2899-906, 2007.
55. SHIMA, D. T.; KUROKI, M.; DEUTSCH, U.; NG, Y. S.; ADAMIS, A. P.; D'AMORE, P. A., The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences. **J Biol Chem**, v.271, p.3877-83, 1996.
56. SHIMIZU K.; OKU N., Cancer anti-angiogenic therapy, **Biol Pharm Bull**, v.27, p.599-605, 2004.
57. SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; FERREIRA, E.; MORAES, J. R. C.; OCARINO, N. M.; CASSALI, G. D., Efeito do hipotireoidismo no tumor de Ehrlich sólido em camundongos fêmeas castradas e não castradas. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.48, p.1-14, 2004.
58. SILVA, A. E.; SANTOS, F. G. A.; CASSALI, G. D., Cell proliferation markers for evaluating the growth of solid and ascitic forms of Ehrlich tumors. **Arq Brás Endocrinol Metab**, v.58, p.1-16, 2006.
59. STALMANS, I.; NG, Y. S.; ROHAN, R.; FRUTTIGER, M.; BOUCHÉ, A.; YUCE, A.; FUJISAWA, H.; HERMANS, B.; SHANI, M.; JANSEN, S.; HICKLIN, D.; ANDERSON, D. J.; GARDINER, T.; HAMMES, H. P.; MOONS, L.; DEWERCHIN, M.; COLLEN, D.; CARMELIET, P.; D'AMORE, P. A., Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. **J Clin Invest**. v.109, p.327-36, 2002.
60. TAKAHASHI, H.; SHIBUYA, M., The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. **Clin Sci (Lond)**, v.109, p.227-41, 2005.
61. 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 Biochim Biophys**, v.4, p.278-84, 2007.
62. THERACYTE, INC.; Disponível em: www.theracyte.com. Acessado em: 20 de junho de 2008.
63. THOMSEN, M.; YACOUN-YOUSSEF, H.; MARCHEIX B., Reconstitution of a human immune system in immunodeficient mice: models of human alloreaction. *in vivo*, **Tissue Antigens**, v.66, p. 73-82, 2005.
64. 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 Ther**. v.13, p.619-27, 2006.
65. TORNIERI, P. H., **Expressão de endostatina em fibroblastos murinos para o tratamento de tumores sólidos**, 2003. Dissertação (mestrado) Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.
66. WANG, X.; LIU, F.; LI, X.; LI, J.; XU, G., Anti-tumor effect of human endostatin mediated by retroviral gene transfer in nude mice. **Chin Med J (Engl)**, v.115, p.1664-9, 2002.

67. YAMANAKA, R.; ZULLO, S. A.; RAMSEY, J.; ONODERA, M.; TANAKA, R.; BLAESE, M.; XANTHOPOULOS, K. G., Induction of therapeutic antitumor antiangiogenesis by intratumoral injection of genetically engineered endostatin-producing Semliki Forest virus. **Cancer Gene Ther.**, v.10, p.796-802, 2001.
68. YANAY, O.; BARRY, S. C.; FLINT, L. Y.; BRZEZINSKI, M.; BARTON, R. W.; OSBORNE, W. R., Long-term erythropoietin gene expression from transduced cells in bioisolator devices. **Hum Gene Ther.** v.14, p.1587-93, 2003.
69. YANG, H.; AKOR, C.; DITHMAR, S.; GROSSNIKLAUS, H. E., Low dose adjuvant angiostatin decreases hepatic micrometastasis in murine ocular melanoma model., **Mol Vis.**,v.10, p.987-95, 2004.
70. YANG, H.; XU, Z.; IUVONE, P. M.; GROSSNIKLAUS, H. E., Angiostatin decreases cell migration and vascular endothelium growth factor (VEGF) to pigment epithelium derived factor (PEDF) RNA ratio in vitro and in a murine ocular melanoma model. **Mol Vis.**, v.12, p.511-7, 2006.
71. YU, J. L.; RAK, J. W.; KLEMENT, G.; KERBEL, R. S., Vascular endothelial growth factor isoform expression as a determinant of blood vessel patterning in human melanoma xenografts. **Cancer Res.**, v.62, p.1838-46, 2002.
72. ZHANG, L.; CONEJO-GARCIA, J. R.; YANG, N.; HUANG, W.; MOHAMED-HADLEY, A.; YAO, W.; BENENCIA, F.; COUKOS, G., Different effects of glucose starvation on expression and stability of VEGF RNAm isoforms in murine ovarian cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.292, p. 860-8, 2002.
73. ZHANG, Y.; WANG, W.; ZHOU, J.; YU, W.; ZHANG, X.; GUO, X.; MA, X., Tumor anti-angiogenic gene therapy with microencapsulated recombinant CHO cells. **Ann Biomed Eng.**,v.35,p.605-14,2007.
74. ZHANG, Y.; WANG, W.; XIE, Y.; YU, W.; LV, G.; GUO, X.; XIONG, Y.; MA, X., Optimization of microencapsulated recombinant CHO cell growth, endostatin production, and stability of microcapsule in vivo. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, v.84, p.79-88. 2008.