

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Bioquímica Médica



**Propriedades pró-coagulantes da linhagem U87-MG e inibição
pelo Ixolaris: efeito no crescimento tumoral “in vivo”**

Tatiana Corrêa Carneiro Lobo

Rio de Janeiro
Setembro de 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Propriedades pró-coagulantes da linhagem U87-MG e inibição pelo Ixolaris: efeito no crescimento tumoral “in vivo”

Tatiana Corrêa Carneiro Lobo

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, visando ao grau de Mestre em Ciências (Química Biológica)

Orientador: Robson Q. Monteiro

Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica/CCS/UFRJ

Rio de Janeiro
Setembro de 2007

Ficha catalográfica

Lobo, Tatiana

Propriedades pró-coagulantes da linhagem U87-MG e inibição pelo Ixolaris: efeito no crescimento tumoral “in vivo”/ Tatiana Corrêa Carneiro Lobo. Rio de Janeiro, 2007.

xvii, 118f.

Dissertação (Mestrado em Química Biológica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica – CCS, 2007.

Orientador: Robson Queiroz Monteiro

1. Palavras chaves: câncer, células tumorais, complexos enzimáticos da coagulação, fator tecidual, fosfatidilserina, trombina

I. Monteiro, Robson Q. (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Bioquímica Médica. III. Título.

Folha de Aprovação

Tatiana Corrêa Carneiro Lobo

Propriedades pró-coagulantes da linhagem U87-MG e inibição pelo Ixolaris: efeito no crescimento tumoral “in vivo”

Rio de Janeiro, 20 de setembro de 2007.

Mari Sogayar, Profa Titular do IQ, Depto de Bioquímica, USP

Vivaldo Moura Neto, Prof Titular, Depto Anatomia, ICB, UFRJ

Aurélio Vicente Graça de Souza, Prof Adjunto do IBqM, UFRJ

Suplente externo

Paulo A. Melo, Prof Adjunto do Depto de Farmacologia Básica e Clínica, ICB, UFRJ

Revisor e Suplente interno

Mauro S. G. Pavão, Prof Adjunto do IBqM, UFRJ.

Orientador

Robson Q. Monteiro, Prof Adjunto do IBqM, UFRJ.

Gostaria de agradecer imensamente:

Ao meu pai (Carlos Alberto) por ser o principal responsável pela minha formação;

Ao meu orientador, Robson de Queiroz Monteiro, por ter me dado a oportunidade de ser sua aluna, tendo sempre que agradecer a orientação concedida e a amizade;

À Sandra König, por toda a ajuda e atenção durante a realização desta dissertação;

À Mari Sogayar, bem como aos seus alunos e técnicos, pela ajuda na realização do experimento de tumorigênese *in vivo*;

À Lina Zingali, por ceder o espaço do seu laboratório para a realização desta dissertação;

Ao Mauro Pavão, pela revisão extremamente cuidadosa desta dissertação.

À todos os alunos que estão e que passaram pelo laboratório pela excelente convivência e amizade. Em especial à Ana Cláudia, Andrea, Andréia, Daniela, Diego, Eduardo, Fabiana, Flávia Frattani, Luciana Serrão, Marjolly, Mariane, Mayara, Morgana, Nathalia, Patrícia, Renata, Saulo e Silas.

À Luíze Lima pela ajuda nos experimentos de citometria e por toda a amizade;

À Angélica Dutra pela amizade durante todo este tempo!

Aos meus queridos amigos que não foram aqui citados, mas que contribuem de uma forma muito especial na minha vida;

Ao Olavo, amor da minha vida, que está sempre contribuindo da melhor forma possível, estando ao meu lado e me dando todo o amor e carinho;

À minha irmã (Carolina) que mesmo longe tenta me ajudar como pode;

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigada;

E em especial a Deus que permitiu que tudo fosse realizado!

A coisa mais bela que o homem pode experimentar
é o mistério. É essa emoção que está na
raiz de toda ciência e de toda arte.

(Albert Einstein)

Resumo

Os níveis de expressão do Fator Tecidual (TF), proteína responsável por iniciar as reações da coagulação sanguínea, estão fortemente correlacionados com o grau histológico de malignidade dos gliomas. De fato, a presença de trombos vaso-oclusivos é maior em tumores de grau IV (glioblastoma) sugerindo que as propriedades pró-coagulantes do tumor contribuem para o seu comportamento agressivo e para o estabelecimento de hipóxia e necrose tumorais. Desta forma, a literatura sugere que anticoagulantes poderiam auxiliar o tratamento do glioblastoma. Nossos objetivos nesse trabalho foram: 1, determinar os mecanismos pró-coagulantes da linhagem celular altamente agressiva de glioblastoma humano, U87-MG; 2, investigar o efeito do Ixolaris, um potente inibidor exógeno da coagulação sanguínea, sobre as propriedades pró-coagulantes da linhagem U87-MG e sobre o seu crescimento *in vivo*. Ensaio de imunocitoquímica e de ativação do Fator X na presença de células U87-MG e de Fator VIIa, indicaram a expressão constitutiva de TF pela linhagem de glioblastoma. A análise por citometria de fluxo, utilizando marcações com anticorpos anti-fosfatidilserina ou anexina V, demonstraram que as células U87-MG expõem fosfatidilserina em sua membrana externa. Dessa forma, as células U87-MG permitiram a montagem dos complexos tenase intrínseco (Fator IXa/Fator VIIIa) e protrombinase (Fator Xa/Fator Va), possibilitando a ativação dos fator X e protrombina. O anticoagulante Ixolaris inibiu a geração de Fator Xa e trombina promovida pelos complexos da coagulação montados nas células tumorais. Conseqüentemente, a diminuição do tempo de coagulação de plasma humano, produzida pelas células U87-MG, foi revertida pelo Ixolaris. Além disso, o Ixolaris (tratamento diário com 250 µg/kg, i.p.) inibiu o crescimento *in vivo* das células U87-MG, após implantação subcutânea em camundongos nude. Assim, concluímos que o Ixolaris pode ser um promissor agente terapêutico para o tratamento do glioblastoma humano.

Abstract

The expression levels of Tissue Factor (TF) correlates with the histological malignancy grade of glioma patients. In fact, increased procoagulant tonus in high grade tumors (glioblastomas) strongly suggests the role of TF in progression of this disease, and also that anticoagulants could be used as adjuvants for its treatment. Our objectives in this study were: a) to determine the molecular mechanism responsible for the highly procoagulant pattern of the aggressive U87-MG human glioblastoma cell line; b) to investigate the inhibitory effects of Ixolaris, a FVIIa/TF complex inhibitor, on the procoagulant properties of U87MG cells. Activation of FX to FXa in the presence of U87-MG cells and FVIIa indicated constitutive expression of TF. Further flow-cytometric analysis employing annexin V and propidium iodide, also demonstrated the exposure of phosphatidylserine (PS) at the outer surface of viable U87MG cells. Therefore, U87-MG cells supported the assembly of intrinsic tenase (FIXa/FVIIIa/FX) and prothrombinase (FVa/FXa/prothrombin) complexes, accounting for the production of ,respectively, FXa and thrombin. Accordingly, blocking of PS binding sites by annexin V inhibited the tumor-dependent zymogen activation. Remarkably, the anti-coagulant Ixolaris inhibited the tumor-dependent generation of FXa and thrombin by all multimolecular coagulation complexes tested. U87-MG cells strongly shortened the coagulation time of human plasma, this effect being efficiently reverted by Ixolaris. In addition, Ixolaris (250 ug/kg) inhibited the in vivo tumorigenic potencial of the human U87-MG cells in nude mice. Ixolaris may be a promising agent for anti-tumor therapy of human glioblastomas.

Lista de Figuras

Figura 1:	Representação de células gliais e gliomas	2
Figura 2:	Características do Glioblastoma Multiforme	3
Figura 3:	Modelo proposto por Hoffman e Monroe (2002) para as fases da coagulação	7
Figura 4:	Representação esquemática dos complexos tenase e protrombinase na superfície de uma plaqueta ativada	8
Figura 5:	Proposta de vaso oclusão e mecanimos pró-trombóticos de formação das pseudopaliçadas em glioblastomas	14
Figura 6:	Mecanismo de ação do Ixolaris	17
Figura 7:	Análise da expressão de TF nas células U87-MG	29
Figura 8:	As células de glioblastoma U87-MG promovem a formação de FXa através do complexo tenase extrínseco	29
Figura 9:	Análise da exposição de fosfatidilserina na membrana de células da linhagem U87-MG	32
Figura 10:	As células de glioblastoma U87-MG promovem a formação de FXa através do complexo tenase intrínseco	33
Figura 11:	As células de glioblastoma U87-MG promovem a formação de trombina através do complexo protrombinase	34
Figura 12:	Inibição dos complexos pró-coagulantes por anexina V	35
Figura 13:	Tempo de recalcificação de plasma humano	37
Figura 14:	Inibição do complexo tenase extrínseco por Ixolaris	39
Figura 15:	Inibição do complexo tenase intrínseco por Ixolaris	40
Figura 16:	Inibição do complexo protrombinase por Ixolaris	41
Figura 17:	Ixolaris inibe a coagulação plasmática induzida pelas células tumorais U87-MG	42
Figura 18:	Ixolaris inibe o crescimento do tumor <i>in vivo</i>	44
Figura 19:	Determinação da viabilidade celular	45

Lista de abreviaturas

µg:	Micrograma
kg:	Kilograma
AA:	Astrocitoma anaplásico
Abs:	Absorbância
DMEM-F12:	<i>Dubelcco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO:	Dimetilsufóxido
EDTA:	Ácido Etileno-dioxi-dietileno-dinitrilo-tetraacético
EGF:	Fator de crescimento epidermal (do inglês “ <i>epidermal growth factor</i> ”)
GBM:	Glioblastoma
mL:	Mililitros
PAR:	Receptor ativado por protease (do inglês “ <i>protease activated receptor</i> ”)
PBS:	<i>Phosphate buffer saline</i>
SB:	Tampão de parada (do inglês “ <i>stop buffer</i> ”)
SFB:	Soro fetal bovino
PI3-K:	Fosfoinositidio 3-quinase
PS:	Fosfatidilserina
PTEN:	<i>Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten</i>
TBS:	<i>Tris buffer saline</i>
TF:	Fator tecidual (do inglês “ <i>tissue factor</i> ”)
TFPI:	Inibidor da via do fator tecidual (do inglês “ <i>tissue factor pathway inhibitor</i> ”) Fator II ativado ou trombina
FIIa:	Fator IX ativado
FIXa:	Fator V ativado
FVa:	Fator VII
FVII:	Fator VII ativado
FVIIa:	Fator VIII
FVIII:	Fator VIII ativado
FVIIIa:	Fator X
FX:	Fator X ativado
FXa:	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês “ <i>vascular endothelial growth factor</i> ”)
VEGF:	

Fator de Von Willebrand (do inglês “*Von Willebrand factor*”)

VWF:

Índice

Ficha Catalográfica.....	III
Folha de Aprovação.....	IV
Agradecimentos.....	V
Resumo.....	VI
Abstract.....	VII
Lista de Figuras.....	VIII
Abreviaturas.....	X
1 - Introdução.....	1
1.1 - Gliomas.....	2
1.2 - Coagulação sanguínea: aspectos básicos.....	5
1.3 - Alterações da coagulação sanguínea no câncer.....	9
1.4 - Papel da coagulação sanguínea no crescimento tumoral e angiogênico.....	10
1.5 - Glioblastoma e coagulação sanguínea.....	13
1.6 - Terapias anticoagulantes no câncer.....	15
1.7 - Inibidores exógenos da coagulação sanguínea.....	16
2 - Objetivos.....	18
2.1 - Objetivos Gerais.....	19
2.2 - Objetivos Específicos.....	19
3 - Materiais e Métodos.....	20
3.1 - Linhagem Celular.....	21
3.2 - Cultura de células.....	21
3.3 - Imunocitoquímica anti-TF.....	21
3.4 - Ensaio de atividade do Fator Tecidual – tempo de coagulação do plasma.....	22
3.5 - Ensaio de formação do complexo Tenase Extrínseco.....	22
3.6 - Ensaio de formação do complexo Tenase Intrínseco.....	22
3.7 - Ensaio de formação do complexo Protrombinase.....	23
3.8 - Inibição dos complexos da coagulação por Anexina V.....	23
3.9 - Citometria de Fluxo.....	23
3.10 - Identificação de Fosfatidilserina.....	24
3.11 - Expressão e purificação do Ixolaris.....	24
3.12 - Inibição dos complexos da coagulação por Ixolaris.....	25

3.13 - Determinação da viabilidade celular através do MTT.....	25
3.14 - Ensaio de tumorigênese “in vivo”	25
3.15 – Ensaio de inibição de atividade do Fator Tecidual.....	26
4 - Resultados.....	27
4.1 - Ação pró-coagulante da linhagem de glioblastoma humano U87-MG.....	28
4.1.1 - Expressão e Atividade funcional do Fator Tecidual.....	29
4.1.2 - Exposição de fosfatidilserina e seu papel na atividade pró-coagulante.....	30
4.1.3 – Ativação da coagulação sanguínea pelas células U87-MG.....	36
4.2 - Efeito do Ixolaris sobre a linhagem tumoral U87-MG.....	38
4.2.1 - Inibição da atividade pró-coagulante de U87-MG pelo Ixolaris.....	39
4.2.2 - Ensaio de tumorigênese “in vivo”	43
4.2.3 - Ixolaris não altera a viabilidade de U87-MG “in vitro”.....	45
5 - Discussão.....	56
6 - Conclusão.....	51
7 - Bibliografia.....	53

1. Introdução

1.1 Gliomas

O tecido cerebral é composto por dois tipos celulares predominantes, os neurônios e a glia (Pfreeges e Barres, 1995). As células da glia desempenham funções de suporte estrutural (Bloom, 1994), regeneração (Gimenez y Ribotta et al., 2001), desenvolvimento neural no sistema nervoso central (SNC) (Noctor, 2001), além de apresentarem capacidade de comunicação através das redes gliais (Kast, 2001). Distinguem-se, entre elas, os astrócitos (50%), oligodendrócitos (40%), ependimócitos (5%) e micróglia (5%) (Bloom, 1994).

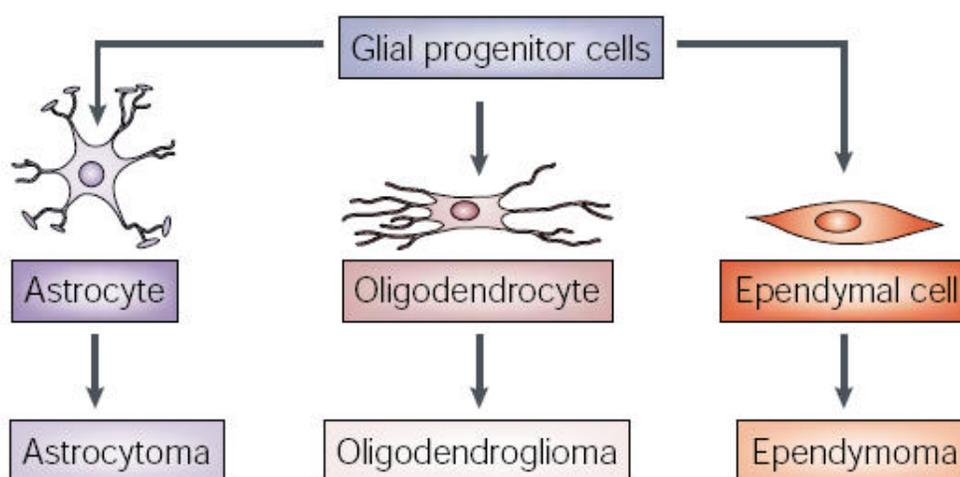


Figura 1 – Representação de células gliais e gliomas (Rao JS, 2003)

Os tumores do SNC representam, em grupo, a segunda neoplasia maligna mais prevalente na faixa etária pediátrica e a primeira entre os tumores sólidos. Os gliomas podem ser de origem astrocítica, oligodendroglial ou ependimal (Wattins, 1996; Rao, 2003) (figura 1) e representam cerca de 40% de todos os tumores primários e cerca de 78% dos tumores malignos do SNC. A classificação estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é a mais aceita atualmente (Maher, 2001; Miller, 2007) e nesta, os tumores são classificados em escala de I a IV, no sentido menos agressivo para o maior grau de agressividade.

Os astrocitomas de grau I (astrocitoma pilocítico) são os únicos astrocitomas benignos, podendo em alguns casos, sofrer transformação maligna. A cirurgia é o tratamento de escolha, sendo frequentemente curativa se for realizada logo após o diagnóstico. Os astrocitomas de grau II (astrocitoma difuso) possuem crescimento lento, mas, eventualmente,

pode ocorrer a progressão do tumor para padrões mais agressivos. Os astrocitomas de grau III (astrocitoma anaplásico) são agressivos e podem ocasionar a morte do paciente em poucos anos. Finalmente, o astrocitomas de grau IV (glioblastoma) são os mais frequentes e agressivos dos gliomas, com alta capacidade invasiva e que causam a morte entre 9-12 meses (Maher, 2001). Os estados de pré-malignidade são assintomáticos, não sendo detectados. Por isso sabe-se pouco a respeito dos eventos pré-oncogênicos (Ohgaki e Kleihues, 2005; Vogel, 2005; Ohgaki e Kleihues, 2007).

Diversas características histopatológicas diferenciam os glioblastomas (GBM) dos gliomas de menor grau (figura 2), destacando-se a presença de células com um arranjo peculiar, que envolvem os focos necróticos, denominadas de “pseudopaliçada”, e a hiperplasia microvascular (Brat e Mapstone, 2003).

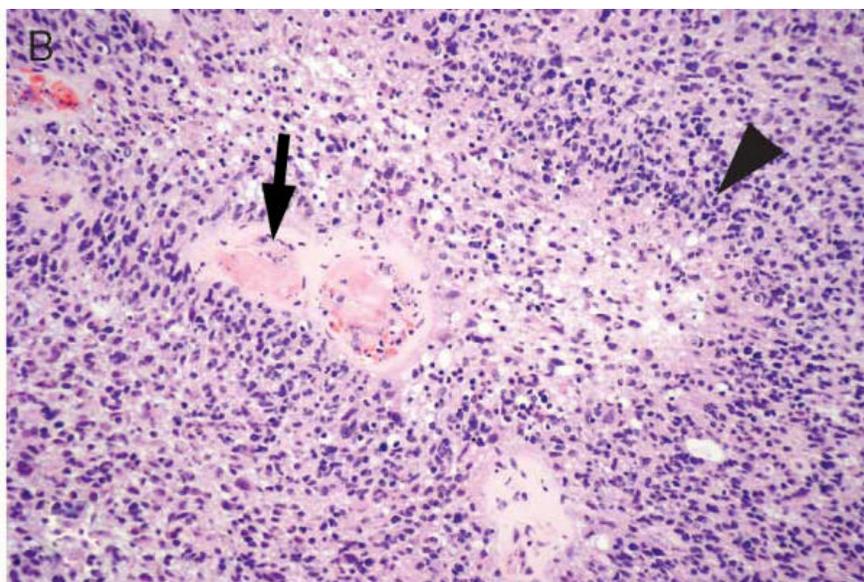


Figura 2 – Características histopatológicas do glioblastoma multiforme (grau VI de acordo com WHO). Destacando a presença de focos necróticos e células em pseudopaliçadas (Rong e col, 2006).

Esta classificação da OMS, realizada pela observação nestas preparações do tipo citológico predominante, praticamente não foi reavaliada durante as três últimas décadas e parece ser em grande parte a responsável pelas discordâncias concernentes à análise dos resultados terapêuticos (Doolittle, 2004). Esta classificação é atualmente criticada por patologistas que censuram o fato de ela não considerar duas das mais importantes

características destes tumores: a sua HETEROGENEIDADE e CAPACIDADE INFILTRANTE.

1.2 Coagulação sanguínea: aspectos básicos

A hemostasia é o conjunto de mecanismos que o organismo utiliza para manter o sangue circulante em estado fluido, evitando ou reduzindo seu extravasamento quando há lesão vascular e restabelecendo a luz do vaso quando houver a formação de um processo oclusivo. Quando os vasos sanguíneos estão íntegros e há um equilíbrio entre os fatores plaquetários, os da coagulação e os da fibrinólise, o sangue flui normalmente. Porém alterações do sistema responsável pela integridade dos vasos podem promover ativação da hemostasia e, conseqüentemente, a ativação de uma série de reações que levam à formação do coágulo (Lopez e col, 2004; Mitchell, 2005).

A hemostasia primária consiste nos fenômenos de adesão e agregação plaquetárias resultando na formação de um tampão plaquetário nos locais de injúria vascular. Este processo é de grande relevância para evitar a perda sanguínea a partir de capilares, pequenas arteríolas e vênulas. Além disso, as membranas das plaquetas ativadas fornecem um componente essencial para a hemostasia secundária, conforme discutido abaixo.

A hemostasia secundária se caracteriza pela ativação de uma seqüência de reações proteolíticas que resultam na produção de trombina e na deposição de fibrina. Os modelos mais recentes dividem a hemostasia secundária em três fases que se sobrepõem: iniciação, amplificação e propagação (figura 3).

A Fase de Iniciação ocorre em células que expressam o Fator Tecidual (TF), como os fibroblastos da camada adventícia do vaso sanguíneo. O TF é uma proteína transmembranar de 47 kDa que funciona como um cofator para a enzima da coagulação sanguínea Fator VIIa. Desta forma, a injúria vascular permite o contato do plasma com células que expressam o TF e a posterior montagem do complexo TF-Fator VIIa. Este complexo converte os zimogênios Fator IX e Fator X em suas formas ativas, Fator IXa e Fator Xa. O Fator Xa, por sua vez, converte o zimogênio protrombina em sua forma enzimaticamente ativa, trombina. O tempo de atuação deste complexo é relativamente curto, pois este é inativado pelo Inibidor da Via do Fator Tecidual (TFPI), um inibidor fisiológico da hemostasia.

Pequenas quantidades de trombina geradas na fase de Iniciação serão capazes de ativar plaquetas, através de receptores específicos expressos na superfície destas células, além de atuar proteoliticamente sobre outros fatores da coagulação sanguínea, incluindo os fatores VIII (FVIII), V (FV) e XI (FXI) (Hoffman e Monroe, 2001; Monroe; Hoffman; Roberts,

2002). Estes fenômenos consistem na Fase de Amplificação, que fornecerá, então, os elementos necessários para a Fase de Propagação.

O complexo TF-Fator VIIa, gerado na fase de Iniciação, e o Fator XIa, ativado pela trombina na fase de Amplificação, catalisam a conversão do Fator IX em sua forma enzimaticamente ativa, Fator IXa. O Fator IXa posteriormente se associa ao seu cofator protéico, Fator VIIIa, sobre a superfície de plaquetas ativadas, sendo esta associação dependente de íons cálcio (Figura 4). Este complexo, denominado “tenase intrínseco”, apresenta uma organização estrutural similar ao complexo “tenase extrínseco” (Kalafatis e col., 1994), porém apresenta uma eficiência catalítica cerca de 50 vezes maior para a ativação do FX (Ahmad e col, 1992).

De forma similar, o FXa se associa ao seu cofator protéico, FVa, sobre a superfície de plaquetas ativadas, na presença de íons cálcio (Figura 4). Este complexo, denominado “protrombinase”, possui eficiência catalítica cerca de 100.000 vezes maior que o Fator Xa sozinho para a ativação da protrombina. A trombina formada converte fibrinogênio em fibrina consolidando o tampão plaquetário e formando um coágulo estável.

Desta forma, a Fase de Propagação ocorre preferencialmente na superfície das plaquetas ativadas (Mann, 1999; Solum, 1999; Hoffman & Monroe, 2001). Em condições normais, a membrana das plaquetas apresenta uma distribuição assimétrica dos fosfolípidos aniônicos, sendo a maior parte destes, presentes na parte interna da membrana. A ativação plaquetária induz a liberação de estoques intracelulares de cálcio bem como a abertura de canais para este íon. O aumento na concentração de Ca^{+2} intracelular inibe uma aminofosfolípido translocase responsável pela manutenção da assimetria na distribuição dos fosfolípidos e, concomitantemente, ativa uma proteína que transporta fosfatidilserina para a parte externa da membrana das plaquetas (Solum, 1999; Zwaal, 1998). A exposição de fosfatidilserina na superfície externa das plaquetas é crucial para a formação dos complexos tenase intrínseco e protrombinase.

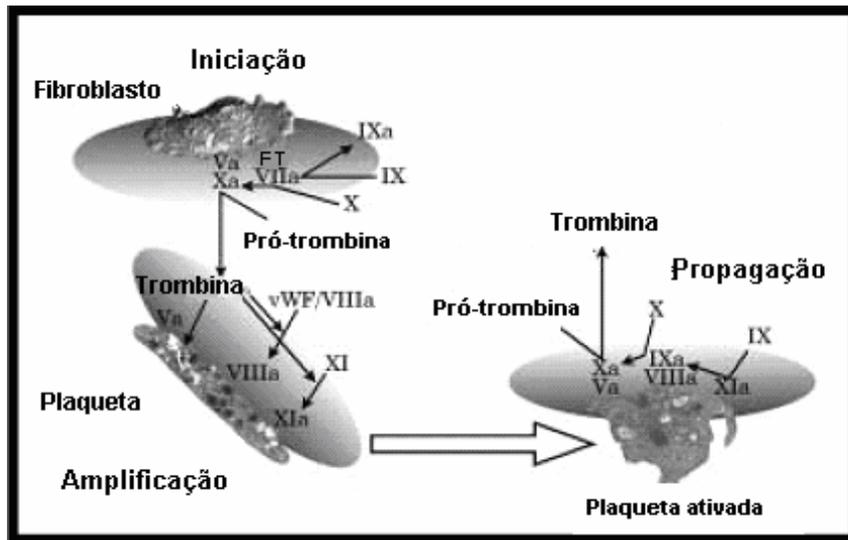


Figura 3 – Modelo proposto por Hoffman e Monroe (2002) para as fases da coagulação. As três fases da coagulação ocorrem em diferentes superfícies celulares. A iniciação ocorre na célula que expressa o fator tecidual (ex. fibroblasto). Se o estímulo pró-coagulante é forte o suficiente, forma-se uma quantidade de fatores Xa, IXa e trombina para iniciar o processo de coagulação. A amplificação da resposta ocorre quando o processo passa a ocorrer na superfície das plaquetas. O estímulo pró-coagulante vai se amplificando à medida que as plaquetas vão aderindo, são ativadas e acumulam cofatores ativados na sua superfície. Finalmente, na fase de propagação, as proteases ativas se combinam com seus cofatores na superfície plaquetária, local onde é possível gerar quantidades hemostáticas de trombina. A atividade dos complexos pró-coagulantes produz trombina suficiente para induzir a formação da fibrina. Retirado de HOFFMAN; MONROE, 2001.

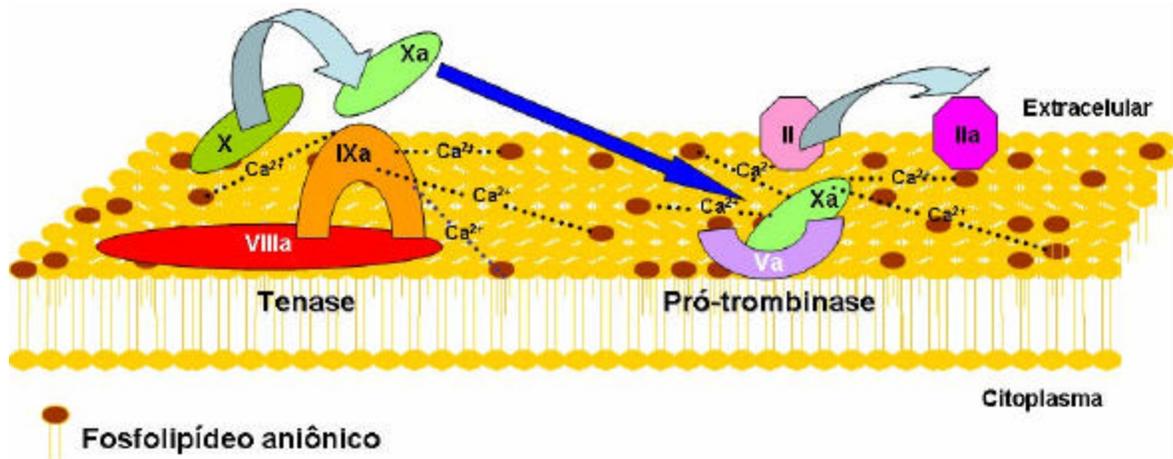


Figura 4 – Representação esquemática dos complexos tenase e protrombinase na superfície de uma plaqueta ativada. O fator X é ativado no ambiente protegido da superfície plaquetária pelo complexo tenase, formado pelos fatores VIIIa e IXa. O fator Xa pode mover-se diretamente para formar o complexo pró-trombinase com o fator Va, evitando a inibição por uma protease plasmática. O complexo pró-trombinase promove a conversão de pró-trombina (II) a trombina (IIa). Note também a representação esquemática da interação das proteínas com os fosfolípidos aniônicos expostos na superfície da plaqueta em resposta à ativação. Adaptado de HOFFMAN; MONROE, 2002 e KASPER et al, 2006.

1.3 Alterações da coagulação sanguínea no câncer

A associação do câncer com desordens tromboembólicas envolvendo a hiperativação do sistema de coagulação e a formação intravascular de coágulos de fibrina (trombose) é conhecida desde os tempos de Armand Trousseau, clínico francês que é considerado o primeiro cientista a descrever este fenômeno, em 1865. Desta forma, esta associação recebeu seu nome, síndrome de Trousseau (Hoffman e col, 2001; Rickles e Falanga, 2001; Prins e Otten, 2004 e Boccacio e Medico, 2006; Furie e Furie, 2006; Zwicker, 2007). As formas mais comuns de complicações trombóticas nos pacientes com câncer são a trombose venosa profunda (TVP), o embolismo pulmonar, a tromboflebite superficial migratória e a coagulação intravascular disseminada. É sabido que certos tipos de tumores sólidos, como os cânceres de pâncreas, cérebro e ovário, podem estar associados a um aumento de até 10 vezes na incidência de tromboembolismo venoso. De fato, as coagulopatias são consideradas como um marcador de malignidade avançada (Rak e col, 2006). Assim, anormalidades ocultas ou não, nos parâmetros da coagulação foram descritas em aproximadamente 50% de todos os pacientes com câncer e em 90% dos pacientes com metástase (Loreto e col, 2000; Maiolo e col, 2002; De Cicco, 2004). O tromboembolismo, sendo reconhecido como a principal complicação no câncer, é a segunda causa mais comum de óbito nestes pacientes (Hoffman e col, 2001 e Furie e Furie, 2006).

Mesmo em casos assintomáticos, a coagulopatia pode interferir em testes laboratoriais de hemostasia que incluem um aumento nos níveis plasmáticos de produtos de degradação do fibrinogênio e/ou fibrina, como os D-dímeros, além de um aumento nos níveis circulantes de Fator VIIa, complexo trombina-antitrombina, fragmentos 1+2 da protrombina e fibrinopeptídeos A e B, assim como alterações (aumento ou diminuição) no número de plaquetas (Loreto e col, 2000; De Cicco, 2004; Falanga, 2005; Rak e col, 2006).

A patogênese do VTE no câncer é complexa, mas se relaciona, principalmente, às propriedades pró-coagulantes das próprias células tumorais, das células endoteliais associadas às células tumorais e das células inflamatórias do hospedeiro. Além disso, uma concatenação (infeliz) de anormalidades dos mecanismos normais de defesa como: estase, defeitos vasculares, redução dos inibidores da coagulação e ativadores fibrinolíticos e anticoagulantes associados à célula, predispõe pacientes com câncer à hipercoagulabilidade (Rickles e col, 2003). Esse estado de hipercoagulabilidade perturba o balanço hemostático entre as forças

pró-coagulantes e anticoagulantes e envolve uma série de mecanismos tumorais complexos capazes de promover a coagulação (Piccioli e Prandoni, 2004).

As células malignas podem perturbar o sistema de coagulação, tanto diretamente, sintetizando e liberando moléculas pró-coagulantes, como indiretamente, através de interações celulares. As interações entre as células tumorais e as células do hospedeiro envolvem interações diretas célula-célula ou mecanismos indiretos de liberação de citocinas (Piccioli e Prandoni, 2004). A expressão aberrante de TF têm sido observada em diversos tipos tumorais, assim como uma forte correlação entre os seus níveis expressão e o grau de malignidade do tumor (Contrino e col, 1996; Seto e col, 2000; Guane col, 2002; Brat e Meir, 2004),

Como um receptor transmembrana, o TF também promove sinalização intracelular, através do seu domínio citoplasmático levando a tumorigênese. Esta sinalização envolve aumento de Ca^{2+} intracelular, ativação de IP3, AKT e MAP Kinase (Ott e col, 1998; Ott e col, 2005; Rong e col, 2006). Desta forma, a sinalização celular induzida por TF promove aumento dos fatores pró-angiogênicos, aumento da sobrevivência e aumento da capacidade de migração das células tumorais (Rickles e col, 2003; Versteeg e col, 2003; Belting e col, 2004; Versteeg e col, 2004).

1.4 Papel da coagulação sanguínea no crescimento tumoral e angiogênese

A literatura tem revelado um papel importante do TF nos processos fisiológicos e patológicos da angiogênese (processo o qual é essencial para o crescimento e para a metástase tumoral). A expressão aberrante de TF causa um aumento da expressão de proteínas pró-angiogênicas como VEGF, um dos mais potentes reguladores da angiogênese (Dvorak, 2002) e/ou uma diminuição da expressão de proteínas antiangiogênicas como a trombospondina (Zhang e col 1994). Tumores que expressam TF apresentam uma maior densidade microvascular e uma maior expressão de VEGF, quando comparado com tumores que não expressam TF (Nakasaki e col, 2002). O TF e o VEGF também têm sido co-localizados em células tumorais de câncer de pulmão e mama (Shoji e col, 1998). Além disso, a análise de diferentes linhagens de células tumorais demonstraram uma correlação direta entre os níveis de síntese do TF e do VEGF (Shoji e col, 1998; Abe e col, 1999). Baseado nesses

dados, diversos mecanismos têm sido propostos para explicar melhor a correlação existente entre TF e VEGF.

Acredita-se que o TF contribui para angiogênese através de dois mecanismos distintos, um dependente e outro independente da coagulação (Rickles e col, 2001; Fernandez e Rickles, 2004). A via dependente da ativação da coagulação ocorre com a ligação do TF ao Fator VIIa, levando à geração de trombina e, conseqüentemente, de fibrina (Shoji et al, 1998). A via independente da coagulação ocorre através da fosforilação do domínio citoplasmático do TF e subsequente sinalização celular, independente da formação de trombina (Abe et al, 1999). Ambas as vias podem contribuir direta ou indiretamente para angiogênese ou para progressão do tumor.

Além do TF, tem sido demonstrado que a trombina também apresenta um importante papel na biologia tumoral. Muitos efeitos da trombina no câncer podem ser mediados através da ativação da angiogênese *in vivo*. A trombina facilita a formação de novos vasos promovendo a degradação da matriz extracelular, diminuindo a adesão de células endoteliais, promovendo aumento da proliferação e migração das células endoteliais e aumento da permeabilidade vascular (Richard e col, 2001). Além disso, a trombina aumenta a expressão de VEGF (Richard e col, 2001), e os níveis do RNAm dos receptores 1 e 2 de VEGF em células HUVEC, este efeito foi dependente da concentração de trombina utilizada sendo evidenciado após 8-12h de tratamento com trombina (Tsopanoglou e Maragoudakis, 1999). É sugerido que este mecanismo de ativação da angiogênese pela trombina ocorre independente da atividade desta proteína no processo de coagulação (Tsopanoglou e col, 1993; Maragoudakis e col, 2002).

A trombina pode mediar efeitos celulares, em parte, através da ativação de uma família de receptores acoplados à proteína G, denominados de receptores ativados por proteases (PARs) (Macfarlane e col, 2001; Bergmann e col, 2006). Essa família de receptores é subdividida em PAR-1, 3 e 4, (Vu e col, 1991; Ishihara e col, 1997), podem ser ativados por trombina, enquanto que PAR-2 pode ser ativado por tripsina ou pelo Fator Xa. A ativação de PAR-1, o principal receptor para trombina, têm sido relacionada com o crescimento de células tumorais, invasão e metástase de vários tipos de câncer (Morris et al, 2006). Foi mostrado por Yamahata e col em 2002, que a trombina, através da ativação de PAR-1, é capaz de promover um aumento na expressão de VEGF, e na proliferação celular em gliomas. Muitos dos efeitos celulares mediados pela trombina no câncer são devido à uma complexa cascata de sinalização ativa da por receptores tipo PAR, sugerindo que a atividade proteolítica

da trombina é essencial para promoção destes eventos (Rickles e col, 2003). Além disso, a expressão de PAR-1 tem sido correlacionada com a maior agressividade dos tumores.

1.5 Glioblastoma e coagulação sanguínea

Alguns estudos têm demonstrado que a expressão de TF está diretamente correlacionada com o grau de malignidade dos gliomas (Hamada e col, 1996; Guan e col, 2002). O TF é expresso em 90% dos astrocitomas malignos e em somente 10% dos astrocitomas menos agressivos (grau I e II). Os níveis de RNAm do TF são 500 vezes maiores em glioblastoma do que em tecido de cérebro normal, e esses níveis correlacionam com o grau histológico (Guan e col, 2002; Brat e Meir, 2004).

Diversos estudos tentam explicar os mecanismos que poderiam estar envolvidos com o aumento da expressão de TF e trombose em pacientes com glioblastoma (figura 10) (Rong e col, 2005; Yu e col, 2005; Rak e col, 2006; Rong e col, 2006). Eventos genéticos que ocorrem durante a progressão do astrocitoma anaplásico para o glioblastoma têm sido bem caracterizados e incluem mutações em PTEN e P53 (que são genes supressores de tumor) e amplificação de VEGF e MDM2 (Hunter e col, 2003). Entre estes, a amplificação do VEGF e a mutação de PTEN são os principais candidatos relacionados com os eventos pró-trombóticos, porque essas alterações ocorrem na transição do AA para o GBM, quando se tem o aparecimento de trombose e das células pseudopaliçadas (Yu e col, 2004; Rak e col, 2006). Os GBM apresentam uma diminuição na expressão de PTEN de até 70% quando comparado com AA (Rasheed e col, 1997). O efeito do PTEN na expressão e nas propriedades pró-coagulantes do TF em GBM tem sido muito estudado recentemente. Os autores sugerem, também, que a presença de trombos no interior dos vasos de GBM são os principais responsáveis pela hipóxia desses tumores. A hipóxia tem sido recentemente relacionada com o aumento da taxa de trombose e da expressão de TF nas células pseudopaliçadas (Brat e col, 2004; Rong e col, 2006).

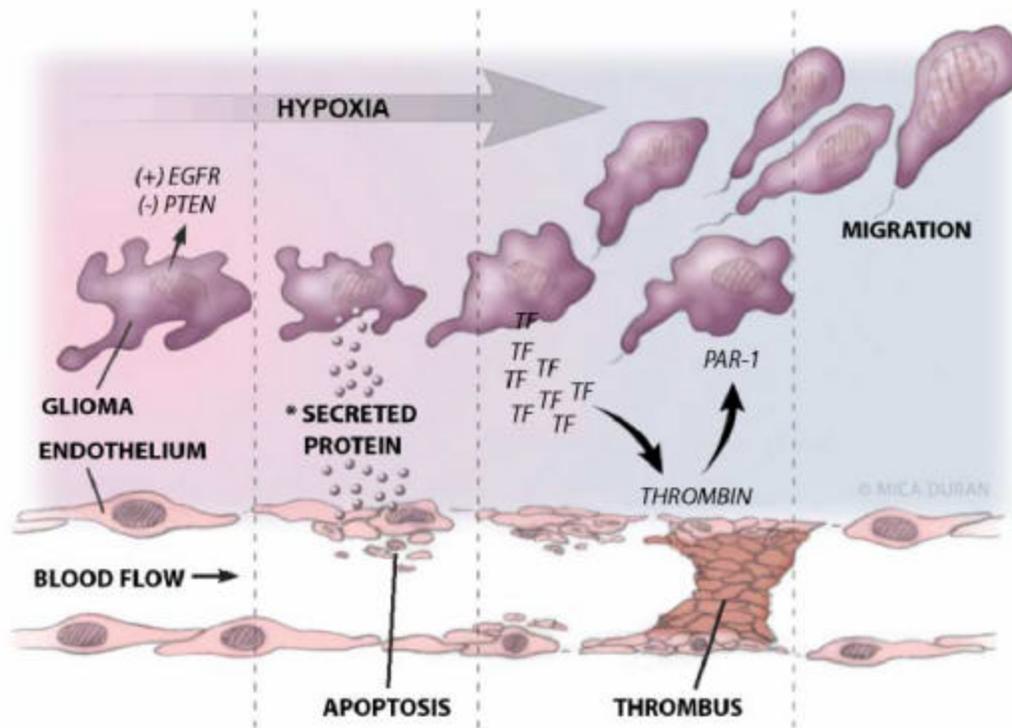


Figura 5 – Proposta de vaso oclusão e mecanismos pró-trombóticos de formação das pseudopaliçadas em glioblastomas. Alterações genéticas nas células tumorais incluindo amplificação de EGFR, diminuição de PTEN e hipóxia estão fortemente relacionados com alta expressão de TF por células tumorais (Rong e col, 2006).

1.6 Terapias anticoagulantes no câncer

Foi mostrado a importância da coagulação sanguínea na biologia tumoral. Baseado nisso, diversos trabalhos têm sugerido que terapias anticoagulantes poderiam auxiliar no tratamento de pacientes com câncer.

O TFPI (inibidor da via do Fator Tecidual) apresenta a capacidade de se ligar ao Fator Xa e ao complexo TF/Fator VIIa, formando um complexo quartenário e inibindo, assim, a atividade proteolítica desse complexo e, conseqüentemente, o início da cascata de coagulação. Estudos recentes têm demonstrado que inibidores do complexo TF/FVIIa apresentam uma potente atividade anti-tumoral, promovendo a diminuição do crescimento primário do tumor, quando células de melanoma são inoculadas em camundongos. Além disso, a inibição promove a redução da metástase quando células de melanoma são injetadas, via intra-venosa, em camundongos.

O NAPc2 (Nematode Anticoagulant Peptide C2), outro inibidor do complexo TF/Fator VIIa, também apresenta a capacidade de inibir o crescimento tumoral, o desenvolvimento de metástases e a angiogênese promovida por células de melanoma.

Inibidores do Fator Xa também têm sido apresentados para prevenir a metástase *in vivo*. Dessa forma, diversos inibidores do Fator Xa têm sido estudados, entre eles NAP5 (Ancylostoma Caninum anticoagulant protein), o MCM09 e o AcAP (Ancylostoma Caninum anticoagulant peptide). Esses anticoagulantes promovem a inibição da atividade pró-coagulante e diminuem também a capacidade metastática de células tumorais em ensaios realizados *in vitro*. Esses inibidores apresentam a capacidade de inibir a metástase provocada por células de melanoma quando injetadas por via intravenosa em camundongos (Donnelly et al, 1998; Hembrough et al, 2003; Rossi et al, 2006).

Inibidores específicos da trombina também têm sido testados, entre eles, o Argatroban um inibidor sintético da trombina (Longhi e col, 2001). O Argatroban apresenta a capacidade de se ligar ao sítio ativo da trombina (Hursting e col, 1997) promovendo a inibição da proliferação *in vitro* da linhagem celular C6 de glioma (Hua e col, 2005). Além disso, quando células C6 de glioma foram inoculadas no cérebro de ratos, e esses animais tratados com Argatroban, foi observou-se uma redução no crescimento da massa tumoral, melhora nos testes comportamentais e o aumento da sobrevivência, em relação aos animais controles, sem tratamento com Argatroban (Hua e col, 2005).

1.7 Inibidores exógenos da coagulação sanguínea

Uma das principais fontes de novas moléculas anti-hemostáticas com potencial aplicação no tratamento de eventos pró-trombóticos, são os organismos hematófagos (Law e col., 1992; Ribeiro & Francischetti, 2003). Uma série de inibidores que atuam em diferentes pontos do processo de coagulação tem sido caracterizados nas últimas décadas. Dentre estes podemos destacar a hirudina, um inibidor extremamente potente e específico da trombina, que foi isolado originalmente da sanguessuga *Hirudo medicinalis* (Stone & Maraganore, 1992), e o NAPc2, capaz de interagir com o complexo TF-Fator VIIa através de um mecanismo de ação similar ao TFPI (Lee & Vlasuk, 2003). Estas duas moléculas já têm sido empregadas em diversos testes clínicos em humanos.

Em 2002, Francischetti e colaboradores descreveram a expressão e a caracterização de um novo análogo do TFPI, denominado Ixolaris, obtido do carrapato *Ixodes scapularis* por técnicas de biologia molecular. A análise da seqüência primária revelou que esta proteína é formada por dois domínios Kunitz, domínios formados por resíduos de serina (Figura 7). Ensaaios funcionais revelaram que o seu mecanismo de ação é muito similar ao do TFPI: o Ixolaris se liga ao Fator Xa e, posteriormente, forma um complexo quaternário com o TF e Fator VIIa, resultando na inativação do complexo tenase extrínseco (Francischetti e col., 2002). Porém, diferentemente do TFPI, o Ixolaris não inibe o sítio catalítico do Fator Xa. De fato, estudos posteriores demonstraram que o Ixolaris interage com uma região do Fator Xa denominada exsítio de ligação à heparina (Monteiro e col., 2005). O exsítio de ligação à heparina do FXa é uma região formada por sete resíduos carregados positivamente (Rezaie, 2000a; Rezaie 2000b). Interessantemente, esta região é análoga ao exsítio de ligação à heparina da trombina, também conhecida como exsítio 2 (Sheehan & Sadler, 1994).

Interessantemente, a interação do Ixolaris com o Fator Xa, embora não afete o sítio catalítico da enzima, inibe significativamente o reconhecimento do seu substrato macromolecular, a protrombina (Monteiro e col., 2005; Monteiro, 2005). Desta forma, além de ser um potente inibidor do complexo tenase extrínseco, o Ixolaris também é capaz de inibir o complexo protrombinase.

Outra diferença marcante entre o Ixolaris e o TFPI é a capacidade do primeiro interagir com o fator X com alta afinidade (Francischetti e col., 2002). De fato, a formação do complexo binário Ixolaris-Fator X também é capaz de interagir com o complexo TF-Fator VIIa, inativando este último. Interessantemente, a formação do complexo FX-Ixolaris inibe a

conversão do zimogênio em Fator Xa pelo complexo tenase intrínseco (Monteiro e col., 2007), indicando que, na realidade, o Ixolaris apresenta um terceiro mecanismo de ação anticoagulante. Estes mecanismos estão sumarizados na Figura 6.

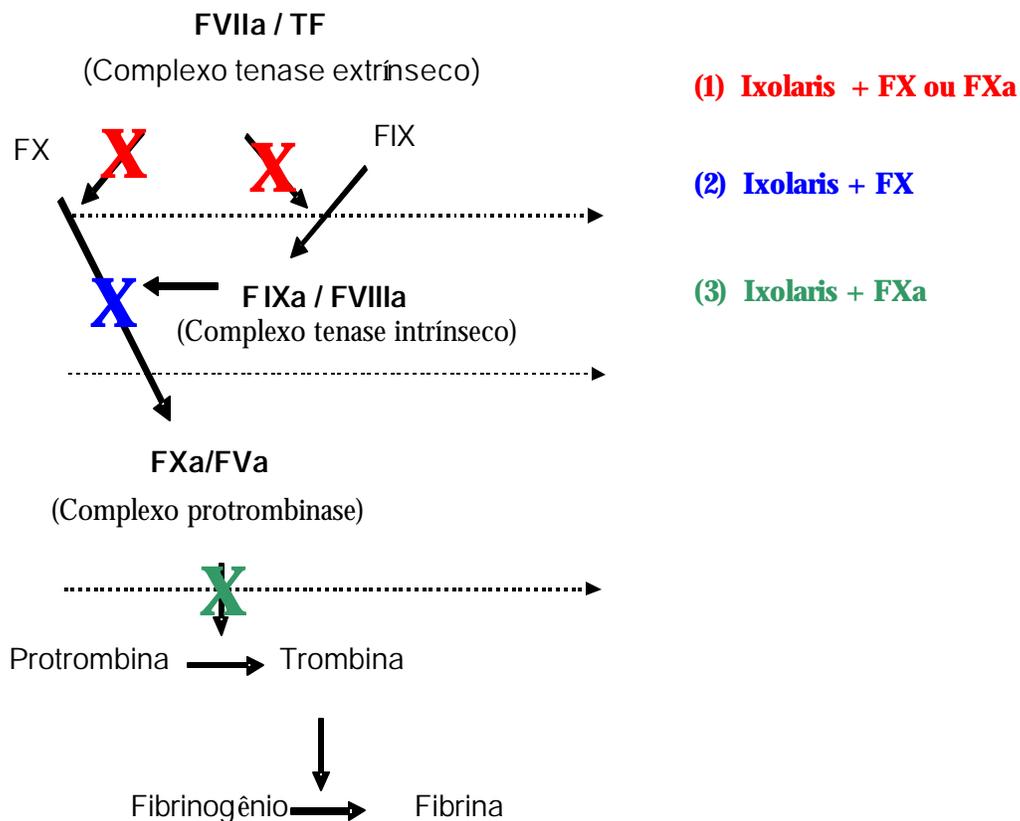


Figura 6– Mecanismo de ação do Ixolaris. A molécula ao se ligar ao FX ou FXa forma um complexo binário que inativa o complexo tenase extrínseco (1), reduzindo a ativação dos FX e FIX. A ligação do Ixolaris ao FX também reduz a ativação do zimogênio pelo complexo tenase intrínseco (2) e por fim, a interação do Ixolaris com o FXa reduz a atividade do complexo protrombinase, reduzindo a formação de trombina (3).

2. Objetivos

2.1 Este trabalho possui como objetivos gerais:

Caracterizar os mecanismos pró-coagulantes da linhagem celular de glioblastoma humano U87-MG e analisar o efeito do Ixolaris, um potente inibidor da coagulação sanguínea, sobre as propriedades pró-coagulantes e sobre o potencial tumorigênico da linhagem celular U87-MG;

2.2 Objetivos específicos

? Analisar a expressão do Fator Tecidual na membrana da linhagem celular U87-MG e a sua capacidade de promover a montagem do complexo tenase extrínseco;

? Detectar a presença de PS exposta na membrana das células U87-MG e avaliar o papel desse fosfolípido aniônico na montagem dos complexos tenase intrínseco e protrombinase;

? Analisar o efeito do Ixolaris sobre a atividade dos complexos pró-coagulantes montados nas células U87-MG;

? Analisar a capacidade do Ixolaris de inibir o crescimento “in vivo” da linhagem celular U87-MG quando inoculadas em camundongos Balbc/nude;

? Avaliar o efeito do Ixolaris sobre a viabilidade das células U87-MG.

3. Materiais e Métodos

3.1 Linhagem Celular

U87-MG – linhagem de astrocitoma humano grau IV, capaz de formar tumores quando injetadas sub-cutaneamente no dorso de camundongos imunodeprimidos do tipo nude.

3.2 Cultura de células

A linhagem U87-MG foi mantida com três passagens semanais. As células eram lavadas 2x com PBS (Tampão salina fosfato: 8% de NaCl, 5,36% de Na₂HPO₄, 0,4% de KH₂PO₄ e 0,9% de KCl), à temperatura de 37°C, para retirada do soro fetal bovino, depois tripsinizadas com 1000µL de tripsina (Sigma, EUA) na concentração de 0,25%, para soltar as células da garrafa, e ressuspensas em meio DMEM-F12 (Gibco, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, EUA), tampão HEPES (3g/L), glutamina (0,3 g/L), bicarbonato de sódio (0,2 g/L), pH 7,2 e incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C.

3.3 Imunocitoquímica anti-TF

Ao atingirem 80% de confluência, as células U87-MG foram lavadas uma vez com PBS (Tampão salina fosfato: 8% de NaCl, 5,36% de Na₂HPO₄, 0,4% de KH₂PO₄ e 0,9% de KCl) e fixadas por 3 minutos com paraformaldeído 4% (Isofar Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda). O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado por 1 hora com PBS-BSA 5% (BSA, albumina de soro bovino-Sigma Chemical Co). Em seguida, as células foram incubadas por mais de 12 horas (overnight) à 4°C com o anticorpo primário anti-TF (TF, Tecdial Factor) (American Diagnóstica Inc., Product no 4509) na diluição de 1:100 em PBS-BSA 5%. Após 3 lavagens com PBS, as células foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-mouse (Molecular Probes-Alexa Fluor 488;1:400 em PBS-BSA 5%) e os núcleos marcados com DAPI (4',6-Diamino-2-fenilindole, SigmaChemical Co). As lamínulas foram montadas em meio de montagem (DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium) e visualizadas em microscópio óptico TS200 de fluorescência da Nikon.

3.4 Ensaio de atividade do Fator Tecidual – tempo de coagulação do plasma

A habilidade das células tumorais de potencializar a coagulação do plasma foi verificada por meio da medição do tempo de recalcificação em um coagulômetro KC-4 micro (Amelung Ltd, Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) de acordo com o seguinte protocolo: 50 μ L de pool de plasma humano pobre em plaquetas (PPP) foi misturado com 50 μ L de diferentes concentrações de células (0 - 5×10^5 células) ressuspendidas em tampão TBS (20mM Tris; 0,15M NaCl; pH7,5). Após 2 minutos, foi adicionado 100 μ L de 25 mM CaCl_2 e o tempo necessário para ocorrer a coagulação foi medido.

3.5 Ensaio de formação do complexo Tenase Extrínseco

A formação do complexo tenase extrínseco foi verificado de acordo com o seguinte protocolo: As células a 5×10^5 células/mL foram incubadas a 37°C com 1nM Fator VIIa (Haematologic Technologies, EUA). A reação foi iniciada pela adição de 100nM Fator X (Haematologic Technologies, EUA). Alíquotas de 25 μ L foram removidas da mistura a cada 1 minutos e adicionadas a 25 μ L de tampão de parada (Tampão Tris/EDTA – 150 mM NaCl; 50 mM Tris; 20 mM EDTA – ajustado para pH 7,5). A quantidade de Fator Xa formada foi estimada adicionando-se o substrato cromogênico S-2765 (2mM) e a densidade ótica medida a 405 nm em um leitor de Elisa (Thermomax Microplate Reader, Molecular Devices, Menlo Park, EUA), a 37°C por 20 min com intervalo de 6 segundos. As concentrações de FXa foram obtidas a partir de uma curva de diluição de uma solução padrão de FXa. Foram realizados controles na ausência de células e de Fator VIIa.

3.6 Ensaio de formação do complexo Tenase Intrínseco

A geração do complexo Tenase Intrínseco foi verificada de acordo com o seguinte protocolo: As células a 5×10^5 células/mL foram incubadas a 37°C com 0.2nM Fator IXa (Haematologic Technologies, EUA) e 1.0 IU/mL Fator VIIIa (Haematologic Technologies, EUA) (concentrações finais) por 2 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 100nM Fator X (Haematologic Technologies, EUA) (concentração final). Alíquotas de 25 μ L foram removidas da mistura a cada 2 minutos e adicionados a 25 μ L de tampão de parada. A

quantidade de Fator Xa formada foi estimada adicionando-se o substrato cromogênico, S-2765 (2mM) (Chromogenix, Mölndal, Suécia), e a densidade ótica medida a 405nm em um leitor de Elisa. As concentrações de Fator Xa foram obtidas a partir de uma solução padrão de Fator Xa. Foram realizados controles na ausência de células.

3.7 Ensaio de formação do complexo Protrombinase

A ativação da protrombina foi verificada através do seguinte protocolo: As células a 5×10^5 células/mL foram incubadas a 37°C com 10 μ M Fator Xa (Haematologic Technologies, EUA) 1 nM Fator Va (Haematologic Technologies, EUA) (concentrações finais) por 2 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 0,5 μ M protrombina (Haematologic Technologies, EUA), (concentração final). Alíquotas de 25 μ L foram removidas da mistura a cada 1 minutos e adicionadas a 25 μ l de tampão de parada. A quantidade de trombina formada foi estimada adicionando-se o substrato cromogênico S-2238 (2mM) (Chromogenix, Mölndal, Suécia), e a densidade ótica medida a 405nm em um leitor de Elisa. As velocidades (mOD/min) obtidas nos primeiros minutos da reação foram usadas para calcular a quantidade de trombina formada. Foram realizados controles na ausência de células.

3.8 Inibição dos complexos da coagulação por Anexina V

O efeito de Anexina V na formação de trombina e Fator Xa foi verificado de acordo com o seguinte protocolo: as células (5×10^5 cels/mL) foram incubadas com diferentes concentrações de Anexina V de placenta humana (Sigma Chemical Co, Poole, UK), (0-25nM) por 5 min a 37°C em TBS. Após esse período, a ativação dos complexos tenase intrínseco (formação de Fator Xa) e protrombinase (formação de trombina) foram seguidos como descrito acima, sendo que as alíquotas foram removidas em tempo fixo de 8 minutos para a formação de Fator Xa e 6 minutos para a formação de trombina.

3.9 Citometria de Fluxo

As análises feitas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, EUA), foram analisadas com os seguintes parâmetros: desvio frontal (ou forward scatter), desvio lateral (ou side scatter) e sinais de fluorescência na cor verde (FL1), cujo comprimento de

onda é de 525 nm ou, na cor laranja (FL2), cujo comprimento de onda é de 575 nm. A excitação das amostras foi realizada por laser de argônio, ajustado para emitir 15 mW a 488 nm. Um total de 10.000 eventos foi adquirido e os dados obtidos foram analisados utilizando o programa WinMDI 2.8.

3.10 Identificação de Fosfatidilserina (PS)

3.10.1 – Marcação com anti-PS-Alexa 488 (Bavituximab)

As células (5×10^5 células/mL) foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-PS-Alexa 488 (Bavituximab) diluído 1:200 por 30 min à 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário conjugado com fluoresceína (FITC) diluído 1:100 por 30 min à 4°C, no escuro. As células foram resuspendidas em 500 µL de PBS e analisadas. A média da intensidade de fluorescência (MIF) de 10.000 eventos foi determinada para cada amostra.

3.10.2 – Marcação com anexina V – FITC

Para detecção da PS na superfície celular, as células U87-MG foram resuspendidas no tampão de ligação de anexina (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ and 10 mM HEPES), pH 7.3 e incubadas com 25 µg/mL anexina V-FITC (Molecular Probes) por 15 minutos a temperatura ambiente. As células U87-MG foram marcadas também com 10 µg/mL de iodeto de propídio para verificar a integridade da membrana. As células foram resuspendidas em 500 µL de PBS e analisadas. A média da intensidade de fluorescência (MIF) de 10.000 eventos foi determinada para cada amostra.

3.11 Expressão e purificação do Ixolaris

O Ixolaris recombinante foi expresso em células High Five, utilizando o sistema de expressão em Baculovirus (Invitrogen, San Diego, CA, EUA), conforme descrito por Francischetti e colaboradores (2002). O meio de cultura contendo a proteína recombinante foi aplicado em uma coluna de afinidade contendo Fator X acoplado à resina Sepharose 4B (Calbiochem, EUA). A coluna foi montada conforme instruções do fabricante e previamente equilibrada em Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5. Após a incorporação, a coluna foi extensivamente lavada com o mesmo tampão e, em seguida, incubada com uma solução de

HCl 0,01 N, 1,0 M NaCl, pH 2,0 por 15 min. O material eluído foi concentrado e dialisado overnight contra Tris-HCl 20mM, NaCl 100mM, pH 7,5 e quantificado a 280 nm. A pureza do material obtido foi avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.12 Inibição dos complexos da coagulação por Ixolaris

O efeito do Ixolaris na formação de Fator Xa e trombina foi verificado de acordo com o seguinte protocolo: Fator X foi incubado com diferentes concentrações de Ixolaris (0-100nM) por 10 min a 37°C. Após esse período a ativação dos complexos tenase intrínseco (formação de Fator Xa) e protrombinase (formação de trombina) foi seguido como descrito acima, sendo que as alíquotas foram removidas em tempo fixo de 7 minutos para a formação de Fator Xa e para a formação de trombina.

3.13 Determinação da viabilidade celular através do MT

A viabilidade celular foi determinada pelo método de Mosmann (1983). As células U87-MG ($2,0 \times 10^4$ células/ml) foram cultivadas em placas de 96 poços, em meio DMEM-F12, suplementado com 10% de soro fetal bovino, tampão HEPES (3g/l), glutamina (0,3 g/l), bicarbonato de sódio (0,2 g/l), pH 7,2 e diferentes concentrações de Ixolaris (0,5 µg/ml e 2,5 µg/ml). Ao final do tratamento (24, 48 e 72 horas), os poços foram lavados duas vezes com PBS e mantidas com 200 µl de uma solução de MTT (Brometo de 3,4,5-dimetilazol-2,5-difeniltetrazolium) 0,5 mg/ml em DMEM por 4 horas a 37°C. Ao final dessa incubação, 20µl de DMSO foi adicionado e a leitura realizada em um leitor de Elisa a 490 nm. Foram feitas triplicatas de cada concentração de Ixolaris.

3.14 Ensaio de tumorigênese *in vivo*

Os ensaios foram realizados utilizando-se camundongos Balbc/nude de 4 a 8 semanas mantidos com acesso a água e ração ad libitum, com ciclo de luz de 12h, no Biotério do Conjunto das Químicas da USP. As linhagens celulares foram previamente subcultivadas em meio DMEM completo, contendo 10% de soro fetal bovino. As culturas da linhagem U87-MG em crescimento exponencial foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura DMEM sem soro e mantidas em gelo até o momento da inoculação no

animal. Cada animal recebeu a inoculação de 0,1ml da suspensão de células (contendo 2×10^6 células) no dorso do animal, após assepsia do local com etanol 70%. Após 3 dias da inoculação das células os animais foram tratados diariamente, durante 30 dias, com diferentes concentrações de Ixolaris (50 e 250 μ g/Kg). Realizamos controles onde os animais não receberam as células U87-MG, mais foram tratados durante os 30 dias com Ixolaris. Os animais foram mantidos até o dia do sacrifício nas condições acima. Após 15 dias de tratamentos, os tumores formados em cada animal, foram medidos diariamente com um paquímetro. No dia do término do experimento de tumorigênese (33 dias após a inoculação das células), os animais foram sacrificados com éter e os tumores formados foram extraídos cirurgicamente do dorso dos animais, pesados e congelados em nitrogênio.

3.15 Ensaio de inibição de atividade do Fator Tecidual – tempo de coagulação do plasma

A capacidade do Ixolaris em inibir o tempo de coagulação de plasma humano, foi verificada por meio da medição do tempo de recalcificação em um coagulômetro KC-4 micro (Amelung Ltd, Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) de acordo com o seguinte protocolo: 50 μ L de pool de plasma humano pobre em plaquetas (PPP) foi incubado previamente por 10min com diferentes concentrações de Ixolaris (0-37.5 nM) e posteriormente misturado com 50 μ L de células 5×10^5 células/ml ressuspensas em tampão TBS (20mM Tris; 0,15M NaCl; pH7,5). Após 11 minutos, foi adicionado 100 μ L de 25 mM CaCl_2 e o tempo necessário para ocorrer a coagulação foi medido.

4. Resultados

4.1 Ação pró-coagulante da linhagem de glioblastoma humano U87-MG

4.1.1– Expressão e atividade do Fator Tecidual

Uma série de estudos demonstra que a atividade pró-coagulante de diversas linhagens tumorais, incluindo gliomas, deve-se, pelo menos em parte, à expressão de fator tecidual (TF). Dessa forma, através da análise por imunocitoquímica, verificamos a expressão desta proteína pelas células U87-MG. Confirmando dados prévios da literatura (Carson; Pirruccello, 1998; Rong et al, 2005), verificamos que esta linhagem de glioblastoma expressa TF, como demonstrado na figura 7A. Controles realizados somente com o anticorpo secundário confirmam a especificidade do ensaio (figura 7B).

Em seguida, para verificar a funcionalidade do TF expresso pelas células U87-MG, realizamos o ensaio de formação do complexo tenase extrínseco, as células foram incubadas na presença de Fator VIIa, Fator X e íons de Ca^{2+} . A formação de Fator Xa foi estimada utilizando substrato cromogênico específico para essa enzima e a densidade ótica medida em um leitor de Elisa. A figura 8 mostra que esta linhagem celular foi capaz de promover a conversão do Fator X em Fator Xa (círculos), quando comparado com os controles realizados na ausência de células (quadrados) ou na ausência de Fator VIIa (triângulos). Desta forma, confirmamos que as células tumorais U87-MG expressam TF constitutivamente e permitem a montagem do complexo tenase extrínseco em sua superfície.

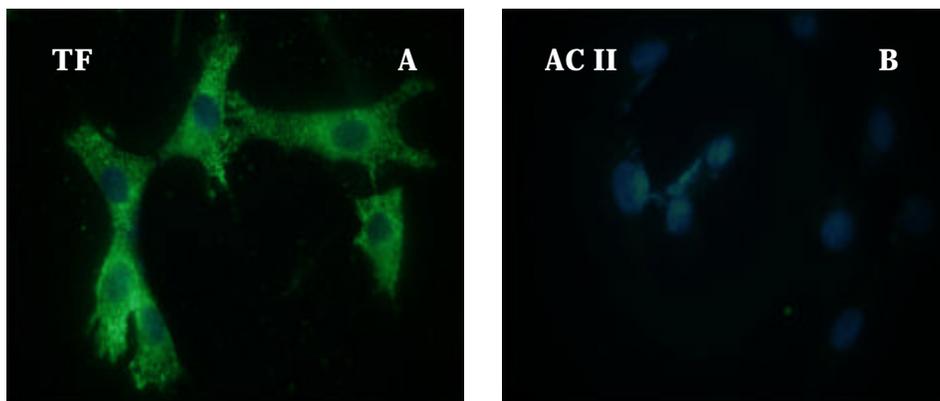


Figura 7 – Análise da expressão de TF nas células U87-MG realizada por imunocitoquímica. Painel A, células incubadas por mais de 12h com anticorpo primário específico para TF. A marcação em verde revela reação positiva para essa proteína. Painel B células incubadas apenas com o anticorpo secundário marcação em azul revela reação específica para DAPI.

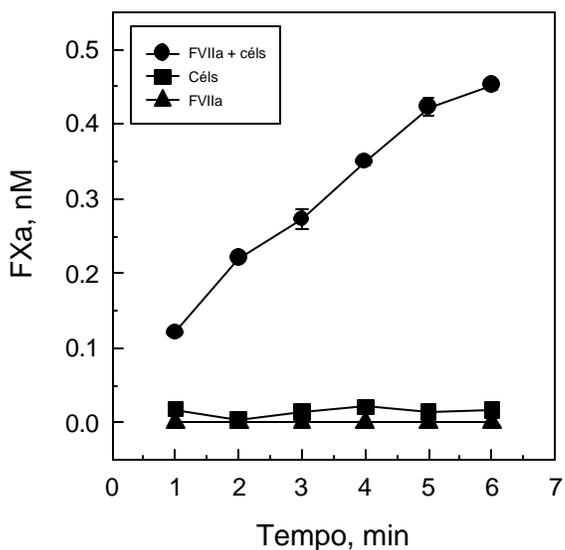


Figura 8 – As células de glioblastoma U87-MG promovem a ativação do Fator Xa através do complexo tenase extrínseco. A ativação de Fator X (100nM) por Fator VIIa (1nM) na presença (?) ou na ausência (?) de células U87-MG (concentração de células de $5 \cdot 10^5$ céls/ml) e na ausência de Fator VIIa (?). A formação de Fator Xa foi determinada adicionando-se o substrato cromogênico S-2765 (2mM) e a densidade óptica medida a 405 nm em um leitor de Elisa (Thermomax Microplate Reader, Molecular Devises, Menlo Park, EUA). As concentrações de Fator Xa foram obtidas a partir de uma curva de diluição de uma solução padrão FXa. Os dados são médias \pm EP de três experimentos independentes.

4.1.2 – Exposição de fosfatidilserina e seu papel na atividade pró-coagulante

Estudos anteriores demonstraram a importância da expressão de fosfolípidos carregados negativamente, em especial da fosfatidilserina, na membrana de células tumorais para a ligação das enzimas da cascata de coagulação (Sugimura, 1994). Assim, a exposição deste lipídeo na membrana de células U87-MG foi avaliada através de ensaios de citometria de fluxo como demonstrado no histograma 1 da figura 9, quando as células foram incubadas com anticorpo específico contra fosfatidilserina ocorreu um deslocamento da intensidade de fluorescência em relação ao controle sem o anticorpo, confirmando, assim, a exposição de fosfatidilserina por esta linhagem celular. Um outro ensaio de citometria de fluxo, utilizando-se anexina V conjugada com FITC, foi realizado para confirmar a exposição deste fosfolípido aniônico na membrana destas células. Como observado no histograma 2 (vide também a figura 9), ocorreu deslocamento da intensidade de fluorescência das células marcadas com anexina V quando comparado com o controle na ausência desta proteína. Realizamos controles com iodeto de propídio para detecção da integridade da membrana, confirmando a presença de fosfatidilserina na face externa da membrana das células U87-MG.

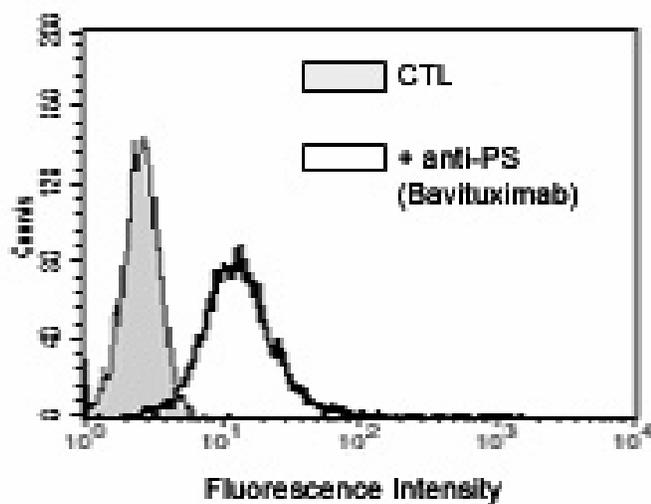
Para verificar o papel da fosfatidilserina, exposta na membrana das células U87-MG, na atividade pró-coagulante, realizamos ensaios de formação dos complexos tenase intrínseco e protrombinase, ambos reconhecidamente dependentes da presença de fosfolípidos carregados negativamente. Para analisar a formação do complexo tenase intrínseco, incubamos as células de U87-MG na presença de Fator IXa, Fator VIIIa, Fator X e íons Ca^{2+} . A figura 10 mostra que as células U87-MG foram capazes de promover a conversão de Fator X em Fator Xa (círculos), quando comparado ao ensaio controle, realizado na ausência de células (triângulos).

Em seguida, avaliamos a habilidade das células U87-MG de permitirem a montagem do complexo protrombinase. O ensaio foi realizado incubando-se as células com Fator Xa, Fator Va e protrombina, na presença de íons Ca^{2+} . Como demonstrado na figura 11, o complexo formado por Fator Xa/Fator Va/U87-MG foi capaz de promover a conversão da protrombina em trombina (triângulo fechado), quando comparado ao ensaio controle na ausência de células (triângulo aberto).

Para confirmar a importância da exposição de fosfatidilserina para a ligação e montagem dos complexos pró-coagulantes tenase intrínseco e protrombinase, na membrana

das células de glioblastoma, realizamos ensaios de ativação destes complexos na presença de diferentes concentrações de anexina V. Como mostrado na figura 12, a atividade destes complexos foram inibidas progressivamente por concentrações crescentes de Anexina V, evidenciando, dessa forma, a impotência da fosfatidilserina para a ligação e montagem dos complexos da coagulação.

Histograma



Histograma 2

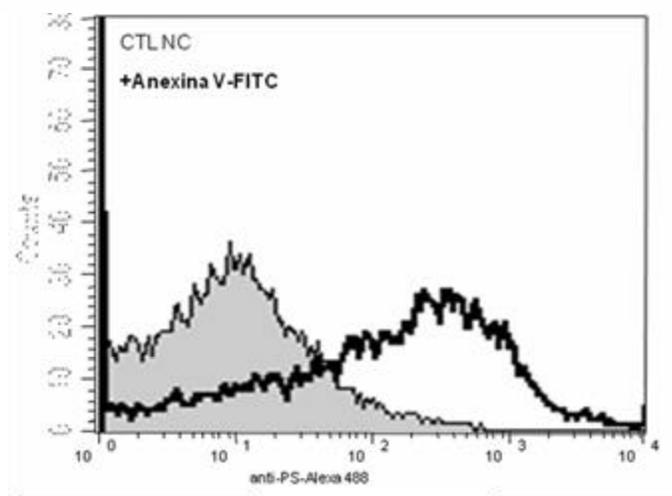


Figura 9 – Análise da exposição de fosfatidilserina na membrana de células da linhagem U87-MG. Histograma 1 - Realizada através de ensaios de citometria de fluxo. A linha cinza representa a fluorescência basal das células e a linha preta a fluorescência na presença do anticorpo anti-fosfatidilserina (Bavituximab). Histograma 2 - A linha preta representa a fluorescência na presença de anexina V-FITC e negativo para iodeto de propídio. A linha cinza representa o controle na ausência de anexina V-FITC.

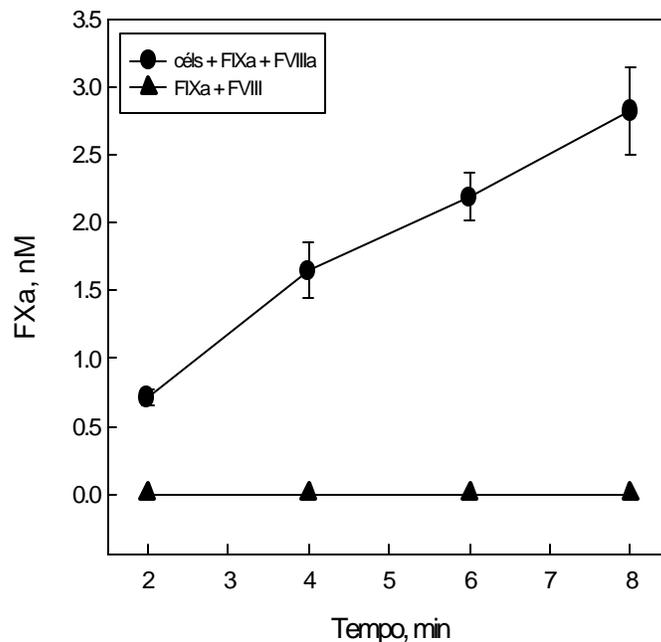


Figura 10 – As células de glioblastoma U87-MG promovem a formação de Fator Xa através do complexo tenase intrínseco. A ativação de Fator X (100nM) por FIXa (0.2nM) e Fator VIIIa (1 IU/mL) foi realizada na ausência (?) ou na presença (?) de células de U87-MG (concentração de célula 5×10^5 cels/mL). A formação de Fator Xa foi determinada adicionando-se o substrato cromogênico S-2238 (2mM) e a densidade ótica medida a 405 nm em um leitor de Elisa (Thermomax Microplate Reader, Molecular Devises, Menlo Park, EUA). As concentrações de FXa foram obtidas a partir de uma curva de diluição de uma solução padrão FXa. como indicado nos materiais e métodos. Os dados são médias \pm EP de três experimentos independentes.

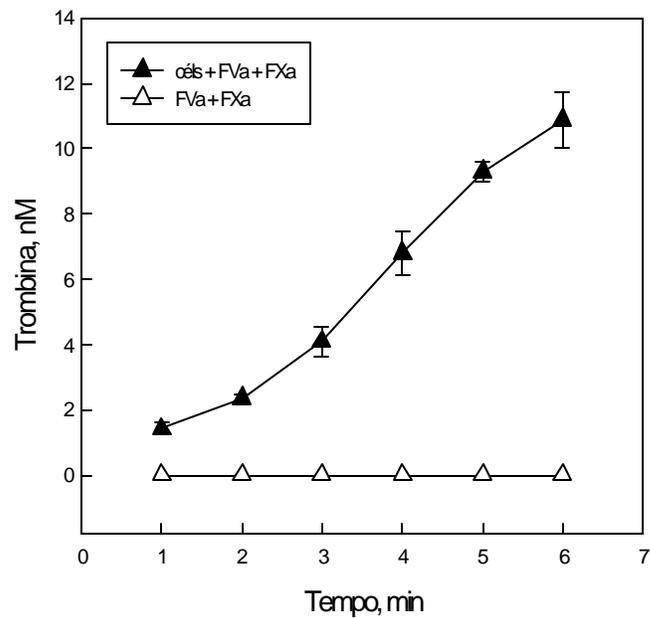


Figura 11 – As células de glioblastoma U87-MG promovem a formação de trombina através do complexo protrombinase. A ativação de protrombina humana (0,5 nM) por Fator Xa (10 pM) e Fator Va (1nM) foi realizada na ausência (?) ou na presença (?) das células U87-MG. A formação de trombina foi determinada adicionando-se o substrato cromogênico S-2238 (2mM) (Chromogenix, Mölndal, Suécia), e a densidade ótica medida a 405nm em um leitor de Elisa. As velocidades (mOD/min) obtidas nos primeiros minutos da reação foram usadas para calcular a quantidade de trombina formada. Os dados são médias \pm DP de quatro experimentos independentes.

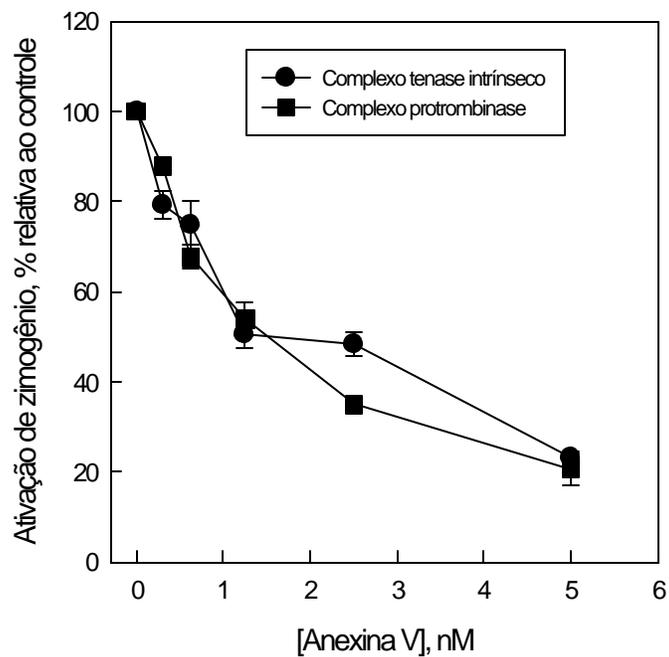


Figura 12 – Inibição dos complexos pró-coagulantes por anexina V. (●) Complexo tenase intrínseco foi medido através da ativação de Fator X (100nM) por FIXa (0.2nM) e Fator VIIIa (1 IU/mL) na presença das células U87-MG e na presença de anexina V (0-5nM). (■) Complexo protrombinase foi medido através da ativação de protrombina humana (1 nM) por Fator Xa (10 pM) e Fator Va (1nM) na presença de células U87-MG e na presença de anexina V (0-5nM). Os dados são médias \pm DP de quatro experimentos independentes.

4.1.3– Ativação da coagulação sanguínea pelas células U87-MG

Nos experimentos anteriores, foi mostrado a capacidade da linhagem celular U87-MG de promover a montagem e a ativação dos complexos da coagulação. Isso se deve à expressão do TF e à exposição de fosfatidilserina na membrana destas células. Desta forma, verificamos a capacidade destas células de promover a ativação do tempo de coagulação do plasma humano. Observamos que as células foram capazes de diminuir o tempo de coagulação em função da concentração de células, quando comparadas com o controle na ausência de células (figura 13), indicando que esta linhagem celular de glioblastoma humano apresenta uma potente atividade pró-coagulante, permitindo a montagem dos três complexos da coagulação sanguínea.

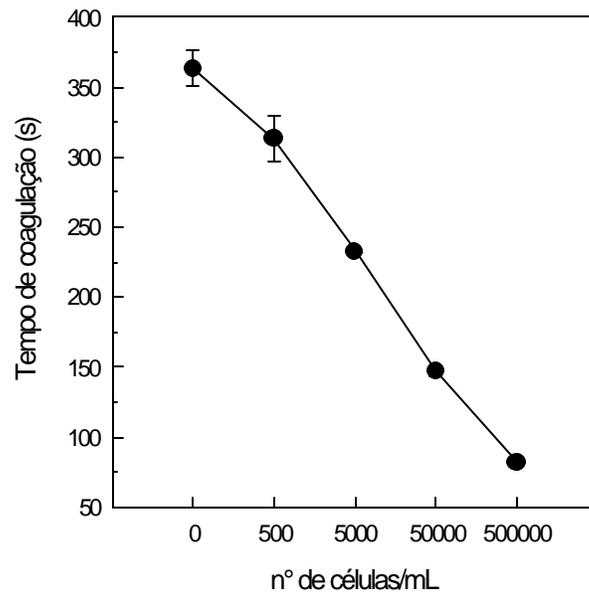


Figura 13 – Tempo de recalcificação de plasma humano. Redução do tempo de recalcificação de plasma humano de forma concentração de células-dependente (0 a 5×10^5 células/ml) quando comparadas ao controle somente com TBS. Os dados representam a média \pm EP de três experimentos independentes.

4.2 Efeito do Ixolaris sobre a linhagem tumoral U87-MG

4.2.1 – Inibição da atividade pró-coagulante de U87-MG pelo Ixolaris

Muitos estudos têm demonstrado que a cascata de coagulação apresenta um importante papel na progressão do tumor, (Fancis, 1998; Zacharscki, 2003; Banke, 2005). Dessa forma, vários inibidores específicos da cascata de coagulação têm sido testados com o objetivo de inibir o crescimento ou a disseminação do tumor (Hejna, 1998; Francis, 2002; Banke, 2005). Nossos resultados anteriores mostraram que a linhagem celular U87-MG promove a montagem dos complexos da coagulação devido à expressão do TF e de fosfatidilserina na sua superfície. Com isso, a próxima etapa desse trabalho, foi verificar a capacidade do Ixolaris em inibir a atividade funcional do Fator Tecidual. Para isso, realizamos o ensaio de formação do complexo tenase extrínseco na presença de Ixolaris, proteína capaz de se ligar ao fator X e ao complexo formado pelo fator TF e o fator VIIa. A atividade do complexo foi inibida, progressivamente, por concentrações crescentes do Ixolaris, confirmando sua capacidade inibitória (figura 14).

Assim, como a atividade do complexo tenase extrínseco foi inibida, progressivamente, por concentrações crescentes de Ixolaris, a atividade do complexo tenase intrínseco também foi inibida, devido à capacidade do Ixolaris de se ligar com alta afinidade ao fator X, impedindo, assim, a ativação deste zimogênio pelo complexo tenase intrínseco. O Ixolaris se liga com alta afinidade também ao fator Xa, impedindo o reconhecimento da protrombina por este complexo. A inibição destes dois complexos também foram dependentes de concentrações crescentes dessa proteína. Nos experimentos anteriores, mostramos a capacidade do Ixolaris em inibir a montagem e a ativação dos complexos da coagulação promovida pela linhagem U87-MG. Isso se deve à capacidade do Ixolaris de se ligar, com alta afinidade, aos fatores X e Xa. Desta forma, verificamos a capacidade desse anticoagulante em inibir a ativação do tempo de coagulação do plasma humano, promovida pela célula tumoral U87-MG. Foi observado que o Ixolaris foi capaz de reverter a ativação do tempo de coagulação acelerado pelas células U87-MG, sendo, essa inibição, dependente da concentração do anticoagulante (figura17). Dessa forma, podemos concluir que o Ixolaris apresenta capacidade de inibir todos os complexos da coagulação sanguínea ativados pela linhagem celular U87-MG.

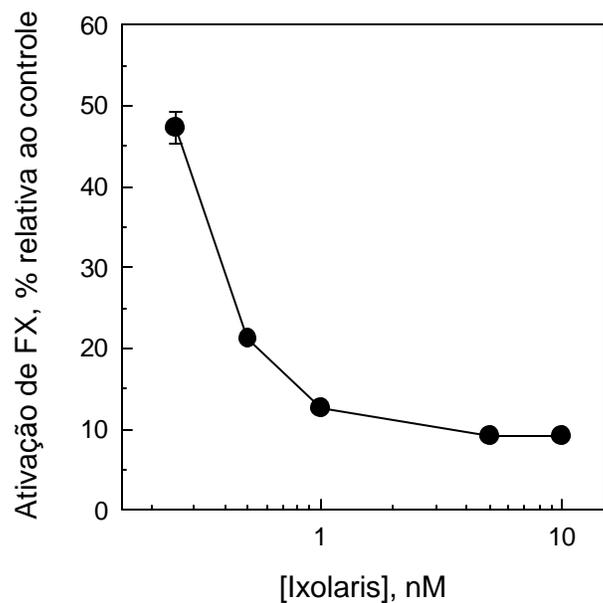


Figura 14 – Inibição do complexo tenase extrínseco por Ixolaris. O complexo tenase extrínseco foi realizado através da ativação do Fator X (100nM) por Fator VIIa (1nM) na presença das células U87-MG (concentração de células de 5.10^5 céls/ml) e de diferentes concentrações de Ixolaris (0-10nM). Os dados são médias \pm DP de quatro experimentos independentes.

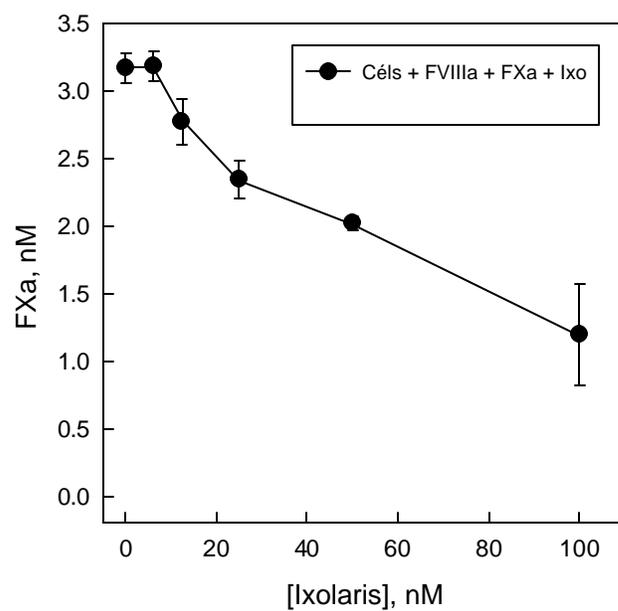


Figura 15 – Inibição do complexo tenase intrínseco por Ixolaris. Complexo tenase intrínseco foi medido através da ativação do Fator X (100nM) por Fator IXa (0.2nM) e Fator VIIIa (1 IU/mL) na presença das células U87-MG (concentração de célula 5×10^5 cels/mL) e de diferentes concentrações de Ixolaris (0-100nM). Os dados são médias \pm DP de quatro experimentos independentes.

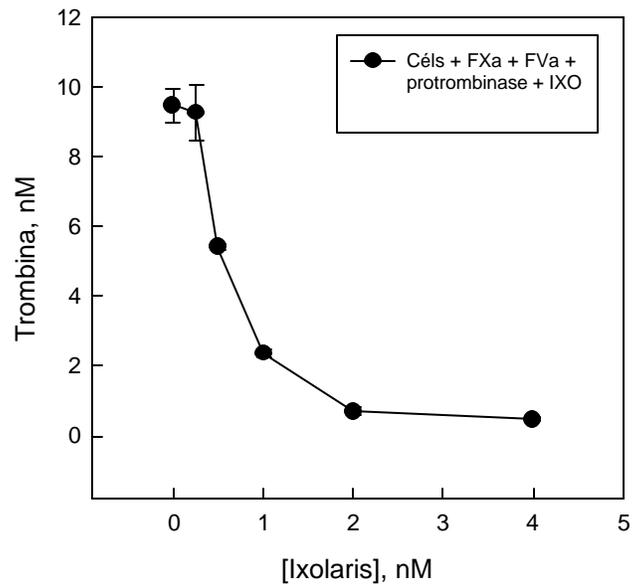


Figura 16 – Inibição do complexo protrombinase por Ixolaris. Complexo protrombinase foi medido através da ativação de protrombina humana (1 nM) por Fator Xa (10 pM) e Fator Va (1nM) na presença das células U87-MG (concentração de células de $5 \cdot 10^5$ céls/ml) e de diferentes concentrações de Ixolaris (0-4nM). Os dados são médias \pm DP de quatro experimentos independentes.

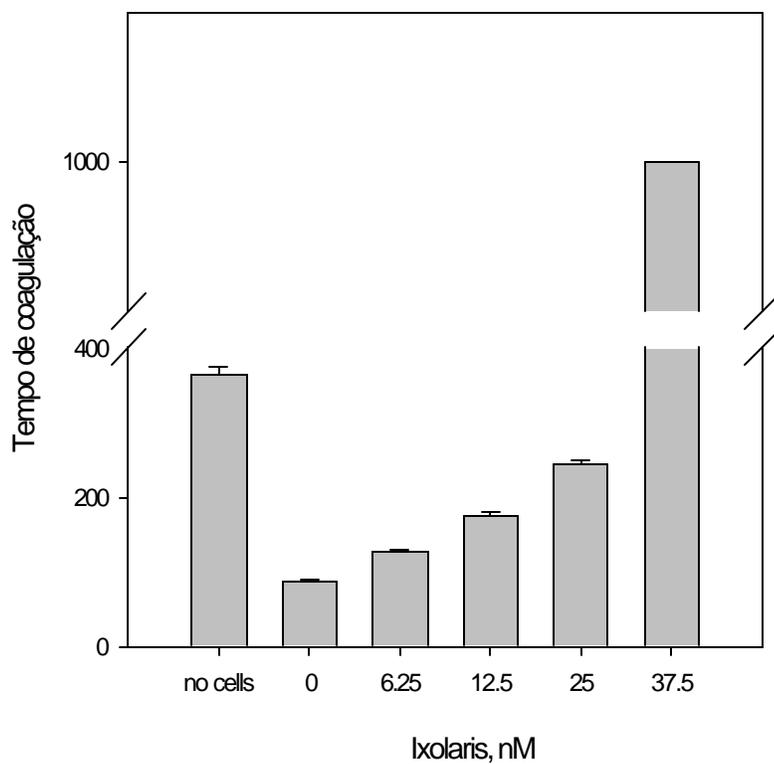


Figura 17 – Inibição do tempo de recalcificação de plasma humano por Ixolaris. A redução do tempo de recalcificação de plasma humano na presença das células U87-MG (concentração de células de $5 \cdot 10^5$ céls/ml) foi revertido na presença de diferentes concentrações de Ixolaris (0-37.5nM). Os dados são médias \pm DP de quatro experimentos independentes.

4.2.2– Ensaio de tumorigênese *in vivo*

Mostramos, anteriormente, a capacidade do Ixolaris em inibir a atividade pró-coagulante das células U87-MG e sabendo que estas características apresentam um importante papel no desenvolvimento do tumor, nós realizamos um ensaio de tumorigênese *in vivo*, conforme descrito em materiais e métodos, com o intuito de verificar o efeito no Ixolaris no crescimento do tumor. Após 30 dias de tratamento, os animais foram sacrificados e os tumores foram dissecados e pesados. Foi observado que o peso médio dos tumores dos animais tratados com a concentração de 250µg/Kg de Ixolaris foi de 0,106g, enquanto que o peso médio dos tumores dos animais tratados com a concentração de 50µg/Kg foi de 0,280g e o peso médio dos tumores dos animais controles, ou seja, animais que foram tratados apenas com PBS foi de 0,320g. Dessa forma, como mostrado na figura 18, concluímos que os animais tratados com a concentração de 250 µg/kg de Ixolaris tiveram uma inibição significativa do crescimento do tumor, quando comparados com os animais tratados com a concentração de 50µg/kg e com os animais controles.

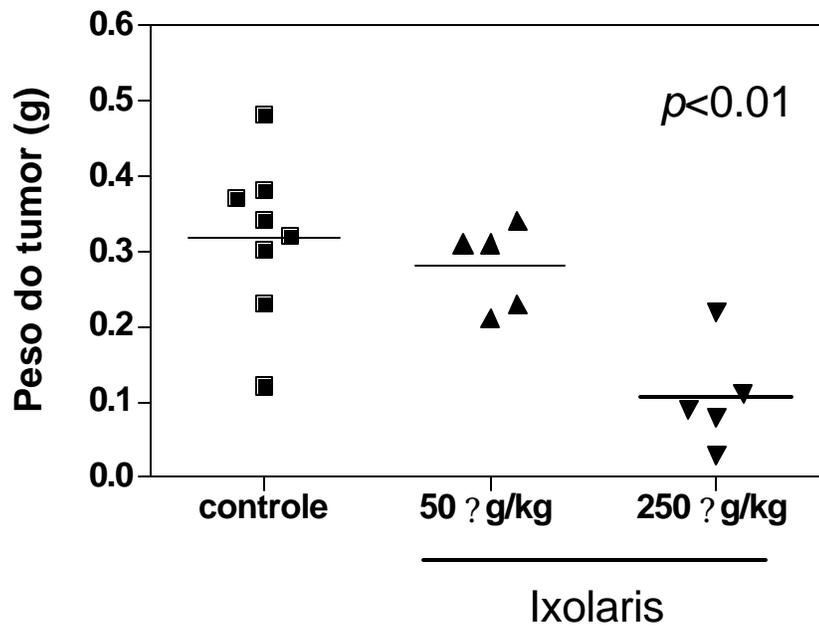


Figura 18 – Ixolaris inibe o crescimento do tumor induzido por células U87-MG *in vivo*. O ensaio de tumorigênese *in vivo* foi realizado na ausência e na presença de diferentes concentrações de Ixolaris (50 e 250 µg/kg), após 30 dias de tratamento os animais foram sacrificados e os tumores pesados.

4.2.3– Ixolaris não altera a viabilidade de células U87-MG *in vitro*

Os ensaios de determinação da viabilidade celular foram realizados para verificar as alterações na sobrevivência das células U87-MG quando tratadas ou não com Ixolaris. Como mostra a figura 19, as células tratadas com Ixolaris não exibiram diminuição da viabilidade celular de maneira dependente da concentração e do tempo de incubação.

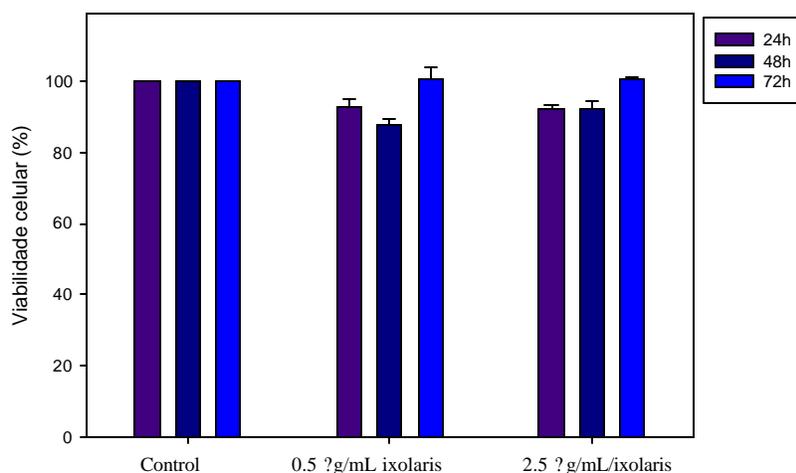


Figura 19 – Determinação da viabilidade celular. O ensaio de MTT (Brometo de 3,4,5-dimetilazol-2,5-difeniltetrazolium) foi realizado na ausência e na presença de diferentes concentrações de Ixolaris (0.5 e 2.5 µg/ml), e em diferentes tempos de incubação 24, 48 e 72 horas. Os dados são médias \pm DP de quatro experimentos independentes.

5. Discussão

O glioblastoma multiforme é considerado o tipo de tumor mais agressivo do SNC e isto se deve ao seu comportamento extremamente invasivo, que promove uma destruição considerável do tecido normal adjacente. A presença de focos necróticos é uma das principais diferenças entre os glioblastomas e os gliomas de menor grau (Brat e col, 2004). De fato, Hammoud e colaboradores (1996) demonstraram uma estreita correlação entre o tamanho da área de necrose tumoral, analisado por exames de ressonância magnética nuclear, com a sobrevida de pacientes com glioblastoma. Outro achado histopatológico marcante no glioblastoma humano é a oclusão vascular trombótica, característica que sugere que a necrogênese estaria diretamente correlacionada com uma tendência pró-coagulante nestes pacientes (Rong e col, 2005).

Vários relatos da literatura sugerem possíveis mecanismos que explicariam o aumento da coagulação sanguínea observada nos pacientes com câncer, sendo um dos principais o aumento na expressão da proteína Fator Tecidual (TF) (Rickles e Falanga, 2001; Rong e col, 2005; Rak e col, 2006). De fato, pelo menos dois estudos relatam que a expressão de TF está diretamente correlacionada com o grau de agressividade dos gliomas (Hamanda e col, 1996; Guan e col, 2002), o que explicaria a maior ocorrência de vaso-oclusão no glioblastoma. Além da expressão de TF, outro mecanismo pró-coagulante que tem sido destacado na literatura é a exposição do lipídeo fosfatidilserina (Sugimura e col, 1994; Barrowcliffe e col, 2002; Pickering et al, 2004), um importante componente dos complexos pró-coagulantes dependentes de membranas (Kalafatis e col, 1994). De fato, nosso grupo demonstrou recentemente que a linhagem C6 de glioma de rato possui o lipídeo fosfatidilserina exposto em sua membrana externa e esta condição contribui para os mecanismos pró-coagulantes desta linhagem tumoral (Fernandes e col, 2006). Em conjunto, a expressão de TF e a exposição de fosfatidilserina tornariam a célula tumoral extremamente competente para induzir a coagulação sanguínea.

Neste trabalho, nós demonstramos que a linhagem celular de glioblastoma humano U87-MG apresenta uma potente atividade pró-coagulante *in vitro*. Inicialmente, confirmamos que esta linhagem celular expressa TF, conforme vários relatos prévios da literatura (Carson e Pirruccello, 1998; Yamahata e coll, 2002). As células U87-MG, ao expressarem TF na sua superfície, apresentam a capacidade de se ligarem ao Fator VIIa, promovendo a montagem do complexo tenase extrínseco e iniciando a cascata de coagulação. Em seguida, nós também demonstramos que a exposição de fosfatidilserina na superfície externa torna estas células

capazes de promover a formação do complexo tenase intrínseco, com subsequente ativação do Fator Xa, e do complexo protrombinase, levando à formação de trombina. A atividade desses dois complexos foi inibida progressivamente por concentrações crescentes de Anexina V, proteína capaz de se ligar a fosfatidilserina, confirmando a importância deste lipídeo para a ligação e montagem dos complexos tenase intrínseco e protrombinase na membrana das células de glioblastoma.

As propriedades pró-coagulantes das células de glioblastoma parecem contribuir significativamente para o aparecimento de regiões de hipóxia no tumor (Brat e col, 2004). Foi mostrado que a hipóxia aumenta a migração e a invasão do glioblastoma (Raza e col, 2002; Brat e col, 2004b; Zagzag e col, 2006; Ezhilarasan e col, 2007). A hipóxia aumenta a expressão de fatores transcricionais, como o HIF (*Hypoxia Induced factor*), que, por sua vez, medeia um aumento na expressão de VEGF e de proteases da matriz extracelular (Brat e col, 2004b). Interessante mente, a hipóxia também promove um aumento na expressão de TF, resultando em uma maior atividade pró-coagulante das células de glioblastoma humano (Rong e col, 2005).

A elevada expressão de TF e a consequente formação de trombina não são responsáveis apenas por promover a formação de fibrina e, conseqüentemente, de trombos no interior dos vasos dos tumores. Essas proteínas também promovem uma importante resposta celular através da ativação de uma família de receptores acoplados à proteína G, conhecidos como PAR – receptores ativados por proteases. Esses receptores são ativados por um mecanismo que envolve proteólise da parte extracelular do receptor (Coughlin, 2000). No câncer, esses receptores são expressos em diferentes tipos celulares, como as próprias células tumorais, células endoteliais, células inflamatórias e plaquetas, e estes têm sido implicados no crescimento tumoral, invasão e metástase (Belting e col., 2005; Rak e col., 2006).

Em linhagens de glioma, diversos trabalhos demonstram que a ativação dos receptores do tipo PAR promove a formação de citocinas pró-inflamatórias. Tem sido demonstrada a capacidade da trombina promover um aumento na expressão do RNAm e da secreção de IL-6. Este efeito dependente da concentração de trombina pode ser inibido por Hirudina (proteína isolada da saliva de *Hirudo medicinalis*, capaz de se ligar e inibir a ação da trombina). A trombina também promove um aumento significativo no RNAm de IL1- β e de TNF- α . Portanto, a trombina e seus agonistas estimulam a expressão de citocinas pró-

inflamatórias em linhagens celulares de glioma (Meli e col, 2001; Fan e col, 2005). Além disso, a ativação dos receptores do tipo PAR por trombina ou por peptídeos agonistas promove a ativação do fator de transcrição NF- κ B e, conseqüentemente, de citocinas pró-inflamatórias (Zieger e col, 2001).

Devido à forte correlação entre os processos pró-coagulantes com a agressividade dos tumores, em particular dos glioblastomas, novas terapias com substâncias anticoagulantes têm sido testadas, tendo apresentado resultados satisfatórios. Foi mostrado que a Varfarina, a heparina de baixo peso molecular e o Argatroban promovem uma inibição da progressão do tumor. Diferentemente dos outros inibidores da trombina, o Argatroban apresenta um baixo potencial hemorrágico *in vivo* (Hursting e col, 1997).

Outras substâncias anticoagulantes também têm sido testadas como antineoplásicos, entre elas, o TFPI, um inibidor fisiológico do complexo TF/FVIIa e o NAPc2, uma proteína recombinante derivada do *Ancylostoma caninum* capaz de formar um complexo quaternário com o TF/FVIIa e FX e inibi-lo. A literatura tem mostrado que TFPI e NAPc2 apresentam a capacidade de inibir o crescimento tumoral e o desenvolvimento de metástase em linhagem de melanoma B16. Além disso, o NAPc2 promove uma inibição do crescimento dessas células *in vivo* (Amirkhosravi, 2002; Hembrough, 2003). Ornstein e colaboradores sugeriram em 2002, que a inibição do TF e, conseqüentemente, de trombina, pode ser de grande importância para o tratamento de pacientes com glioblastoma. Isso foi baseado em experimentos, nos quais a síntese de TF foi inibida em células de glioblastoma multiforme, resultando na redução da proliferação e da capacidade invasiva dessa linhagem celular (Ishibashi e col, 2000).

Dessa forma, nós testamos a capacidade do Ixolaris, um potente inibidor da coagulação sanguínea, em inibir a ativação dos complexos da coagulação sanguínea. Nós observamos que ocorreu uma diminuição na formação do Fator Xa pelo complexo tenase extrínseco e intrínseco, além da diminuição da formação de trombina pelo complexo protrombinase. Quando realizamos o ensaio de tumorigênese *in vivo*, observamos que o Ixolaris, na dose de 250 μ g/kg, promoveu uma diminuição significativa do crescimento do tumor quando comparado com os animais controle. Os animais que receberam apenas Ixolaris não apresentaram alterações no processo de coagulação, após 30 dias de tratamento. Realizamos, também, um ensaio de viabilidade celular e não observamos alterações na

viabilidade das células U87-MG nas doses e nos tempos testados, descartando, assim, o efeito citotóxico do Ixolaris.

É importante reconhecer que os anticoagulantes cujo alvo é o TF-Fator VIIa, tal como o Ixolaris, o NAPc2, e o TFPI humano parecem ser eficientes, na inibição das características pró-coagulantes das células tumorais, promovendo uma inibição do seu crescimento. Notavelmente, estes compostos estão menos freqüentemente associados a grandes sangramentos. Nos ensaios de tumorigênese *in vivo*, realizados em camundongos Balbc/nude, nós não observamos alteração alguma do sangramento nos grupos tratados com Ixolaris. É importante ressaltar que esses animais foram monitorados durante os 30 dias do tratamento com Ixolaris.

Em resumo, a linhagem celular U87-MG apresenta uma potente atividade pró-coagulante, possuindo a capacidade de suportar a montagem dos complexos da coagulação sanguínea, como resultado da concomitante expressão de TF e exposição de fosfatidilserina. A molécula Ixolaris apresentou uma efetiva ação anticoagulante *in vitro*, inibindo os complexos da coagulação montados nas células tumorais. Além disso, o Ixolaris inibiu o crescimento dos tumores *in vivo*, sugerindo sua potencial utilização no tratamento de pacientes com glioblastoma. No entanto, futuros estudos utilizando o modelo de crescimento intracerebral do tumor, se fazem necessários para consolidar esta proposta.

6. Conclusão

7.1 Células de glioblastoma U87-MG:

Expõem TF em sua superfície e promovem a formação do complexo tenase extrínseco;

Expõem PS e promovem a formação dos complexos pró-coagulantes tenase intrínseco e protrombinase, de maneira PS-dependente;

Aceleram o tempo de coagulação do plasma humano;

7.2 Ixolaris:

Inibe todos os complexos pró-coagulantes, montados na superfície da linhagem celular U87-MG;

Inibe a atividade pró-coagulante das células U87-MG;

O ixolaris é uma boa ferramenta para se estudar o efeito de uma droga anticoagulante/antitrombótica na biologia tumoral;

7. Bibliografia

AHAMED J, BELTING M, RUF W. Regulation of tissue factor-induced signaling by endogenous and recombinant tissue factor pathway inhibitor 1. *Blood*, 2005; 105(6): 2384-2391.

AMIRKHOSRAVI A, MEYER T, CHANG J, AMAYA M, SIDDIQUI F, DESAI H, FRANCIS JL. Tissue Factor Pathway Inhibitor Reduces Experimental Lung Metastasis of B16 Melanoma. *Thromb Haemost* 2002; 87: 930-6.

BELTING M, DORRELL MI, SANDGREN S, SANDGREN S, AGUILAE, AHAMED J, DORFLEUTNER A, CARMELIET P, MUELLER BM, FRIEDLANDER M, RUF W. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *NatMed*. 2004; 10:502-8.

BELTING M, AHAMED J, RUF W. Signaling of the Tissue Factor Coagulation Pathway in Angiogenesis and Cancer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1545-1550.

BERGMANN S, JUNKER K, HENKLEIN P, HOLLENBERG MD, SETTMACHER UTZ, KAUFMANN R. Par-type thrombin receptors in renal carcinoma cells: Par1-mediated EGFR activation promotes cell migration. *Oncology Reports* 2006; 15: 889-893.

BLOOM DJ, FAWCETT J. A Textbook of Hystology. Ed. Chapman & Hall: New York; 1994.

BOCCACCIO C, MEDICO E. Cancer and blood coagulation. *Cell Mol Life Sci*. 2006; 63(9): 1024-7.

BRAT DJ, MEIR EGV. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Laboratory Investigation* 2004; 84: 397-405.

BRAT DJ, MAPSTONE TB. Malignant glioma physiology: cellular response to hypoxia and Its role in tumor pr ogression. *Ann Intern Med*. 2003;138: 659-668.

BRAT DJ, CASTELLANO-SANCHEZ AA, HUNTER SB, PECOT M, COHEN C, HAMMOND EH, DEVI S, KAUR B, MEIR EGV. Pseudopalisades in Glioblastoma Are Hypoxic, Express Extracellular Matrix Proteases, and Are Formed by an Actively Migrating Cell Population. *Cancer Research* 2004b; 64: 920-927b.

BARROWCLIFFE TW, FÁBREGAS P, JARDI M, CANCELAS J, RABANEDA M, FELEZ J. Procoagulant Activity of T Lymphoblastoid Cells due to Exposure of Negatively Charged Phospholipid. *Thromb Haemost* 2002; 87: 442-449.

CARSON SD, PIRRUCCELLO SJ. Tissue Factor and cell morphology variations in cell lines subcloned from U87-MG. *Blood coagulation and Fibrinolysis* 1998; 9(6): 539-547.

- CONTRINO J, HAIR G, KREUTZER DL, RICKLES FR. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nat Med.* 1996; 2: 209-15.
- COUGHLIN SR. Protease-activated receptors in the cardiovascular system. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2002; 67: 197-208.
- DE CICCIO M. The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004; 50(3): 187-196.
- DONNELLY KM, BROMBERG ME, MILSTONE A, MCNIFF JM, TERWILLIGER G, KONIGSBERG WH, CAPPELLO M. Ancylostoma caninum Anticoagulant Peptide Blocks Metastasis In Vivo and Inhibits Factor Xa Binding to Melanoma Cells In Vitro. *Thromb Haemost.* 1998; 79: 1041-7.
- DOOLITTLE ND. State of the science in brain tumor classification. *Semin Oncol Nurs.* 2004; 20(4): 224 – 30.
- DVORAK HF. Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor: A Critical Cytokine in Tumor Angiogenesis and a Potential Target for Diagnosis and Therapy. *J Clin Oncol.* 2002; 20(21): 4368-80.
- EZHILARASAN R, MOHANAM I, GOVINDARAJAN K, MOHANAM S. Glioma cells suppress hypoxia-induced endothelial cell apoptosis and promote the angiogenic process. *International Journal of oncology* 2007; 30: 701-707.
- FALANGA A. Thrombophilia in cancer. *Semin Thromb Hemost.* 2005; 31(1): 104-110.
- FAN Y, ZHANG W, MULHOLLAND. Thrombin and PAR-1-AP Increase Proinflammatory Cytokine Expression in C6 Cells. *Journal of Surgical Research* 2005; 129: 196-201.
- FERNANDES RS, KIRSZBERG C, RUMJANEK VM, MONTEIRO RQ. On the molecular mechanisms for the highly procoagulant pattern of C6 glioma cells. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006; 4: 1546-1552.
- FERNANDEZ PM, PATIERNO SR, RICKLES FR. Tumor Angiogenesis and blood coagulation. In: LUGAS LUGASSY G, FALANGA A, KAKKAR AK, RICKLES FR. *Thrombosis and Cancer London, United Kingdom, Taylor and Francis Group.* 2004; 69-98.
- FRANCISCHETTI IM, VALENZUELA JG, ANDERSEN JF, ET AL. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, Ixodes scapularis: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood* 2002; 99: 3602-12.
- FURIE B, FURIE BC. Cancer-associated thrombosis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2006; 36: 177-181.

- GUAN M, JINB J, SUA B, LIUA WW, LUA Y. Tissue factor expression and angiogenesis in human glioma. *Clinical Biochemistry* 2002; 35: 321-325.
- GYMENEZ y RIBOTTA M, MENET V, & PRIVATE A. The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CSN. *Prog Brain Res.* 2001; 132: 587-610.
- GUAN M, JIN J, SU B, LIU WW, LU Y. Tissue factor expression and angiogenesis in human glioma. *Clinical Biochemistry* 2002; 35: 321-325.
- HAMADA K, KURATSU J, SAITOH Y, TAKESHIMA H, NISHI T, USHIY. Expression of tissue factor correlates with grade of malignancy in human glioma. *Cancer* 1996; 77: 1877-83.
- HAMMOUD MA, SAWAYA R, SHI W, THALL PF, LEEDS NE. Prognostic significance of preoperative MRI scans in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 1996 27(1):65-73.
- HEMBROUGH TA, SWARTZ GM, PAPATHANASSIU A, VLASUK GP, ROTE WE, GREEN SJ, PRIBLUDA VS. Tissue Factor/Factor VIIa Inhibitors Block Angiogenesis and Tumor Growth Through a Nonhemostatic Mechanism. *Cancer Research* 2003; 63: 2997-3000
- HOFFMAN M, MONROE DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost.* 2001; 85(6): 958-965.
- HOFFMAN R, HAIM N, BRENNER B. Cancer and thrombosis revisited. *Blood* 2001; 15: 61-67.
- HUA Y, TANG L, KEEP RF, SCHALLERT T, FEWEL ME, MURASZKO KM, HOFF JT, XI G. The role of thrombin in gliomas. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005;
- HUNTER SB, BRAT DJ, OLSON JJ, VON DEIMLING A, ZHOU W, VAN MEIR EG. Alterations in molecular pathways of diffusely infiltrating glial neoplasms: Application to tumor classification and anti-tumor therapy. *Int J Onco* 2003; 23: 857-69.
- HURSTING MJ, ALFORD KL, BECKER JC, BROOKS RL, JOFFRION JL, KNAPPENBERGERGD, KOGAN PW, KOGAN TP, MCKINNEYAA, SCHWARZ JRRP. Novastan (brand of argatroban): a small-molecule, direct thrombin inhibitor. *Semin Thromb Hemost* 1997; 23: 503-16.
- ISHIBASHI H, NAKAGAWA K, ONIMARU M, CASTELLANOUS EJ, KANEDA Y, NAKASHIMA Y, SHIRASUNA K, SUEISHI K. Sp1 Decoy Transfected to Carcinoma Cells Suppresses the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor, Transforming Growth Factor b1, and Tissue Factor and Also Cell Growth and Invasion Activities. *Cancer Research* 2000; 60(15): 6531-6536.

ISHIHARA H, CONNOLY AJ, KAHN ML, TIMMONS C, TRAM T, COUGHLIN SR. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 1997; 386(6624): 502-6.

KALAFATIS M, SWORDS NA, RAND MD, MANN KG. Membrane-dependent reaction in blood coagulation: role of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Biochemical et Biophysica Acta* 1994; 1227: 113-129.

KAST, B. The best supporting actors. *Nature* 2001; 412: 674-676.

LAW JH, RIBEIRO JM, WELLS MA. Biochemical insights derived from insect diversity. *Annu Rev Biochem* 1992; 61: 87-111.

LEE AY, VLASUK GP. Recombinant nematode anticoagulant protein c2 and other inhibitors targeting blood coagulation factor VIIa/tissue factor. *J Intern Med*. 2003; 254: 313-321.

LONGHI F, LAKS D, KALIL NGN. Trombocitopenia induzida por heparina. *Rev. bras. Hematol. Hemoter*. 2001; 23(2): 93-99.

LOPÉZ JA, KEARON C, LEE AY. Deep venous thrombosis. American Society of Hematology Education Program Book. 2004; 439-56.

LORETO MF, DE MARTINIS M, CORSI MP, MODESTI M, GINALDI L. Coagulation and cancer: implications for diagnosis and management. *Pathol Oncol Res*. 2000; 6(4): 301-12.

MACFARLANE SR, SEATTER MJ, KANKE T, HUNTER GD, PLEVIN R. Proteinase-Activated Receptors. *Pharmacol Rev*. 2001; 53:245-282.

MAHER EA, FURNARI FB, BACHOO RM, ROWITCH DH, LOUIS DN, CAVENEE WK, DEPINHO RA. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes & Dev*. 2001; 15: 1311-1333.

MAIOLO A, TUA A, GRIGNANI G. Hemostasis and cancer: tumor cells induce the expression of tissue factor-like procoagulant activity on endothelial cells. *Haematologica* 2002; 87(6): 624-628.

MANN KG. Biochemistry and Physiology of Blood Coagulation. Thrombosis and Haemostasis 1999; 82(2): 165-174.

MARAGOUDAKIS ME, TSOPANOGLIOU NE, ANDRIOPOULOU P. Mechanism of thrombin-induced angiogenesis. *Biochem Soc Trans*. 2002; 30: 173-177.

MELI R, RASO GM, CICALA C, ESPOSITO E, FIORINO F, CIRINO G. Thrombin and PAR-1 activating peptide increase iNOS expression in cytokine-stimulated C6 glioma cells. *Journal of Neurochemistry* 2001; 79: 556-563.

MILLER CR, PERRY A. Glioblastoma: morphologic and molecular genetic diversity. *Arch Pathol Lab Med*. 2007; 131: 397-406.

MITCHELL, R. N. Disfunções hemodinâmicas, doença tromboembólica e choque. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. (Org.). Robbins & Cotran: patologia. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 125-152.

MONROE DM, HOFFMAN M E ROBERTS HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22(9): 1381-1389.

MONTEIRO RQ, REZAIIE AR, RIBEIRO JM, ET AL. Ixolaris: afactor Xa heparin-binding exosite inhibitor. *Biochem J.* 2005; 387: 871-7.

MONTEIRO RQ. Targeting exosites on blood coagulation proteases. *An Acad Bras Cienc.* 2005; 77: 275-80.

MONTEIRO RQ, REZAIIE AR, BAE, JSRIBEIRO JM, ET AL. Ixolaris: A Factor X Heparin-Binding Proexosite Inhibitor. *Biochem J.* 2007; submetido

MORRIS DR, DING Y, RICKS TK, GULLAPALLI A, WOLFE BL, TREJO J. Protease Activated Receptor-2 Is Essential for Factor VIIa and Xa-Induced Signaling, Migration, and Invasion of Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* 2006; 66(1): 307-314.

NAKASAKI T, WADA H, SHIGEMORI C , MIKI C, GABAZZA EC , NOBORI T , NAKAMURA S, HIROSHI SHIKU H. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *Am J Hematol* 2002; 69(4): 247-54.

NOCTOR SC, FLINT AC, WEISSNAN TA, DAMMERMAN RS & KRIEGESTEIN AR. Neurons derived from radial glia cells establish radial units in neocortex. *Nature* 2001; 409: 714-720.

OHGAKI H, KLEIHUES P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 2005; 109: 93-108.

OHGAKI H, KLEIHUES P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American Journal of Pathology* 2007; 5: 1445-1453.

OTT I, FISCHER EG, MIYAGI Y, MUELLER BM, RUF W. A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. *J Cell Biol.* 1998; 140: 1241-1253.

OTT I, WEIGAND B, MICHL R; SEITZ I, SABBARI-ERFANI N, NEUMANN FJ, SCHÖMIG A. Tissue factor cytoplasmic domain stimulates migration by activation of the GTPase Rac1 and the mitogen-activated protein kinase p38. *Circulation* 2005; 111: 349-55.

PFRIEGER FW, BARRES BA. What`s the fly`s glia tell fly`s brain. *Cell* 1995; 83: 671-674.

- PICCIOLI A, PRANDONI P. Risk of cancer in patients presenting with venous thromboembolism. In: LUGASSY G, FALANGA A, KAKKAR AK, RICKLES FR. *Thrombosis and Cancer*. London, United Kingdom, Taylor and Francis Group. 2004; 99-108.
- PICKERING W, GRAY E, GOODALL AH, RAN S, THORPE PE, BARROWCLIFFE TW. Characterization of the cell-surface procoagulant activity of T-lymphoblastoid cell lines. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2004; 2: 459-467.
- PRINS M, OTTEN HM. Thrombosis and Cancer: a short history of Trousseau's syndrome. In: LUGASSY G, FALANGA A, KAKKAR AK, RICKLES FR. *Thrombosis and Cancer*. London, United Kingdom, Taylor and Francis Group. 2004; 1-10.
- RAK J, MILSOM C, MAY L, KLEMENT P, YU J. Tissue factor in cancer and angiogenesis: the molecular link between genetic tumor progression, tumor neovascularization, and cancer coagulopathy. *Semin Thromb Hemost*. 2006; 32(1): 54-70.
- RAO JS. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: The role of proteases. *Nature Reviews* 2003; 3:489-501.
- RASHEED BK, STENZEL TT, MCLENDON RE, PARSONS R , FRIEDMAN AH, FRIEDMAN HS, BIGNER DD, BIGNER SH. Pten gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. *Cancer Res*. 1997; 57: 4187-90.
- Raza SM, Lang FF, Aggarwal BB, Fuller GN, Wildrick DM, Sawaya R. NECROSIS AND GLIOBLASTOMA: A FRIEND OR A FOE? A REVIEW AND A HYPOTHESIS. *NEUROSURGERY* 2002; 51(1): 1-13.
- REZAIIE AR. (a) Identification of basic residues in the heparin binding exosite of factor Xa critical for heparin and factor Va binding. *J Biol Chem* 2000; 275: 3320-7.
- REZAIIE AR. (b) Heparin-binding exosite of factor Xa. *Trends Cardiovasc Med*. 2000; 10: 333-8.
- RIBEIRO JMC, FRANCISCHETTI IMB. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Ann Rev Entomol*. 2003; 48: 73-88.
- RICHARD DE, VOURET-CRAVIARI V, POUYSSEGUR J. Angiogenesis and G-protein-coupled receptors: signals that bridge the gap. *Oncogene* 2001; 20: 1556-1562.
- RICKLES FR, FALANGA A. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thromb Res*. 2001; 102(6): 215-224.
- RICKLES FR, PATIERNO S, FERNANDEZ PM. Tissue factor, thrombin, and cancer. *Chest*. 2003; 124(3 Suppl): 58S-68S.

RONG Y, DURDEN DL, MEIR EGV, BRAT DJ. Pseudopalisading` Necrosis in Glioblastoma: A Familiar Morphologic Feature That Links Vascular Pathology, Hypoxia, and Angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neuro*. 2006; 65(6): 529-539.

RONG Y, POST DE, PIEPER RO, DURDEN DL, MEIR EGV, BRAT DJ. PTEN and Hypoxia Regulate Tissue Factor Expression and Plasma Coagulation by Glioblastoma. *Cancer Res*. 2005; 65:(4) 1406-1413.

ROSSI C, HESS S, ECKL RW, LENA AD, BRUNO A, THOMAS O, POGGI A. Effect of MCM09, an active site-directed inhibitor of factor Xa, on B16-BL6 melanoma lung colonies in mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006; 4: 608-613.

SETO S, ONODERA H, KAIDO T, YOSHIKAWA A, ISHIGAMI S, ARII S, IMAMURA M. Tissue factor expression in human colorectal carcinoma: correlation with hepatic metastasis and impact on prognosis. *Cancer* 2000; 88: 295-301.

SHEEHAN JP, SADLER JE. Molecular mapping of the heparin-binding exosite of thrombin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 5518-22.

SHOJI M, HANCOCK WW, ABE K, MICKO C, CASPER KA, BAINE RM, WILCOX JN, DANAVE I, DILLEHAY DL, MATTHEWS E, CONTRINO J, MORRISSEY JH, GORDON S, EDGINGTON TS, KUDRYK B, D. L. KREUTZER DL, RICKLES FR. Activation of coagulation and angiogenesis in cancer: immunohistochemical localization in situ of clotting proteins and vascular endothelial growth factor in human cancer. *Am J Pathol*. 1998; 152(2): 399-411.

SOLUM NO. Procoagulant expression in platelets and defects leading to clinical disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19(12): 2841-2846.

STONE SR, MARAGANORE JM. Hirudin interactions with thrombin. In: Thrombin. Structure and function. (Ed. Berliner, L.J.), *Plenum Press, New York, USA* 1992, pgs.219 - 256.

SUGIMURA M, DONATO R, KAKKAR VV, SCULLY MF. Annexin V as a probe of the contribution of anionic phospholipids to the procoagulant activity of tumour cell surfaces. *Blood coagul Fibrinolysi*. 1994; 5(3):365-73.

TSOPANOGLOU NE, PIPILI-SYNETOS E, MARAGOUDAKIS ME. Thrombin promotes angiogenesis by a mechanism independent of fibrin formation. *Am J Physiol*. 1993; 264: C1302 - C1307.

TSOPANOGLOU NE, MARAGOUDAKIS ME. On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis. Potentiation of vascular endothelial growth factor activity on endothelial cells by up-regulation of its receptors. *J Biol Chem* 1999; 274: 23969-23976.

VERSTEEG HH, PEPPELENBOSCH MP, SPEK CA. Tissue factor signal transduction in angiogenesis. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1009-13.

VERSTEEG HH, SPEK CA, PEPPELENBOSCH MP, RICHEL DJ. Tissue factor and cancer metastasis: the role of intracellular and extracellular signaling pathways. *Mol Med.* 2004; 10: 6-11.

VOGEL TW, ZHUANG Z, LI J, OKAMOTO H, FURUTA M, LEE YO, ZENG W, OLDFIELD EH, VORTMEYER AO, WEIL RJ. Proteins and protein pattern differences between glioma cell lines and glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(10): 3624-3632.

VU TK, HUNG DT, WHEATON VI, COUGHLIN SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 1991; 22; 64(6): 1057-68.

WATKINS D, RUTTLEDGE MH, SARRAZIN J, RANGARATNAM S, POISSON M, DELATTRE J, ROULEAU GA. Loss of heterozygosity on chromosome 22 in human gliomas does not inactivate the neurofibromatosis type 2 gene. *Cancer Genet Cytogenet.* 1996; 92(1):73-8.

ZAGZAG D, LUKYANOV Y, LILAN, ALI MA,² ESENCAY M, MENDEZ O, YEE H, VOURA E, NEWCOMB EW. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Laboratory Investigation* 2006; 86: 1221-1232.

ZHANG Y, DENG Y, LUTHER T, MULLER M, ZIEGLER R, WALDHERR R, STERN DM, NAWROTH PP. Tissue Factor Controls the Balance of Angiogenic and Antiangiogenic Properties of Tumor Cells in Mice. *J. Clin. Invest.* 1994; 94: 1320-1327.

ZIEGER M, TAUSCH S, HENKLEIN P, NOWAK G, KAUFMANN R. A novel PAR-1-type thrombin receptor signaling pathway: cyclic AMP-independent activation of PKA in SNB-19 glioblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 13(282): 952-957.

ZWAAL RF, Comfurius P, Bevers EM. Lipid-protein interactions in blood coagulation. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1376(3): 433-453.

ZWICKER JI, FURIE BC, FURIE B. Cancer-associated thrombosis. *Oncology/Hematology* 2007; xxx xxx-xxx.

YAMAHATA H, TAKESHIMA H, JUN-ICHI KURATSU, KRISHNA PADA SARKER KP, TANIOKA K, WAKIMARU N, NAKATA M, KITAJIMA I, MARUYAMA I. The role of thrombin in the neo-vascularization of malignant gliomas: An intrinsic modulator for the up-regulation of vascular endothelial growth factor. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY* 2002; 20: 921-928.

YU JL, MAY L, LHOTAK V, SHAHRZAD S, SHIRASAWAS S, WEITZ JI, COOMBER BL, MACKMAN N, RAK JW. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: Implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood* 2005; 105: 1734-41.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)