

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



Morgana Guimarães Soares

**EFEITO DO ANTICOAGULANTE IXOLARIS NO
CRESCIMENTO TUMORAL DE GLIOMAS
HUMANOS IMPLANTADOS EM ENCÉFALO DE
ROEDORES**

**Rio de Janeiro
Agosto de 2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Morgana Guimarães Soares

**EFEITO DO ANTICOAGULANTE IXOLARIS NO
CRESCIMENTO TUMORAL DE GLIOMAS
HUMANOS IMPLANTADOS EM ENCÉFALO DE
ROEDORES**

Tese de mestrado submetida ao Instituto de Bioquímica Médica da
Universidade federal do Rio de Janeiro, visando ao grau de mestre em
Química Biológica.

Orientador: Robson Q. Monteiro

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

Co-orientador: Sandra Konig

Profa. Adjunta do Departamento de Anatomia/CCS/UFRJ

**Rio de Janeiro
Agosto de 2009**

Ficha Catalográfica

Guimarães-Soares, Morgana

Efeito do anticoagulante Ixolaris no crescimento tumoral de gliomas humanos implantados em encéfalo de roedores/ Morgana Guimarães Soares. Rio de Janeiro, 2009.

Tese (Mestrado em Química Biológica)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica- CCS,2009.

Orientador: Robson Queiroz Monteiro

Co-orientador: Sandra Konig

1. Palavras chave: câncer, glioblastoma multiforme, células tumorais, fator tecidual, ixolaris, coagulação sanguínea

EFEITO DO ANTICOAGULANTE IXOLARIS NO CRESCIMENTO TUMORAL DE GLIOMAS HUMANOS IMPLANTADOS EM ENCÉFALO DE ROEDORES

Morgana Guimarães Soares

Tese submetida ao Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química Biológica.

Aprovada por:

Examinador: Jane Cristina de Faria Amaral
Título mais elevado: Doutorado (2005)
Local de obtenção do título: Depto de Anatomia / ICB/ UFRJ
Local atual de trabalho: Prof. Adjunto do Instituto de Ciências Biomédicas / UFRJ

Nome do Examinador: Paulo de Assis Melo
Título mais elevado: Doutorado (1992)
Local de obtenção do título: Depto de Farmacologia Básica e Clínica / ICB/ UFRJ
Local atual de trabalho: Prof. Adjunto do Instituto de Ciências Biomédicas / UFRJ

Nome do Examinador: Aurélio Vicente Graça Souza
Título mais elevado: Doutorado (2001)
Local de obtenção do título: Depto de Bioquímica Médica / UFRJ
Local atual de trabalho: Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica / UFRJ

Revisor e suplente interno: Vivian Mary B. D. Rumjanek
Título mais elevado: Doutorado (1976)
Local de obtenção do título: University of London, Inglaterra
Local atual de trabalho: Prof. Titular do Instituto de Bioquímica Médica / UFRJ

Suplente Externo: Tatiana Lobo Coelho de Sampaio
Título mais elevado: Doutorado (1992)
Local de obtenção do título: Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ
Local atual de trabalho: Prof. Adjunto do Instituto de Ciências Biomédicas / UFRJ

Orientador: Robson de Queiroz Monteiro
Título mais elevado: Doutorado (2001)
Local de obtenção do título: Depto de Bioquímica Médica / UFRJ
Local atual de trabalho: Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica / UFRJ

Co-orientador: Sandra Konig
Título mais elevado: Doutorado (2000)
Local de obtenção do título: Université de Paris XI (Paris-Sud), França
Local atual de trabalho: Prof. Adjunto do Instituto de Ciências Biomédicas / UFRJ

**Rio de Janeiro
Agosto de 2009**

Dedico esta tese à minha mãe Lídia Cezar Guimarães,
meu anjo e grande incentivadora de todos os meus sonhos e à minha
bisavó Maria Sabóia Uchôa, *in memoriam*.

Eu vim para que todos tenham vida, que todos tenham vida plenamente.

Jesus Cristo.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Deus por ter me mostrado que os obstáculos existem para serem ultrapassados.

Agradeço à minha mãe Lidia Cezar Guimarães, pois ela sempre esteve comigo me apoiando e sendo também o meu refúgio nos momentos em que tudo parecia ser impossível.

Agradeço e terei uma eterna gratidão ao meu orientador Robson Q. Monteiro, por ter acreditado em mim desde o primeiro momento em que estive no laboratório me candidatando para ser a sua aluna. Tenho muito orgulho de ter trabalhado contigo!

À professora Sandra Konig, que me ensinou a lidar com os animais e por me ensinar a trabalhar de maneira organizada. Agradeço também pelo espaço que sempre tive para trabalhar no Laboratório Fronteiras de Neurociências/ICB/CCS/UFRJ.

À professora Vivian M. Rumjanek, professora Titular do Instituto de Bioquímica Médica/CCS/UFRJ, por ter aceitado revisar este trabalho.

À aluna de doutorado do Laboratório de Hemostase e Venenos, Tatiana Correia Lobo, por ajudar na concretização deste trabalho.

Ao estagiário Gabriel Ferraz do Laboratório Fronteiras de Neurociências por ter me ajudado com meus experimentos

Ao meu grande amigo Thiago Luiz Coutinho Barros, que mesmo sem entender do meu trabalho foi o meu incentivador e estava comigo no fundão nos dias de domingo me ajudando a realizar meus experimentos. Obrigada também pelo carinho e amor a mim dedicados.

Aos animais que foram utilizados nos experimentos deste trabalho.

Às minhas colegas de laboratório de Hemóstase de Venenos: Andréia, Angeliquinha, Andréa, Daniella, Luize, Saulo, Mayara, Nathália, Juliana, Diego, Fabiana, Dione e Raquel. Quero dizer que todos vocês contribuíram muito para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus colegas de Laboratório Fronteiras de Neurociências, do ICB/CCS/UFRJ: Aline, Carol, Carlomango, Fábio, Gabriel, Marco, Max, Patrícia e Thelma. Obrigada pela convivência maravilhosa que tive com todos vocês!

Ao professor Jean Christophe, professor adjunto do ICB/CCS/UFRJ, pelas sugestões valiosas que sempre me ajudaram bastante com meus experimentos e também pela convivência que foi ótima.

Ao bioterista Adiel do ICB/CCS/UFRJ, por ter sido sempre solícito aos meus pedidos de ajuda com os animais.

À professora Russolina Zingali, que cedeu o espaço de seu Laboratório de Hemostase e Venenos para os meus experimentos.

Aos meus amigos, Aldo, Ana Cláudia, Andréa, Angélica, Daniella, Elizabeth, Giresse, Leonardo, Marisa, Mônica, Mariane (mais conhecida como Marico). Amo vocês!

Lista de Figuras

Figura 1: Representação de células gliais e gliomas	2
Figura 2: Características histopatológicas do glioblastoma multiforme	3
Figura 3: Armand Trousseau (1801-1867)	4
Figura 4: Fatores da Coagulação sanguínea	7
Figura 5: Papel da hipercoagulabilidade no glioblastoma	10
Figura 6: Estrutura do TFPI.....	12
Figura 7: Estrutura do Ixolaris	13
Figura 8: Linhagem de glioblastoma humano U87-MG	20
Figura 9: Aparelho estereotáxico.....	22
Figura 10: Crânio de camundongo- suturas e bregma	23
Figura 11: Coordenadas estereotáxicas para implantação das células tumorais	24
Figura 12: Modelo de implantação estereotáxica de células tumorais da linhagem de glioblastoma humano U87 no encéfalo de rato.....	30
Figura 13: Sobrevida dos ratos com tumor cerebral em resposta ao tratamento com Ixolaris.	31
Figura 14: Sobrevida dos camundongos após implantação intracerebral de células tumorais U87.	34
Figura 15: Modelo de implantação estereotáxica de células tumorais da linhagem de glioblastoma humano U87 no encéfalo de camundongos	35
Figura 16: Sobrevida dos camundongos com tumor cerebral em resposta ao tratamento com Ixolaris.	36

Abreviaturas

bFGF - fator de crescimento básico de fibroblastos

DAPI- 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride

GBM- Glioblastoma Multiforme

OMS- Organização Mundial de Saúde

NAPC2- Recombinant namatode anticoagulant protein c2

PAR- receptores ativados por proteases (protease activated receptors)

TF- fator tecidual (tissue factor)

TFPI - inibidor da via do fator tecidual (tissue factor pathway inhibitor)

VEGF- fator de crescimento do endotélio vascular (vascular endothelial growth factor)

VTE- tromboembolismo venoso (venous tromboembolism)

Resumo

Evidências mostrando o envolvimento de proteínas da coagulação sanguínea na biologia tumoral têm servido como base para propor a utilização de moléculas anti-hemostáticas, em particular os anticoagulantes, como possíveis agentes terapêuticos para auxiliar o tratamento do câncer. Os gliomas, tumores primários do sistema nervoso central, são comumente associados a estados de hipercoagulação, sugerindo-se que os mecanismos vaso-oclusivos e pró-trombóticos sejam fortemente relacionados ao crescimento acelerado do glioblastoma, a forma mais maligna dos gliomas (OMS grau IV). De fato, 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 e a presença de trombos vaso-oclusivos é mais frequente no glioblastoma. Dados preliminares obtidos no laboratório mostraram que a linhagem celular de glioblastoma humano U87-MG, que apresenta uma potente atividade pró-coagulante, resulta na formação de um tumor quando inoculada subcutaneamente em camundongos nude. Esse crescimento tumoral *in vivo* foi inibido em resposta ao tratamento dos camundongos com Ixolaris (250 μ g/kg/dia), um potente inibidor exógeno da coagulação sanguínea. Neste contexto, o presente estudo teve como linha principal de investigação avaliar se o efeito do Ixolaris se estenderia ao modelo ortotópico de glioblastoma, isto é, após a implantação intracerebral de células tumorais. Nossos objetivos nesse trabalho foram: 1- Estabelecer um modelo *in vivo* ortotópico de implantação estereotáxica de células da linhagem humana de glioblastoma U87-MG no encéfalo de ratos e camundongos, que reproduza as características do glioblastoma original; 2- Avaliar o efeito do Ixolaris na sobrevida desses animais. Os nossos resultados mostraram a evolução fatal de cerca de 60% dos camundongos inoculados com células tumorais U87-MG, apresentando uma média de sobrevida de 39,5 dias pós-cirurgia. Um aumento relevante da sua sobrevida foi observado em resposta ao tratamento dos animais com Ixolaris na dose de 250 μ g/kg/dia, com mais de 88% dos animais vivos até o

final do experimento (16/18). Assim concluímos que o Ixolaris pode ser um agente promissor no tratamento do glioblastoma humano.

Abstract

There are evidences of proteins involved in blood coagulation at tumoral biology and they have been used as the base to propose the utilization of anti-homeostatic molecules, particularly the anticoagulants that could possibly be used as therapeutic agents to help cancer treatment. Gliomas (primary tumors of the central nervous system) are commonly associated with states of hypercoagulation, and it is suggested that the mechanisms of obstruction and protrombosis in vessels are ultimately related to the fast glioblastoma growth which is the highest type of malignant glioma (OMS degree IV). In fact, the expression levels of tissue factor (TF), which is the protein responsible for the onset of blood clot reaction, are strongly correlated with the histological degree of gliomas malignancy, and the occurrence of occlusive vessels clot is more frequent in glioblastomas. Previous data obtained in our lab show that the human glioblastoma cell lineage U87-MG, which present a previous clot potential activity, result in tumor formation when injected in nude mice subcutaneously. This tumor growth in vivo was inhibited as a response to the treatment with Ixolaris (250 μ k/kg/ day) in mice. Ixolaris are a potent exogenous inhibitor of blood coagulation. In this issue, the present study assessed whether the Ixolaris effect would be close to the orthotopic model of glioblastoma, in other words, after the intracranial surgery with the injection of tumor cells. Our objectives at this work were: 1- Establish an orthotopic model of stereotaxic implementation in vivo with cells of the human glioblastoma lineage U87 in rats and mice encephalus that could simulate the same characteristics of the original glioblastoma; 2- Assess the effect of Ixolaris in the animals survival. Our results show that the fatal evolution that was around 60% in the mice injected with tumor cells U87-MG presenting a survival average of 39,5 days after surgery. It was observed a relevant increase in the animals survival as a response to the treatment with Ixolaris at the dose of 250 μ g/kg/day, and more than 88% of the animals were alive until the end of the experiment (16/18). Thus, we suggest that Ixolaris maybe a promising agent in treatment against human glioblastoma.

Sumário

Agradecimentos	vii
Lista de figuras	ix
Abreviaturas	x
Resumo	xi
Abstract	xii
1. Introdução	
1.1. Gliomas	2
1.2. A correlação entre câncer e coagulação sanguíneo	4
1.3. Células tumorais e sua atividade pró-coagulante.....	6
1.4. O Glioblastoma Multiforme e a Coagulação sanguínea	10
1.5. Terapias anticoagulantes no câncer.....	11
2. Objetivos	
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. Material e Métodos	
3.1. Purificação do Ixolaris	18
3.1.1. Sistema de produção do Ixolaris	18
3.1.2. Purificação sobre coluna FX-sepharose	18
3.1.3. Quantificação do Ixolaris purificado	18
3.1.4. Teste de atividade	19

3.2. Implantação estereotóxica das células tumorais humanas no encéfalo de roedores.	19
3.2.1. Animais experimentais.....	19
3.2.2. Linhagem celular de glioblastoma humano U87-MG.....	20
3.2.3. Cultura e preparação das células U87-MG.....	20
3.2.4. Instalação dos animais no aparelho estereotáxico	21
3.2.5. Cirurgia de implantação das células tumorais	22
3.2.6. Tratamento dos animais com Ixolaris	24
3.2.7. Análise da sobrevivência dos animais	24
3.3. Análise histológica por coloração com hematoxilina-eosina (HE).	24
3.3.1. Coleta e fixação do tecido encefálico	24
3.3.2. Procedimento de inclusão em parafina.....	25
3.3.3. Preparação de lâminas no micrótomo	25
3.3.4. Coloração hematoxilina-eosina (HE)	25
3.3.5. Aquisição de imagens e montagem.....	26
4.0. Resultados	
4.1. O modelo de implantação estereotóxica de células U87-MG no encéfalo de ratos adultos.....	29
4.2. Sobrevivência dos ratos com tumores cerebrais em resposta ao tratamento com Ixolaris.....	30
4.4. Estabelecimento do modelo de implantação estereotóxica de células U87-MG no encéfalo de camundongos adultos.	33
4.5. Sobrevivência dos camundongos com tumores cerebrais em resposta ao tratamento com Ixolaris	35

5.0. Discussão

6.0. Referências Bibliográficas

1. Introdução

1.1 - Gliomas

Os tumores do sistema nervoso central 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 (RAO, 2003) (figura 1) e representam cerca de 40% de todos os tumores primários e cerca de 80% dos tumores malignos do sistema nervoso central.

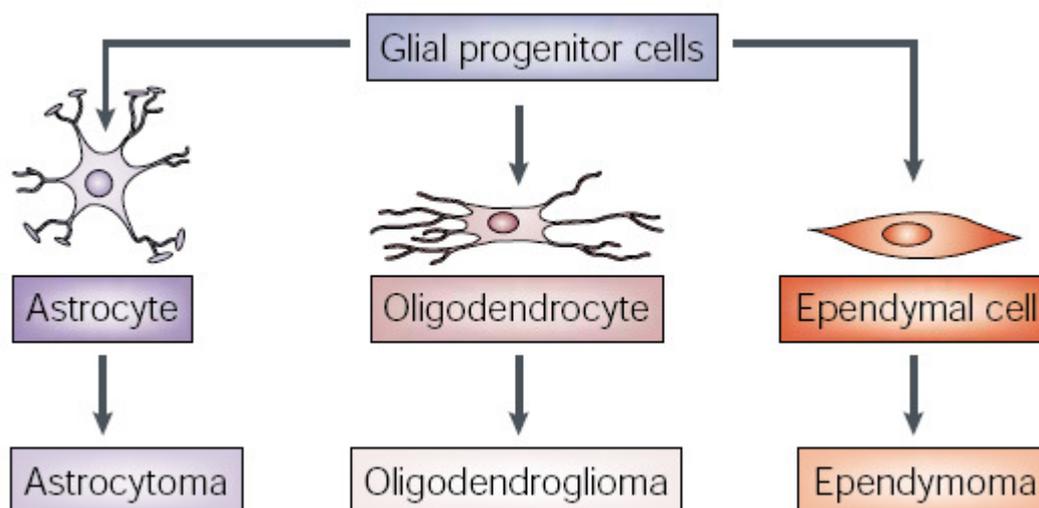


Figura 1: Representação de células gliais e gliomas (RAO, 2003)

Estes tumores exibem formas benignas e malignas cujo diagnóstico é geralmente elaborado com a ajuda da classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) (KLEIHUES e CAVANEE, 2000; LOUIS, 2007). Esta classificação, baseada na observação do tipo citológico predominante, utiliza

em parte os quatro critérios histológicos “não específicos” descritos na classificação “Sainte-Anne/ Mayo-Clinic” (DAUMAS-DUPORT, 1988): atipias nucleares, mitoses, proliferação endotelial e necrose. Ela reconhece quatro graus de magnitude entre os tumores de tipo citológico astrocitário, classificados em escala de I a IV, no sentido menos agressivo para o de maior grau de agressividade, conforme apresentado na tabela abaixo.

Grau OMS	Designação OMS	Características histológicas
I	Astrocitomas pilocíticos	-----
II	Astrocitomas fibrilares, protoplásmicos	1 critério: atipias nucleares
III	Astrocitomas anaplásicos	2 critérios: atipias nucleares e mitoses
IV	Glioblastomas multiformes	3 critérios: atipias nucleares, mitoses e proliferação endotelial e/ou necrose.

Contudo, estudos revelaram grandes discrepâncias entre diagnósticos elaborados por diferentes especialistas em neuropatologia e pior, entre os diagnósticos elaborados por um único patologista examinando as mesmas preparações histológicas, porém com algumas semanas de intervalo (MITTLER, 1996), tornando a classificação dos gliomas um assunto controverso (SCHIFFER, 1997).

Esta classificação da OMS é atualmente criticada pelo Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Sainte-Anne (Paris, França) que censura o fato dela não considerar duas das mais importantes características destes tumores: a heterogeneidade e a capacidade invasiva. Este serviço propõe uma classificação e um método de interpretação dos tumores muito diferentes da OMS. Eles são elaborados com a ajuda das informações obtidas a partir das

biópsias em níveis e então baseadas nas imagens de scanner ou IRM. A classificação do Hospital Sainte-Anne distingue entre os gliomas ordinários do adulto somente três categorias histológicas (DAUMAS-DUPORT, 2000):

- os oligodendrogliomas ou oligo-astrocitomas de grau A.
- os oligodendrogliomas ou oligo-astrocitomas de grau B.
- os glioblastomas.

Contudo, as classificações da OMS e do Hospital Sainte-Anne convergem no que diz respeito às características que permitem de diferenciar a forma mais altamente maligna, o glioblastoma (GBM), dos gliomas de menor grau (figura 2), facilitando o seu diagnóstico. Entre essas, destacam-se características histopatológicas, tais a presença de células com um arranjo peculiar, que envolvem os focos necróticos, denominadas de “pseudopaliçada”, e a hiperplasia microvascular (BRAT e MAPSTONE, 2003; RONG e col., 2006).

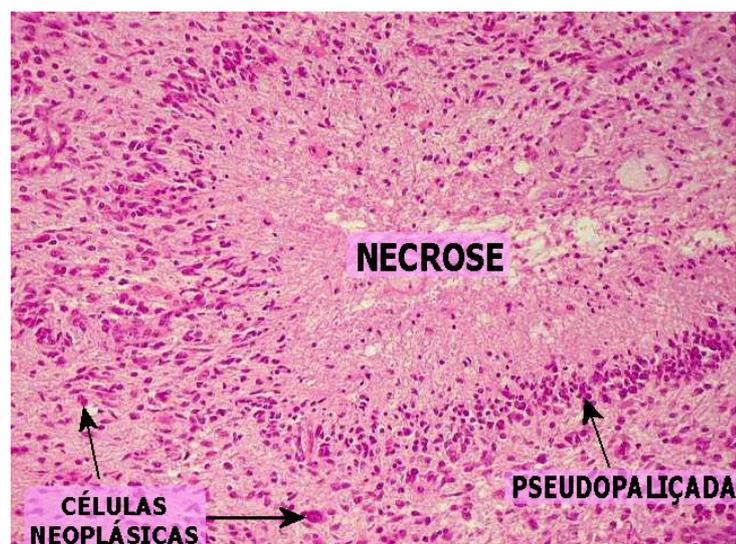


Figura 2: Características histopatológicas do glioblastoma multiforme (GBM, glioma de grau IV de acordo com a OMS). (Adaptado de RONG, 2006)

Essas características ilustram a alta agressividade dessa neoplasia da substância branca do sistema nervoso central (VANDENBERG, 1992; LOUIS, 2007), que, apesar de raramente estabelecer metástases fora desse órgão vital, é altamente invasiva no parênquima nervoso adjacente (HOLLAND, 2000). Esse fenótipo invasivo da-lhe um caráter difuso, não removível cirurgicamente, sendo responsável pela recorrência do tumor após excisão cirúrgica radical (KELLY, 1987; CHICOINE, 1995). Por esta razão, o glioblastoma geralmente escapa a qualquer tratamento cirúrgico, químico ou radioterápico, sendo freqüentemente fatal. A sobrevida média dos pacientes diagnosticados com este tipo de tumor é geralmente inferior a doze meses (DeANGELIS, 2001; BUCKNER, 2003; STUPP, 2005).

1.2 A correlação entre câncer e coagulação sanguínea

Alterações no processo de coagulação sanguínea em pacientes com câncer já são conhecidas há mais de um século (RICKLES e EDWARDS, 1983; BOCCACCIO e MEDICO, 2006), tendo sido descritas pela primeira vez pelo clínico francês Armand Trousseau (figura 3). De fato, Trousseau demonstrou que a presença de tumores malignos se correlaciona com uma hiperatividade do sistema de coagulação, sendo esta associação atualmente denominada como “síndrome de Trousseau” (VARKI, 2007).



Figura 3: Armand Trousseau (1801-1867)

FONTE: www.nlm.nih.gov/.../Faces_asthma/VIIA37.html

Eventos trombóticos em pacientes com doenças malignas incluem desordens venosas ou arteriais, sendo a principal complicação clínica e a segunda causa de morte nesses indivíduos (PAVIC e col., 2006). Os principais

determinantes para um maior risco de trombose em pacientes com câncer são: o tipo de tumor, a presença de metástases, terapia antitumoral e processos cirúrgicos, além de fatores de risco clássicos, tais como imobilidade, idade e anormalidades pró-trombóticas de origem genética (LIP e col., 2002).

Apesar de praticamente todas as neoplasias já terem sido associadas às manifestações trombóticas, o risco relativo varia de acordo com o tipo de tumor. Desta forma, alguns estudos demonstram que os tipos de câncer mais propensos à ocorrência de trombose incluem as doenças malignas hematológicas (linfomas e leucemias), tumores de pâncreas e tumores cerebrais, seguidos de perto por tumores de pulmão, além de tumores de fígado, estômago, bexiga, útero e rins (BLOM e col., 2006; WHITE e col., 2007).

É importante ressaltar que as evidências que suportam a relação entre trombose e neoplasia não se restringem apenas à incidência de eventos trombóticos em pacientes com câncer (PICCIOLI & PRANDONI, 2004), e vice-versa, mas também ao fato de que estes pacientes têm uma evolução clínica na qual a neoplasia tem um comportamento mais agressivo do que aqueles que não apresentaram fenômenos de trombose (SØRENSEN e col., 2003). Desta forma, o evento trombótico poderia ser um marcador de agressividade do tumor.

1.3 - Células tumorais e sua atividade pró-coagulante

A patogênese do tromboembolismo venoso 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 (DE CICCIO, 2004).

O processo de coagulação *in vivo*, em condições de dano vascular, é iniciado pela exposição do Fator Tecidual (TF), uma proteína transmembranar de 47 kDa constitutivamente expressa na superfície de células sub-endoteliais e alguns tecidos extra-vasculares (BROZE, 1995). Fisiologicamente, o TF é encontrado em fibroblastos subjacentes ao endotélio vascular, em queratócitos, células epiteliais do trato respiratório e do trato gastrointestinal, no cérebro, em células musculares cardíacas e nos glomérulos renais (FRANCO, 2001; FERNANDEZ e col., 2004). O contato de componentes plasmáticos com tecidos que a expressam, possibilita que esta proteína interaja com o fator VIIa, uma serino-protease, formando o complexo tenase extrínseco (MANN, 1999). Este complexo converte o zimogênio fator X em uma serino-protease ativa, o fator Xa. Este se dissocia do complexo tenase e se associa ao cofator protéico fator Va, íons cálcio e superfícies celulares ricas em fosfolípídeos aniônicos, especialmente a fosfatidilserina, para formar o complexo protrombinase, que ativa o zimogênio protrombina na serino-protease trombina. O complexo tenase extrínseco também converte o zimogênio fator IX na sua forma ativa, fator IXa, que associado ao cofator protéico Fator VIIIa, íons cálcio e fosfolípídeos também catalisa a ativação do fator X (Figura 4). Em condições de lesão vascular, a superfície de plaquetas

ativadas na área de lesão vascular constitui o principal componente lipídico dos complexos tenase intrínseco e protrombinase (MONROE e col., 2002). Neste contexto sabe-se que células tumorais viáveis são capazes de expor fosfatidilserina em sua superfície, o que parece contribuir para a sua ação pró-coagulante (BARROWCLIFFE e col., 2002; FERNANDES e col., 2006).

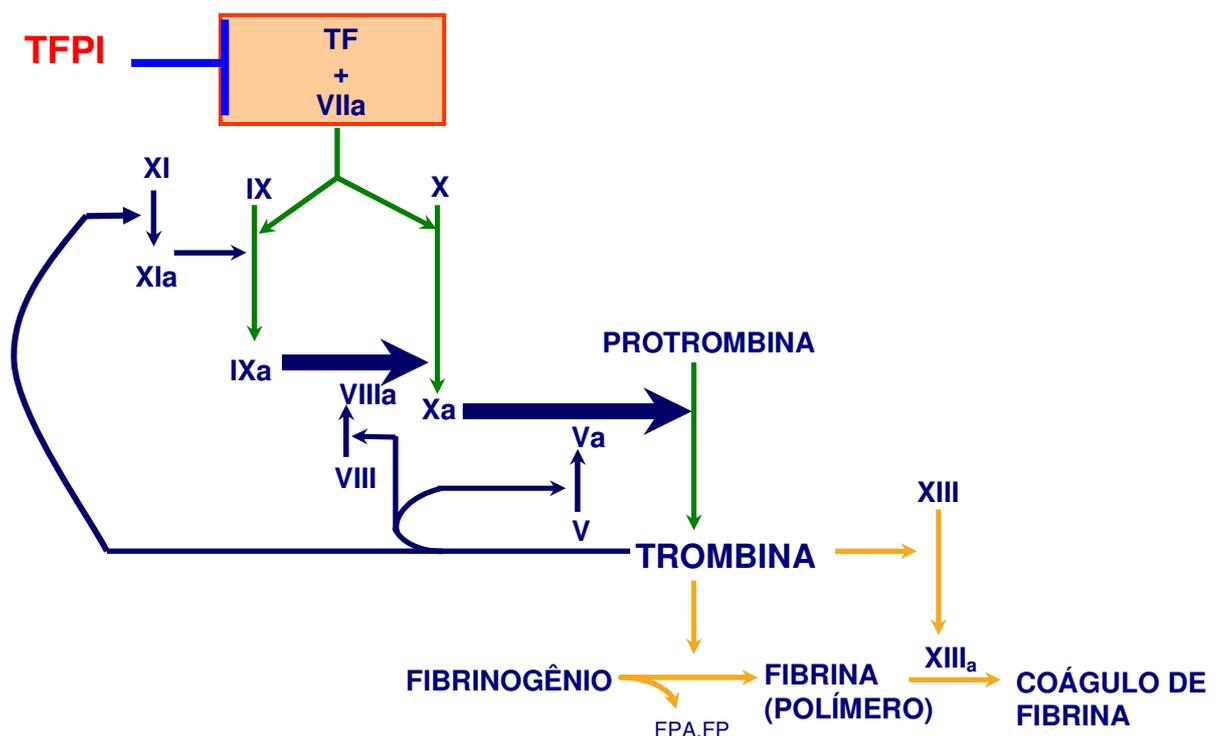


Figura 4: Reações da coagulação sanguínea (Fator Tecidual (TF), inibidor da via do fator tecidual-TFPI).

A expressão aberrante de TF tem sido observada em diversos tipos tumorais, assim como uma forte correlação entre os seus níveis expressão e o grau de malignidade do tumor (GUAN e col, 2002). De fato o TF parece exercer um papel central na correlação entre câncer e coagulação sanguínea (VERSTEEG e col., 2004; RAO & PENDURTHI, 2005; RAK e col., 2006). Além do papel pró-coagulante, o TF possibilita a ativação de receptores de

membrana sensíveis a proteases da coagulação, como o Fator VIIa, Fator Xa e trombina. Estes receptores, denominados PAR (Receptores Ativados por Protease), são expressos em diversos tecidos e estão envolvidos em uma série de fenômenos biológicos de natureza fisiológica ou patológica (SAMBRANO e col., 2001; STHEINHOFF e col., 2005). Os receptores do tipo PAR também estão frequentemente superexpressos em tumores de maior agressividade (EVEN-RAM e col., 1998; HENRIKSON e col., 1999; IKEDA e col., 2003; YIN e col., 2003).

O aumento na expressão de TF e de receptores do tipo PAR, além da geração de enzimas da coagulação sanguínea em tecidos neoplásicos, parece contribuir de várias maneiras para a biologia dos tumores. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que a sinalização intracelular promovida pelo Fator Tecidual e pelos receptores do tipo PAR, em células tumorais e no endotélio, está envolvida com o processo de angiogênese (BELTING e col., 2005). Alguns estudos demonstram uma correlação entre a expressão de Fator Tecidual e a produção de VEGF (fator de crescimento de endotélio vascular), um dos principais fatores pró-angiogênicos conhecidos (CHEN e col., 2001, KONIGSBERG e col., 2001). O VEGF tem múltiplas ações nas células endoteliais, agindo como um mitógeno específico nas veias, artérias e vasos linfáticos (FERRARA e col., 2003). Estes fenômenos parecem estar correlacionados com a sinalização intracelular promovida pelo próprio Fator Tecidual ao se ligar ao fator VIIa (RIEWALD e RUF, 2002, RUF e col., 2003, CHEN e col., 2001, BELTING e col., 2004; MORRIS e col. 2006) e com a sinalização intracelular promovida pelos fatores VIIa e Xa através da proteólise de receptores do tipo PAR-1 e PAR-2 em células tumorais (RIEWALD e RUF,

2002; 2004, BELTING e col., 2005, HJORTOE e col., 2004; MORRIS e col., 2006). Sabe-se também que a clivagem de receptores do tipo PAR-1 aumenta a produção de metaloproteases de matriz (MARAGOUDAKIS e col. 2000).

1.4. O glioblastoma multiforme e a coagulação sanguínea

É sabido que, em humanos, os tumores malignos do sistema nervoso central são comumente associados a estados de hipercoagulação, sendo responsáveis pelo agravamento da doença (ORNSTEIN e col., 2002). De fato, estudos realizados com amostras de pacientes já demonstraram que os níveis de expressão de TF se correlacionam com o grau de malignidade dos gliomas, sendo altamente expresso no GBM (HAMADA e col., 1996; GUAN e col., 2002). Mais recentemente, outro estudo utilizando amostras de pacientes demonstrou que a ocorrência de trombose intratumoral é um evento extremamente freqüente no GBM (TEHRANI e col., 2008). Neste contexto, sugere-se que as propriedades pró-coagulantes do GBM seriam responsáveis por uma vaso-oclusão local capaz de induzir hipóxia e necrose na área do tumor (Figura 5, BRAT & VAN MEIR, 2004).

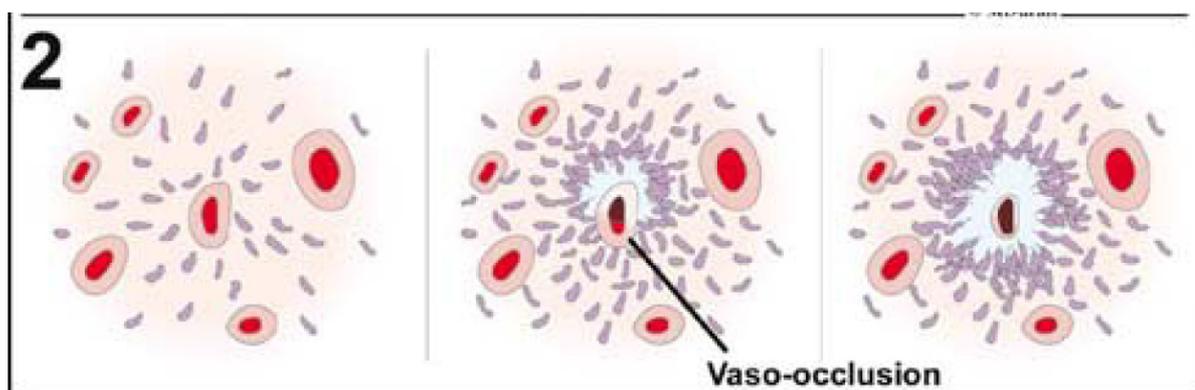


Figura 5: Papel da hipercoagulabilidade no glioblastoma multiforme. FONTE: (BRAT e VAN MEIER, 2004)

1.5 Terapias anticoagulantes no câncer

O envolvimento de proteínas da coagulação sanguínea na biologia tumoral tem servido como base para propor a utilização de moléculas anti-hemostáticas, em particular os anticoagulantes, como possíveis agentes terapêuticos para auxiliar o tratamento do câncer, reduzindo o seu potencial agressivo e metastático. Embora não se preconize um tratamento específico com anticoagulantes, alguns estudos relatam os benefícios das heparinas de baixo peso molecular na evolução de pacientes portadores de neoplasias (LEE, 2008). Adicionalmente, tem sido proposto o uso de anticoagulantes para interferir no papel das proteínas da coagulação na angiogênese e no crescimento tumoral (ZACHARSKI e col., 2005).

O primeiro relato na literatura sobre o efeito de um anticoagulante de origem exógena na biologia tumoral foi feito por ESUMI e col. em 1991. Neste estudo demonstrou-se que a hirudina, um inibidor específico de trombina isolado da sanguessuga *Hirudo medicinalis*, reduz significativamente a ocorrência de metástases em modelo animal experimental. Outros estudos utilizando heparinas de baixo peso molecular em modelos animais também demonstraram uma redução significativa no número de metástases (AMIRKHOSRAVI e col., 2002; BOBEK & KOVARIK, 2004). De fato é bem estabelecida uma relação entre a ativação da coagulação sanguínea e a disseminação tumoral na corrente circulatória (BROMBERG e col., 2001; MUELLER e col., 1992).

Em condições fisiológicas, a atividade do complexo tenase extrínseco é regulada por uma proteína plasmática denominada inibidor da via do fator

tecidual (TFPI). O TFPI apresenta cerca de 43 kDa e possui três domínios do tipo *Kunitz* (Figura 6). O mecanismo de ação do TFPI é bastante singular: seu segundo domínio *Kunitz* se liga ao sítio catalítico do fator Xa e o complexo binário formado interage com o complexo fator VIIa/fator tecidual, onde o primeiro domínio *Kunitz* do TFPI interage diretamente com o sítio catalítico do fator VIIa. O resultado final é a formação de um complexo quaternário onde o fator Xa e o fator VIIa encontram-se inativados (BROZE, 1995). Estudos com modelos animais demonstram que a inibição do Fator Tecidual em células neoplásicas pelo TFPI, bem como o seu análogo exógeno, o NAPc2 (*nematode anticoagulant c2*) (HEMBROUGH e col., 2003), reduz não só a disseminação dos tumores, mas também o crescimento primário em modelos experimentais *in vivo*.

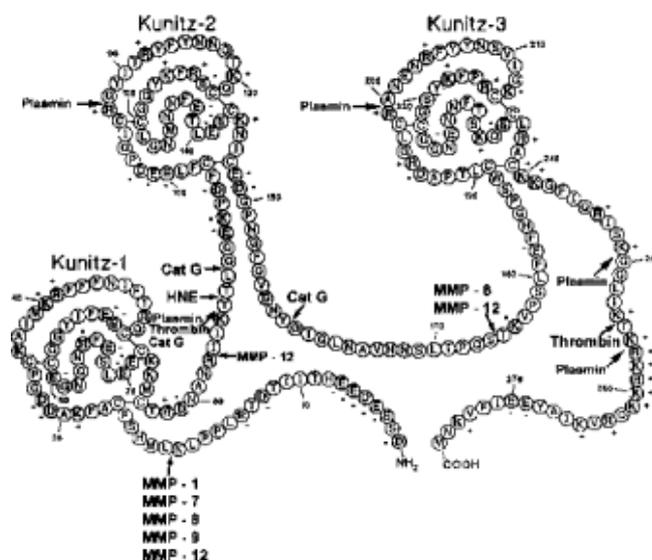


Figura 6: Estrutura do TFPI.

Há alguns anos foi descrita a expressão e a caracterização de um análogo do TFPI denominado Ixolaris, obtido do carrapato *Ixodes scapularis* por técnicas de biologia molecular (FRANCISCHETTI e col., 2002). O Ixolaris (Figura 7) se liga ao fator Xa e posteriormente forma um complexo quaternário com o TF e fator VIIa, resultando na inativação do complexo tenase extrínseco. Diferentemente do TFPI, o Ixolaris interage com uma região do fator Xa denominada exossítio de ligação à heparina. Este fenômeno leva à inibição do fator Xa no complexo protrombinase (MONTEIRO e col., 2005).

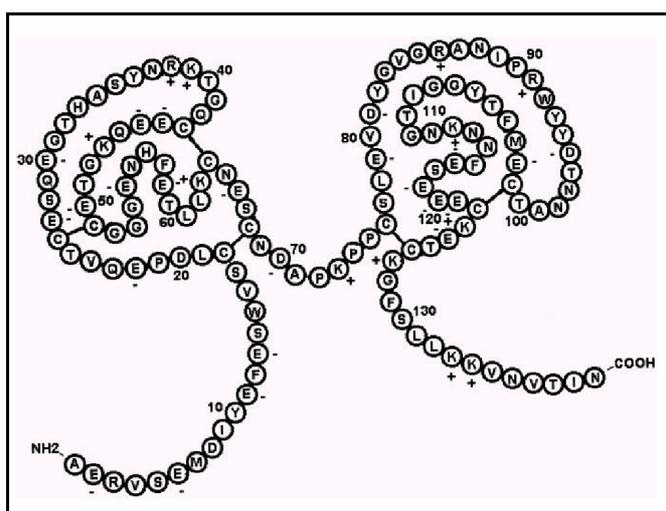


Figura 7: Estrutura do Ixolaris
(www3.niaid.nih.gov/.../vectorBiologySection/)

Dados obtidos por nosso grupo demonstraram que o Ixolaris é um agente antitrombótico eficiente *in vivo*, quando testado em um modelo de trombose venosa em ratos (NAZARETH e col., 2006). De fato, esta proteína apresentou uma atividade na faixa de 100 µg/kg e com meia-vida prolongada, sendo este

efeito antitrombótico mantido até 24h após a administração de uma única dose por via subcutânea.

Além de sua potente atividade antitrombótica, nosso grupo também demonstrou que o Ixolaris é capaz de reduzir o crescimento tumoral *in vivo* de linhagens de melanoma murino (dados não publicados) e de GBM humano, implantado em camundongos *nude* (CARNEIRO-LOBO, 2009). De fato, animais tratados com Ixolaris apresentam uma redução na expressão de VEGF, fenômeno que é acompanhado de tumores subcutâneos menos vascularizados.

Com base nos estudos de BRAT e VAN MEIER, acreditamos que o Ixolaris seja capaz de inibir a formação do complexo extrínseco da cascata de coagulação, reduzindo a atividade pró-coagulante das células tumorais e possivelmente a formação de trombos intratumorais. Como consequência deste fenômeno, a liberação de fatores pró-angiogênicos e a formação de novos vasos no tumor seriam reduzidos pelo Ixolaris. Neste contexto, o presente estudo teve como linha principal de investigação avaliar se o efeito do Ixolaris se estenderia ao modelo ortotópico de GBM, isto é, após a implantação intracerebral de células tumorais.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do Ixolaris, um potente inibidor da coagulação sangüínea, em modelos in vivo de glioblastoma multiforme gerados através da implantação da linhagem humana tumoral U87-MG no encéfalo de roedores adultos.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do Ixolaris na sobrevida de ratos que tenham recebido células U87-MG em seu sistema nervoso central;
- Desenvolver um modelo murino de glioblastoma multiforme com o propósito de utilizar doses mais elevadas de ixolaris nos experimentos de sobrevida;
- Avaliar o efeito do Ixolaris no modelo murino de crescimento intracerebral de U87-MG.

3. Material e Métodos

3.1. Purificação do Ixolaris

3.1.1. Sistema de produção 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 col. (2002). O meio de cultura contendo a proteína recombinante foi disponibilizado na forma congelada, para a subsequente purificação do Ixolaris no laboratório.

3.1.2. Purificação sobre coluna FX-sepharose

Após descongelamento, o meio de cultura contendo a proteína recombinante foi aplicado em uma coluna de afinidade FX acoplado à resina Sepharose 4B (Calbiochem, EUA) montada conforme instruções do fabricante, 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 minutos. O material eluído foi concentrado (Amicon- Bio-separation; ultrafiltration membranes-Millipore) e dialisado *overnight* contra Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5. A pureza do material obtido foi avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.1.3. Quantificação do Ixolaris purificado

A pureza do material obtido, bem como sua possível degradação, foi avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). A concentração da solução após concentração foi obtida por leitura no espectrofotômetro (UV mini 1240) no comprimento de

onda de 280 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção molar = 1,83 (mg/ml, FRANCISCHETTI e col, 2002) .

3.1.4. Teste de atividade anticoagulante

A atividade do Ixolaris purificado foi verificada pela avaliação da sua capacidade de inibir a coagulação do plasma no ensaio de tempo de recalcificação. A medição do tempo de recalcificação na presença de Ixolaris purificado foi efetuada 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) foram misturados com 10 μ l de Ixolaris. Após 2 minutos, foi adicionado 100 μ l de 25 mM CaCl₂ e o tempo necessário para ocorrer a coagulação foi medido.

3.2. Implantação estereotáxica das células tumorais humanas no encéfalo de roedores.

3.2.1. Animais experimentais

Foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar (peso: 290-350g) e camundongos machos adultos da linhagem Swiss (peso:25-35g). Os animais foram criados no biotério do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), no Centro de Ciências da Saúde (CCS), UFRJ. Os procedimentos a eles aplicados seguiram os padrões descritos para o uso de animais de experimentação.

3.2.2. Linhagem celular de glioblastoma humano U87-MG

A linhagem celular de glioblastoma humano U87-MG (figura 8) foi obtida do banco ATCC (American Type Culture Collection) e gentilmente cedida pelo Professor Vivaldo Moura Neto (ICB,UFRJ).

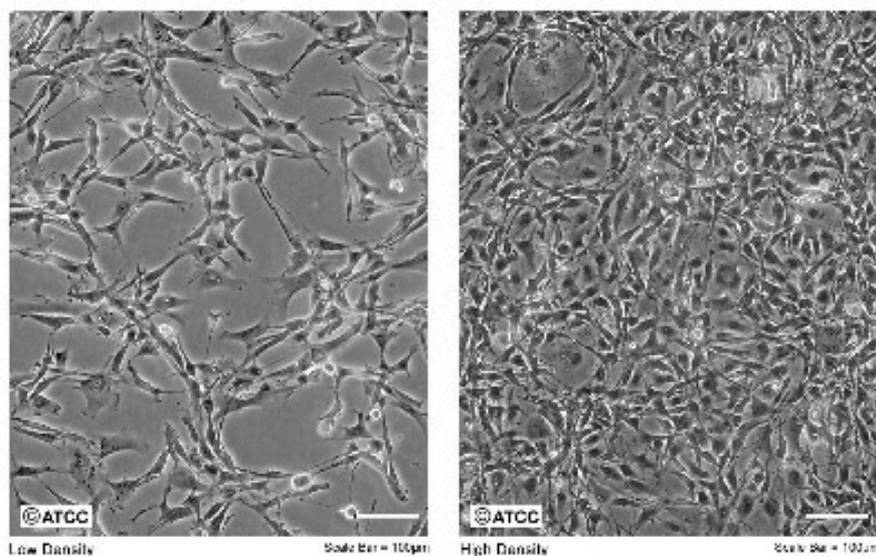


Figura 8: Linhagem de glioblastoma humano U87-MG.

<http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults>.

3.2.3. Cultura e preparação das células U87-MG

As células U87-MG foram mantidas em cultura até a vigésima passagem em meio DMEM-F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino, sendo o meio trocado a cada três dias. O número de alíquotas para cada garrafa de meio de cultura era de 10% do volume total. Para as cirurgias estereotáxicas, as células foram destacadas com tripsina-EDTA, posteriormente inativada com soro fetal bovino, lavadas uma vez em meio DMEM-F12 sem soro e ressuspensas no mesmo na concentração de 10^6 células em 4 µl para as

injeções nos encéfalos de ratos e $0,5 \times 10^6$ em $3 \mu\text{l}$ para as injeções nos encéfalos de camundongos.

3.2.4. Instalação dos animais no aparelho estereotáxico

Os animais foram anestesiados por injeções intramusculares de xilazina (5 mg/kg) e ketamina (100 g/kg). O reflexo de retração da pata traseira foi regularmente testado para avaliar a necessidade de novas injeções anestésicas (meia dose de xilazina/ketamina, separadas por pelo menos 30 minutos) e assim assegurar a dormência completa dos animais ao longo da cirurgia. Os animais foram instalados no aparelho estereotáxico de maneira a fixar sua caixa craniana: duas barras metálicas laterais, previamente recobertas com uma pomada anestésica (xilocaína 5%, lidocaína 50 mg/g Pomada), foram introduzidas nos meatos acústicos e o focinho foi mantido por meio de um bocal fixável na estrutura do estereotáxico.

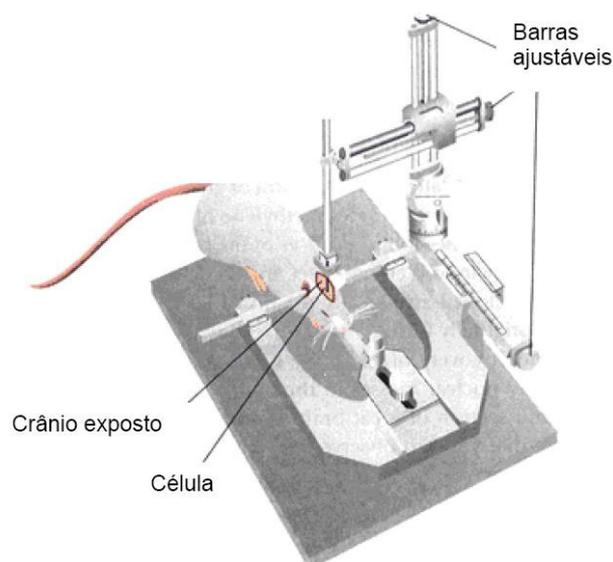


Figura 9: Aparelho estereotáxico

3.2.5. Cirurgia de implantação das células tumorais

Após a fixação do animal no aparelho estereotáxico e a certificação da sua anestesia completa, iniciam-se os procedimentos de cirurgia. Após raspagem dos pelos da parte superior da cabeça e sua higienização com álcool 70%, faz-se uma incisão sagital mediana no couro cabeludo do animal para o alcance da caixa craniana. A intersecção entre as suturas sagital e coronal, o bregma, é marcado e serve como ponto de referência (figura 10).

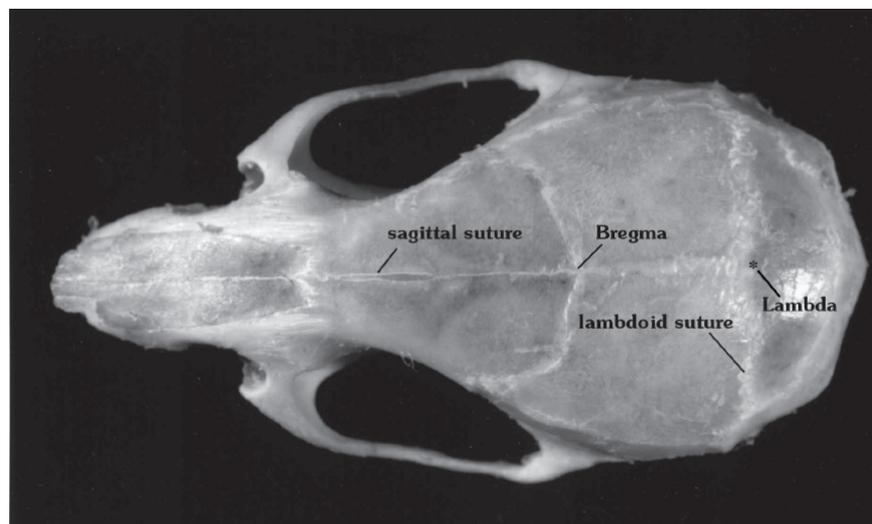


Figura 10: Crânio de camundongo - suturas e bregma.

A estrutura encefálica do caudado-putâmen foi alcançada pelo uso das seguintes coordenadas estereotáxicas: rato/ 0 mm bregma, 3 mm lateral e 4,5 mm de profundidade; camundongos/ 0,5 mm posterior ao bregma, 2 mm lateral e 3 mm de profundidade (figura 11). Uma pequena fenda circular é realizada no osso craniano com ajuda de uma broca odontológica. Em seguida, o uso de um micromanipulador permite a introdução no tecido encefálico do capilar de vidro pertencendo ao sistema de injeção segundo as coordenadas estereotáxicas

animal suturado. Após aplicação de uma pomada antibiótica e antiinflamatória (Nebacetin, Sulfato de neomicina 5 mg/g e Bacitracina 250 ui/g) no local da sutura, o animal é retirado do aparelho estereotáxico e acomodado em sua gaiola de criação.

3.2.6. Tratamento dos animais com Ixolaris

O Ixolaris foi diariamente diluído em tampão PBS para o alcance das concentrações de 50 ou 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ num volume final de injeção de 200 μl . As injeções, por via subcutânea ou intraperitoneal, foram iniciadas três dias após a cirurgia e mantidas por uma duração de 28 dias.

3.2.7. Análise da sobrevida dos animais

A sobrevida dos camundongos e dos ratos foi observada respectivamente nos 100 ou 150 dias após a realização da cirurgia. O peso dos animais foi monitorado duas vezes por semana ao longo de experimento. O tecido encefálico foi sistematicamente coletado no dia da morte no caso de evolução fatal ou após o sacrifício do animal no final do experimento, para a avaliação da presença de massa tumoral macroscópica no hemisfério cerebral de implantação e/ou a sua subsequente análise histológica.

3.3. Análise histológica por coloração com hematoxilina-eosina (HE).

3.3.1. Coleta e fixação do tecido encefálico

Ratos e camundongos foram sacrificados 4 a 5 semanas após implantação das células tumorais. Os animais foram perfundidos com uma solução de 4% de paraformaldeído ou diretamente imersos na mesma solução

fixadora, após dissecação dos encéfalos. Blocos coronais do tecido encefálico foram cortados com aproximadamente 3 mm de espessura e mantidos por 12 horas adicionais na solução de 4% de paraformaldeído.

3.3.2. Procedimento de inclusão em parafina

Após fixação, os blocos foram processados em banhos sucessivos em solução de concentração crescente de etanol para desidratação, antes de serem emblocados em parafina (Easypath Ver-Plast, Parafina histológica ponto de fusão +/-56-58° CEP-21-20061): 30 minutos em etanol 70%, duas vezes 40 minutos em etanol 100%, duas vezes 40 minutos em xileno, duas vezes 40 minutos em banhos de parafina à 60 °C.

3.3.3. Preparação de lâminas no micrótomo

Cortes coronais seriados de 8-12 µm de espessura foram feitos no micrótomo. Estes cortes foram montados em lâminas previamente lavadas e tratadas com Poli-L-lisina (SIGMA P8920, solução 10 vezes concentrada 0,1% w/v com timerosal 0,01%) e mantidos em posição vertical na estufa à 60 °C por uma duração de 6 horas antes de serem processados para coloração histológica.

3.3.4. Coloração hematoxilina-eosina (HE)

Os cortes montados foram desparafinizados em dois banhos sucessivos de xileno e reidratados em soluções de etanol de concentração decrescente, antes de serem corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE) (Easypath-

Hematoxilina de Harris e Eosina Amarelada) para a identificação tumoral e a análise histopatológica.

3.3.5. Aquisição de imagens e montagem

As lâminas foram analisadas no microscópio invertido Nikon TE300. As fatias coronais inteiras de tecido encefálico foram reconstruídas com ajuda do software Adobe Photoshop CS, após aquisição das imagens com uma objetiva de aumento 4X (Nikon 4X/0,13 PhL DL).

4. Resultados

4.1. O modelo de implantação estereotáxica de células U87-MG no encéfalo de ratos adultos.

Estudos revelando a importância das interações tumor-parênquima na biologia tumoral tornaram fundamental o uso de modelos *in vivo* ortotópicos de crescimento tumoral. O estabelecimento de tais modelos é da maior pertinência para o estudo dos gliomas, que se distinguem dos demais tumores sólidos por apresentarem características próprias ao seu desenvolvimento no Sistema Nervoso Central (SNC): são tumores que crescem num órgão vital para o qual a abordagem terapêutica por cirurgia é extremamente delicada, e onde sua expansão é limitada pela caixa craniana e submetida a um contexto imunológico específico.

Assim, estabelecemos no laboratório um modelo de implantação estereotáxica de células da linhagem de glioblastoma humano U87-MG no encéfalo de ratos machos e adultos. O recurso à estereotaxia nos permite, pela escolha de coordenadas cranianas, de alcançar reprodutivelmente a estrutura encefálica do caudado-putâmen (Figura 12A), sítio geralmente escolhido na literatura para a implantação de gliomas (PLUNKETT e col., 1988; LAL e col., 2000; PARSAN e col., 2000; GUILLAMO e col, 2001; CHUNG e col.,2005). A evolução fatal de animais implantados com um milhão de células U87-MG foi observada desde a quarta semana pós-implantação. Nesta etapa, o crescimento tumoral foi evidenciado pela observação macroscópica de uma imponente massa tumoral no hemisfério cerebral de implantação (figura 12 B). A coloração do tecido encefálico com hematoxilina/eosina (HE) nos permitiu de observar as características histológicas do tumor em desenvolvimento, revelando a presença de áreas de hemorragias, de numerosos vasos de

grande calibre e, sobretudo, de áreas de necrose envoltas por células tumorais organizadas em pseudopaliçadas (figura 12C e 12D). Essas características constituem os principais critérios utilizados pela OMS para o diagnóstico dos gliomas de grau IV, GBM, atestando a pertinência do modelo estabelecido.

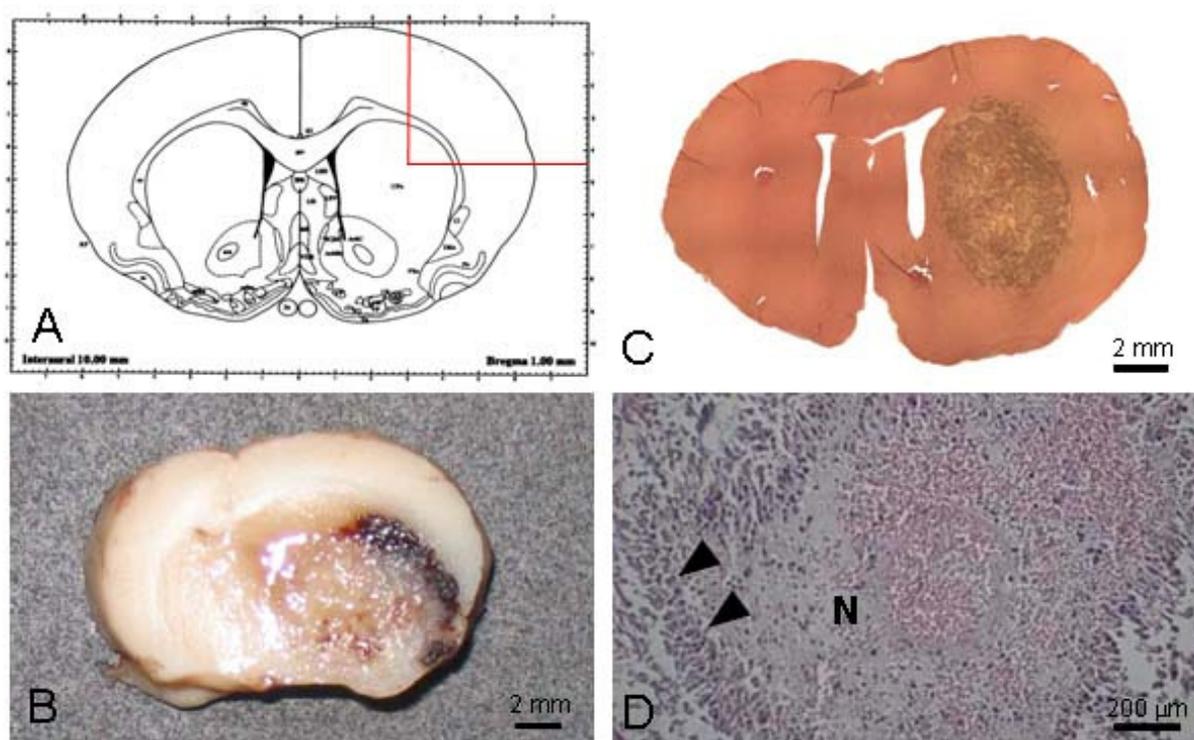
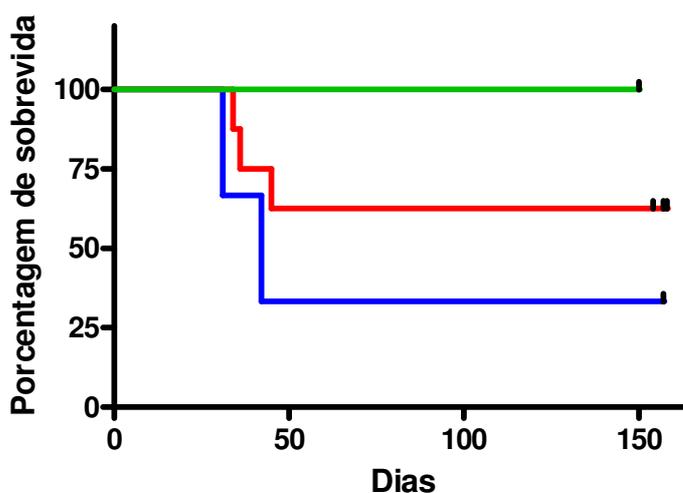


Figura 12: Modelo de implantação estereotóxica de células tumorais da linhagem de glioblastoma humano U87 no encéfalo de rato. Um milhão de células U87 foram implantadas no caudado-putâmen (A) de ratos machos adultos. Quatro semanas após a cirurgia, a massa tumoral foi evidenciada macroscopicamente (B) e suas características histológicas observadas após coloração hematoxilina-eosina (C) e (D, maior aumento). N, necrose; as setas indicam a organização das células tumorais em pseudopaliçadas.

4.2. Sobrevida dos ratos com tumores cerebrais em resposta ao tratamento com Ixolaris.

No objetivo de avaliar o efeito anti-tumoral do Ixolaris, analisamos a sobrevida dos ratos implantados intracerebralmente com células tumorais U87-MG, em resposta ao tratamento com essa molécula anti-hemostática.

Três dias após a implantação estereotáxica de um milhão de células U87-MG no caudado-putâmen, iniciou-se o tratamento diário dos ratos com Ixolaris, por uma duração de 28 dias, na dose de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ e por via intraperitoneal. A sobrevida dos animais foi observada até 150 dias após a cirurgia (figura 13).



- U87-MG+ PBS (n=3)
- MSS + IXO (50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$) (n=3)
- U87-MG + IXO (50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$) (n=9)

Figura 13: Sobrevida dos ratos com tumor cerebral em resposta ao tratamento com Ixolaris. Três dias após a implantação intracerebral de um milhão de células U87, iniciou-se o tratamento diário dos ratos por uma duração de 28 dias, por via intraperitoneal, com Ixolaris na dose de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (U87-MG + IXO)(n=9) ou com PBS (U87-MG + PBS)(n=3). Um grupo de ratos controle, implantados com meio

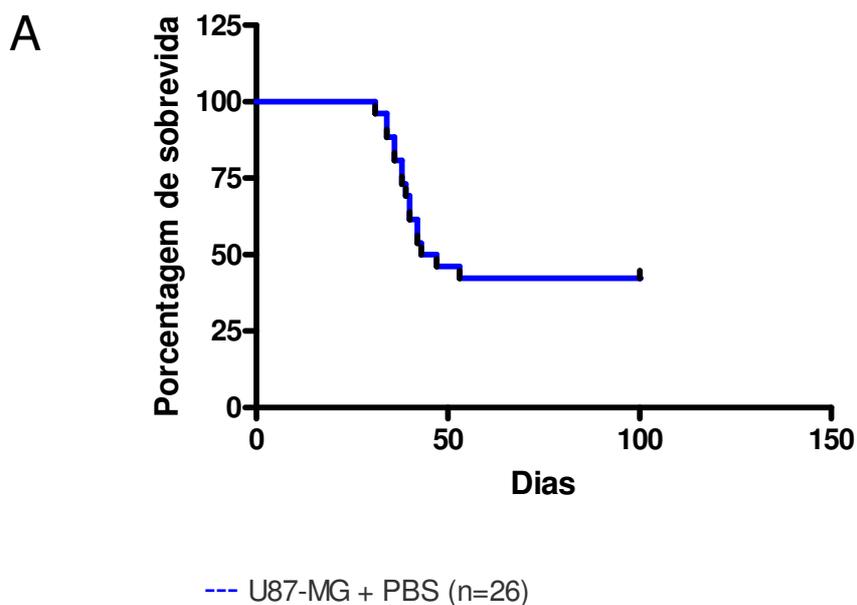
sem soro (MSS) na ausência de células tumorais, foi tratado com Ixolaris segundo o mesmo protocolo (MSS + IXO) (n=3).

O tratamento com Ixolaris de ratos que passaram pelo procedimento cirúrgico, mas não receberam células tumorais, não provocou nenhuma evolução fatal no grupo, mostrando a não-interferência do tratamento na sobrevivência dos animais. Na ausência de tratamento com Ixolaris, dois animais (n = 3) que foram implantados com as células tumorais U87-MG tiveram uma evolução fatal, apresentando uma média de sobrevivência de 39,5 dias pós-cirurgia. No grupo de ratos igualmente implantados com células tumorais U87-MG, mas tratados com Ixolaris, a proporção de animais apresentando uma evolução fatal foi de somente três animais, tendo os demais (66% do grupo experimental, n=9) permanecidos vivos até o final do experimento. Esses primeiros resultados sugeriam fortemente que o tratamento com Ixolaris tende a aumentar a sobrevivência dos ratos acometidos com tumores cerebrais decorrentes da implantação intracerebral das células tumorais U87-MG. Contudo, esse tratamento mostrou uma eficácia relativa, por não induzir a sobrevivência de todos os animais do grupo, e nos levou a concluir que poderia ser necessário aumentar a dose diária de tratamento com Ixolaris.

4.3. Estabelecimento do modelo de implantação estereotáxica de células U87-MG no encéfalo de camundongos adultos.

Optamos em seguida pelo desenvolvimento de um modelo similar de implantação estereotáxica de células U87-MG no encéfalo de camundongos, roedor de peso mais de dez vezes inferior ao de um rato, o que nos permitiria aumentar as doses diárias de tratamento com Ixolaris sem prejudicar o número de animais no experimento.

Assim, meio milhão de células U87-MG foram implantadas no caudado-putâmen de camundongos machos adultos. Cerca de 60% dos camundongos (15/26) tiveram uma evolução fatal, apresentando uma média de sobrevivência pós-cirurgia de 39,5 dias (figura 14). Esses animais sofreram uma perda brusca de peso nos últimos dias de vida e apresentaram uma massa tumoral macroscopicamente observável no hemisfério cerebral de implantação. A observação das características histológicas do tumor em desenvolvimento, após coloração HE, se revelaram similares às características observadas no modelo de implantação em rato (figura 15): áreas de hemorragias, de numerosos vasos de grande calibre e, sobretudo, de áreas de necrose envoltas por células tumorais organizadas em pseudopaliçadas, os principais critérios utilizados pela OMS para o diagnóstico do GBM, atestando igualmente a pertinência do novo modelo estabelecido no camundongo.



B

Evolução fatal (% de animais)	15/26 (~58%)
Média de sobrevivida (dias após cirurgia)	39,5 dias

Presença de tumor macroscópico:	
Evolução fatal	15/15 (100%)
Sobrevivida até o 100 ^o dia pós-cirurgia	0/11 (0%)

Figura 14: Sobrevida dos camundongos após implantação intracerebral de células tumorais U87. (A) Foi observada a sobrevida após implantação estereotáxica de meio milhão de células U87 no caudado-putâmen de camundongos machos adultos (n=26). Os encéfalos foram sistematicamente dissecados para a subsequente avaliação macroscópica. (B) São apresentadas a proporção de animais que tiveram uma evolução fatal durante o período de experimento (100 dias) e sua média de sobrevivida (expressa em dias de sobrevivida pós-cirurgia). Também indicada a presença de massa tumoral macroscópica nos animais que tiveram uma evolução fatal e nos animais que permaneceram vivos até o final do experimento (Sobrevivida até o 100^o dia pós-cirurgia).

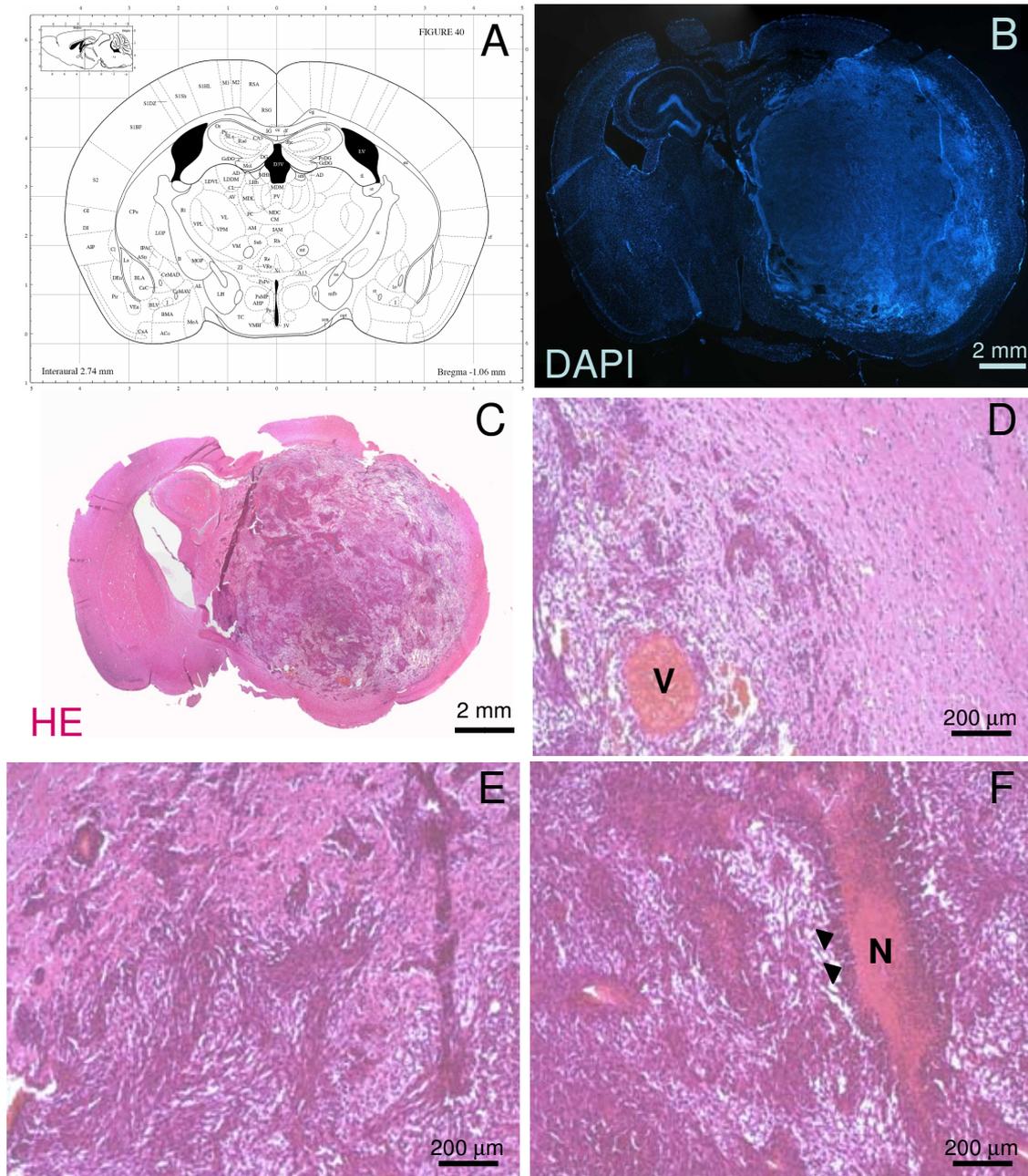


Figura 15: Modelo de implantação estereotóxica de células tumorais da linhagem de glioblastoma humano U87 no encéfalo de camundongos. Meio milhão de células U87 foram implantadas no caudado-putâmen de camundongos machos adultos. Quatro semanas após a cirurgia, a densidade de núcleos no hemisfério encefálico de implantação foi observada por marcação com 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (B). As características histológicas da massa tumoral observadas após coloração hematoxilina-eosina (C) e (D, E e F, maior aumento). V, vaso sanguíneo; N, necrose; as setas indicam a organização das células tumorais em pseudopaliçadas.

4.4. Sobrevida dos camundongos com tumores cerebrais em resposta ao tratamento com Ixolaris.

O estabelecimento do modelo de crescimento tumoral no encéfalo de camundongo nos permitiu analisar a sobrevida desses camundongos em resposta ao tratamento com Ixolaris, nas doses de 50 e 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$.

Três dias após a implantação estereotáxica de meio milhão de células U87-MG no caudado-putâmen, iniciou-se o tratamento diário dos camundongos com Ixolaris por injeção subcutânea, por uma duração de 28 dias. A sobrevida dos animais foi observada até 100 dias após a cirurgia (Figura 16). A via subcutânea foi utilizada neste experimento, pois havia necessidade de padronizar a via de administração do Ixolaris com os experimentos de implantação das células tumorais fora do Sistema Nervoso Central.

De maneira surpreendente frente aos nossos resultados obtidos com os ratos, o tratamento dos camundongos com Ixolaris na dose de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ não induziu um aumento significativo da sobrevida (44% (4/9)), quando comparada à sobrevida dos animais controle, na ausência de tratamento (42% (11/26)). Contudo, um aumento relevante da sobrevida dos animais foi observado em resposta ao tratamento na dose de 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$, com mais de 88% dos animais vivos até o final do experimento. Nos animais tratados com Ixolaris nas doses de 50 e 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ e que permaneceram vivos até o final do experimento, a presença de massa tumoral comparável ao controle não pôde ser observada macroscopicamente após o sacrifício dos animais, cerca de 100 dias pós-cirurgia. Ao contrário, a presença de massa tumoral macroscópica foi evidenciada nos animais que tiveram uma evolução fatal apesar do tratamento

com Ixolaris, apresentando estes uma média de sobrevivência pós-cirurgia de 38 dias (n=7), comparável à dos animais não-tratados (39,5 dias).

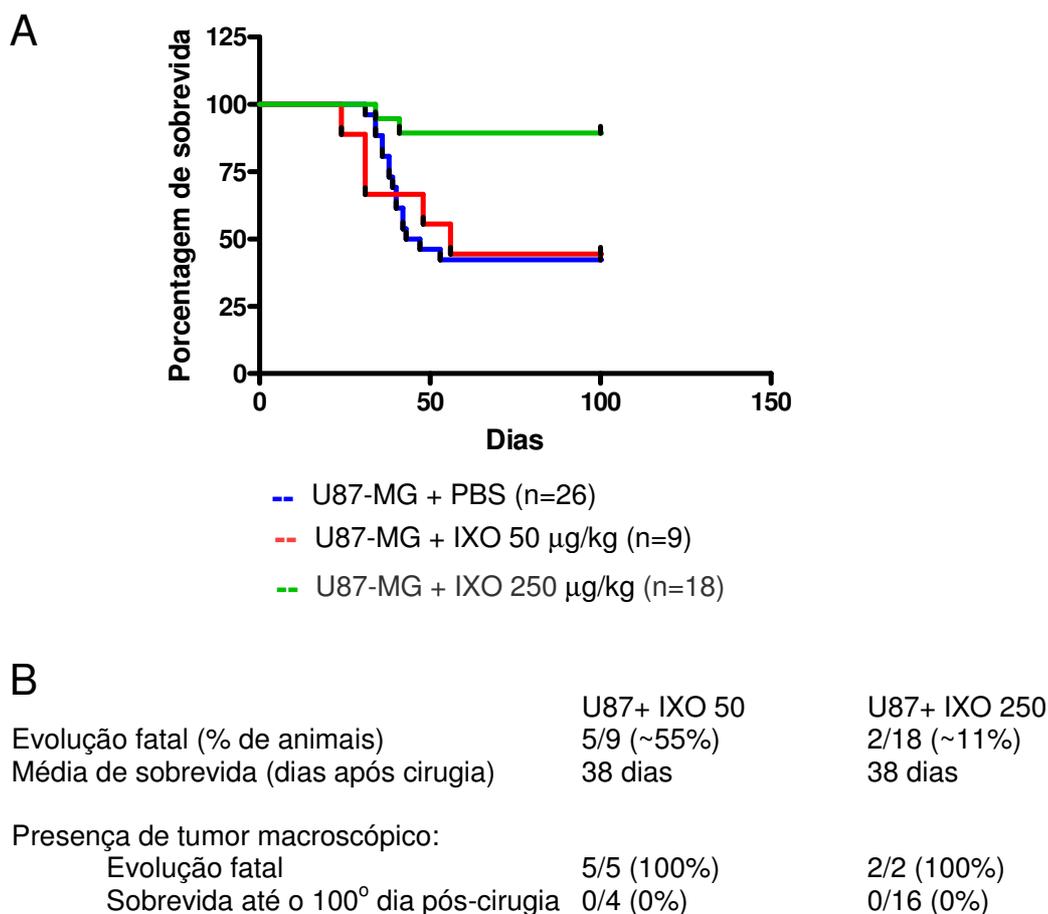


Figura 16: Sobrevivência dos camundongos com tumor cerebral em resposta ao tratamento com Ixolaris. Três dias após a implantação intracerebral de um milhão de células U87, iniciou-se o tratamento diário dos camundongos por uma duração de 28 dias, por via subcutânea, com Ixolaris na dose de 50 µg/kg (n=9), na dose de 250 µg/kg (n=18), ou com PBS (U87-MG + PBS)(n=26). (A) Foi observada a sobrevivência dos animais até o 100º dia pós-cirurgia. Os encéfalos foram sistematicamente dissecados para a subsequente avaliação macroscópica. (B) São apresentadas a proporção de animais que tiveram uma evolução fatal durante o período de experimento e sua média de sobrevivência (expressa em dias de sobrevivência pós-cirurgia). Também indicada a presença de massa tumoral macroscópica nos animais que tiveram uma evolução fatal e nos animais que permaneceram vivos até o final do experimento (Sobrevivência até o 100º dia pós-cirurgia).

5. Discussão

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor mais comum e mais agressivo do SNC e isto se deve a sua capacidade invasiva que provoca uma destruição considerável do tecido normal adjacente. A presença de necrose é um achado clínico comum no GBM, sendo raramente observada em gliomas de menor grau (BRAT e col., 2004). De fato, HAMMOUD e col. (1996), utilizando a técnica de ressonância magnética nuclear, demonstraram uma importante correlação entre a presença de necrose e a sobrevida de pacientes acometidos pelo GBM. Outro achado histopatológico marcante no GBM humano é a oclusão vascular trombótica intratumoral, característica que sugere fortemente que a necrogênese estaria diretamente correlacionada com o potencial pró-coagulante do GBM (TEHRANI e col., 2008).

Diversos relatos da literatura sugerem possíveis mecanismos envolvidos no aumento da coagulação sanguínea em pacientes com câncer (RICKLES & FALANGA, 2001). Entre estes, um dos principais é o aumento na expressão da proteína Fator Tecidual (TF) (RONG e col., 2005; RAK e col., 2006). Pelo menos dois estudos relatam que a expressão de TF estaria diretamente correlacionada com o grau de agressividade dos gliomas (HAMADA e col., 1996; GUAN e col., 2002), o que poderia explicar a maior ocorrência de vaso-occlusão no GBM.

Além da expressão de TF, outro mecanismo pró-coagulante que tem sido destacado na literatura é a exposição do lipídeo fosfatidilserina (BARROWCLIFEE e col., 2002; PICKERING e col., 2004), um importante componente dos complexos pró-coagulantes dependentes de membranas (KALAFATIS e col., 1994). De fato, nosso grupo demonstrou 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). Além disso, também foi relatado por nosso grupo que a linhagem de GBM humano, U87-MG, expressa o TF constitutivamente e expõe fosfatidilserina em sua membrana externa (CARNEIRO-LOBO e col, 2009). Em conjunto, a expressão de TF e a exposição de fosfatidilserina tornariam a célula tumoral extremamente competente para induzir a coagulação sanguínea.

Devido à possível correlação entre os processos pró-coagulantes/pró-trombóticos com a agressividade dos tumores, em particular o GBM, novas terapias com substâncias anticoagulantes têm sido propostas. Neste contexto, foi demonstrado que a inibição da trombina por um inibidor sintético específico, denominado Argatroban, atenua o crescimento *in vivo* de gliomas implantados no SNC de ratos, aumentando a sobrevida dos animais experimentais (HUA e col., 2005). Esta observação sugere que o tratamento do GBM com inibidores da coagulação seria uma abordagem terapêutica válida, especialmente neste tipo de câncer em que a sobrevida média é inferior a 12 meses. De fato nosso grupo demonstrou recentemente que o Ixolaris, um inibidor do complexo TF/FVIIa, responsável pelo início da coagulação sanguínea, é um potente agente antitumoral em modelo murino de crescimento tumoral primário, após a implantação subcutânea da linhagem tumoral U87-MG (CARNEIRO-LOBO e col., 2009). Desta forma o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do Ixolaris no crescimento *in vivo* de GBM em um modelo ortotópico.

Neste trabalho nós demonstramos que o Ixolaris promove um aumento na sobrevida de roedores que receberam as células tumorais U87-MG intracerebralmente. De fato, o Ixolaris foi eficaz no modelo realizado em ratos,

numa dose de 50 µg/kg e no modelo murino, em doses de 250 µg/kg. O aumento de sobrevivência dos animais poderia ser atribuído principalmente pela inativação do TF produzido pelas células tumorais, em decorrência da formação do complexo quaternário Ixolaris/TF/FVIIa/FXa (FRANCISCHETTI, 2002). É importante ressaltar, no entanto, que os animais que foram tratados com Ixolaris e continuaram vivos até o final do ensaio, apresentaram-se livres de tumores macroscópicos ao final do tempo de experimentação. Isto significa que o mecanismo de ação do Ixolaris pode apresentar maior complexidade e envolver outros processos em que haja envolvimento do complexo TF/FVIIa, embora não relacionados com o sistema de coagulação sanguínea.

As análises microscópicas realizadas no modelo de crescimento tumoral em ratos e no modelo murino revelaram a presença dos principais marcadores histológicos do GBM humano incluindo focos necróticos e células organizadas em pseudopaliçadas. Não foi possível, entretanto, realizar uma análise sistemática para a observação de trombos intratumorais. Neste contexto, o efeito antitumoral do Ixolaris poderia estar relacionado com uma redução na capacidade do tumor em gerar áreas hipóxicas, reduzindo assim a sua agressividade. De fato, o modelo subcutâneo de crescimento tumoral da linhagem U87-MG revelou que o tratamento com Ixolaris reduz a expressão de VEGF e a angiogênese tumoral (CARNEIRO-LOBO e col., 2009).

Em adição ao seu efeito pró-coagulante e pró-trombótico, o complexo TF/FVIIa possibilita a clivagem de receptores do tipo PAR-2 expresso em diversos tipos celulares, incluindo células tumorais (BELTING e col., 2005; RAO & PENDURTHI, 2005). De fato, a ativação deste receptor medeia diversas respostas pró-tumorais, incluindo a produção de fatores pró-angiogênicos como

o VEGF (LIU & MUELLER, 2006; ALBREKTSSEN e col., 2007). A relevância *in vivo* desta observação foi recentemente reforçada por dois estudos que demonstraram que: i. anticorpos anti-TF que bloqueiam a sinalização de PAR-2, sem afetar a atividade pró-coagulante do complexo TF/FVIIa, reduzem o crescimento *in vivo* de tumores subcutâneos implantados em camundongos (VERSTEEG e col, 2008a); ii. A deleção do gene para o receptor PAR-2 reduz o potencial de crescimento *in vivo* de tumores mamários implantados em camundongos (VERSTEEG e col, 2008b). Em conjunto, estas observações sugerem que o bloqueio da atividade do complexo TF/FVIIa pelo Ixolaris poderia resultar em uma ação antitumoral em decorrência do bloqueio da sinalização celular do receptor PAR-2. No entanto não temos dados experimentais que suportem esta hipótese no modelo de GBM.

Em resumo, conseguimos montar um modelo de crescimento *in vivo* de GBM que nos oferece características histológicas importantes, quando comparadas ao achados em amostras de pacientes. Este modelo corrobora a ação antitumoral da molécula anticoagulante Ixolaris e reforça o seu potencial uso na terapia do câncer.

6. Conclusões

Os dados obtidos no presente trabalho nos possibilitam concluir que:

- O modelo de implantação intracerebral das células U87-MG em ratos e em camundongos foi estabelecido com sucesso, na medida de que a maior parte dos animais tiveram uma evolução fatal, acompanhada de características histopatológicas similares às observadas no tumor humano primário;
- O tratamento com Ixolaris (dose de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$) aumenta a sobrevivência de ratos que receberam células U87-MG intracerebralmente;
- O tratamento com Ixolaris (dose de 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$) aumenta a sobrevivência de camundongos suíços que receberam células U87-MG intracerebralmente.

7. Referências Bibliográficas

ALBREKTSSEN T, SØRENSEN BB, HJORTØ GM, FLECKNER J, RAO LV, PETERSEN LC. Transcriptional program induced by factor VIIa-tissue factor, PAR1 and PAR2 in MDA-MB-231 cells. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1588-1597.

AMIRKHOSRAVI A, MEYER T, CHANG JY, AMAYA M, SIDDIQUI, DESAI H, FRANCIS JL. Tissue factor pathway inhibitor reduces experimental lung metastasis of B16 melanoma. *Thromb Haemost* 2002; 87: 930-936.

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.

BRAT DJ, MAPSTONE TB. The malignant glioma physiology: Cellular response to hypoxia and its role progression in tumor. *Ann Intern Med* 2003; 138: 659-68.

BELTING M, AHAMED J, RUF W. Signaling of tissue factor coagulation pathway in angiogenesis and cancer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1545-1550.

BLOM JW, VANDERSCHOOT JP, OOSTINDIËR MJ, OSANTO S, VAN DER MEER FJ, ROSENDAAL FR. Incidence of venous thrombosis in a large cohort of 66,329 cancer patients: results of a record linkage study. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 529-535

BOBEK V, KOVARÍK J. Antitumor and antimetastatic effect of warfarin and heparins. *Biomed Pharmacother* 2004; 58: 213-219.

BOCCACCIO C, MEDICO E. Cancer and blood coagulation. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 458-462.

BRAT DJ, VAN MEIR EG. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab Invest* 2004; 84: 397-405.

BROMBERG ME, BAILLY MA, KONIGSBERG WH. Role of protease-activated receptor 1 in tumor metastasis promoted by tissue factor. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1210-1214.

BROZE GJ JR. Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Annu Rev Med* 1995; 46: 103-1.

Buckner JC. Factors influencing survival in high-grade gliomas. *Semin Oncol* 2003; 30(6 Suppl 19):10-4.

CHEN J, BIERHAUS A, SCHIEKOFER S, ANDRASSY M, CHEN B, STERN DM, NAWROTH PP. Tissue factor-a receptor involved in the control of cellular properties, including angiogenesis. *Thromb Haemost* 2001; 86: 334-345.

CARNEIRO-LOBO T, KONIG S, MACHADO ED, NASCIUTTI LE, FORNI MF, FRANCHISCHETTI IM, SOGAYAR MC, MONTEIRO RQ. Ixolaris, a tissue factor inhibitor, blocks primary tumor growth and angiogenesis in a glioblastoma model. *J Thromb Haemost*. In press.

CHICOINE MR, SILBERGELD DL. Invading C6 glioma cells maintaining tumorigenicity. *J Neurosurg* 1995; 83(4):665-71.

CHUNG WJ, LYONS SA, NELSON GM, HAMZA H, GLADSON CL, GILLESPIE GY, SONTHEIMER H. Inhibition of Cystine uptake disrupts the growth of primary brain tumors. *J Neurosci* 2005; 25: 7101-7110.

DAUMAS-DUPOINT C, BEUVON F, VARLET P and FALLET-BIANCO C (1988) Gliomes: classification de l'OMS et de l'Hôpital Sainte-Anne. *Ann Pathol* 20: 413-428.

DAUMAS-DUPORT C, BEUVON F, VARLET P and FALLET-BIANCO C
Gliomes: classification de l'OMS et de l'Hôpital Sainte-Anne. *Ann Pathol* 2000;
20: 413-428.

DEANGELIS LM. Brain tumors. *N Engl J Med* 2001; 344(2):114-23.

DE CICCIO M. The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. *Crit
Rev Oncol Hematol* 2004; 50:187-196

ESUMI N, FAN D, FIDLER IJ. Inhibition of murine melanoma experimental
metastasis by recombinant desulfatohirudin, a highly specific thrombin inhibitor.
Cancer Res 1991; 51: 4549-4556.

EVEN-RAM S, UZIELY B, COHEN P, GRISARU-GRANOVSKY S, MAOZ M,
GINZBURG Y, REICH R, VLODAVSKY I, BAR-SHAVIT R. Thrombin receptor
overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat Med*
1998; 4: 909-914.

FERNANDES RS, KIRSZBERG V, RUMJANEK, 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: LUGASSY G, FALANGA A, KAKKAR AK, RICKLES FR.
Thrombosis and Cancer. London, United Kingdom, Taylor and Francis Group.
2004; 69-98.

FERRARA N, GERBER HP, LECOUTER J. The biology of VEGF and its
receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676.

FRANCISCHETTI IM, VALENZUELA JG, ANDERSEN JF, MATHER TN,
RIBEIRO JM. 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: 3602-3612.

FRANCO RF. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina*, Ribeirão Preto, 2001; 34: 229-237.

GUAN M, JIN J, SU B, LIU WW, LU Y. Tissue factor expression and angiogenesis in human glioma. *Clin Biochem* 2002; 35: 321-325.

GUILLAMO JS, LISOVOSKI F, CHRISTOV C, GUÉRINEL LE, DEFER GL, PESCHANSKI M, LEFRANÇOIS T. Migration pathways of human glioblastoma cells xenografted into the immunosuppressed rat brain. *J of Neuro-Oncology* 2001 52: 205-215.

HENRIKSON KP, SALAZAR SL, FENTON JW 2ND, PENTECOST BT. Role of thrombin receptor in breast cancer invasiveness. *Br J Cancer* 1999; 79: 401-406.

HAMADA K, KURATSU J, SAITOH Y, TAKESHIMA H, NISHI T, USHIO Y. Expression of tissue factor correlates with grade of malignancy in human glioma. *Cancer* 1996; 77: 1877-1883.

HAMMOUD MA, SAWAYA R, SHI W, THALL PF, LEEDS NE. Prognostic significance of preoperative MRI scans in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 1996 27: 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 Res* 2003; 63: 2997-3000.

HJORTOE GM, PETERSEN LC, ALBREKTSEN T, SORENSEN BB, NORBY PL, MANDAL SK, PENDURTHI UR, RAO LV. Tissue factor-factor VIIa-specific

up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration. *Blood* 2004; 103: 3029-3037.

HOLLAND EC. Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 6242-6244.

HUA Y, TANG L, KEEP RF, SCHALLERT T, FEWEL ME, MURASZKO KM, HOFF JT & XI G. The role of thrombin in gliomas. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1917-1923.

IKEDA O, EGAMI H, ISHIKO T, ISHIKAWA S, KAMOHARA H, HIDAKA H, MITA S, OGAWA M. Expression of proteinase-activated receptor-2 in human pancreatic cancer: a possible relation to cancer invasion and induction of fibrosis. *Int J Oncol* 2003; 22: 295-300.

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

KELLY PJ, DAUMAS-DUPOINT C, KISPERT DB, KALL BA, SCHEITHACHEITHAUE BW and Illig JJ. Imaging-based stereotaxic serial biopsies in untreated intracranial glial neoplasms. *J Neurosurg* 1987; 66: 865-874.

KLEIHUES P and CAVANEE We (2000) WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tumours of the Nervous System, Pathology and Genetics Classification of Tumours. IARC Press Lyon 2000.

KONIGSBERG W, KIRCHHOFER D, RIEDERER MA & NEMERSON Y. The TF:VIIa complex: clinical significance, structure-function relationships and its role in signaling and metastasis. *Thromb Haemost* 2001; 86: 757-771.

LAL S, LACROIX M, TOFILON P, GREGORY N, RAYMOND S, FREDERICK F. An implantable guide-screw system for brain tumor studies in small animals. *J Neurosurg* 2000; 92:326-333.

LEE AY. Cancer and venous thromboembolism: prevention, treatment and survival. *J Thromb Thrombolysis* 2008; 25: 33-36.

LIP GY, CHIN BS, BLANN AD. Cancer and the prothrombotic state. *Lancet Oncol* 2002; 3: 27-34.

LIU Y, MUELLER BM. Protease-activated receptor-2 regulates vascular endothelial growth factor expression in MDA-MB-231 cells via MAPK pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 344: 1263-1270.

LOUIS DN, OHGAHI H, WIESETSLER OD e CAVANEE WK. WORLD HEALTH ORGANIZATION classification of Tumours of the Nervous System, in World Health Organization Classification of Tumors, International Agency for Research on Cancer 2007; (IARC), Lyon.

MANN KG. Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost* 1999; 82: 165-174.

MARAGOUDAKIS ME, TSOPANOGLOU NE, ANDRIOPOULOU P & MARAGOUDAKIS MM. Effects of thrombin/thrombosis in angiogenesis and tumour progression. *Matrix Biol* 2000; 19: 345-351.

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

MITTLER MA, WALTERS BC and STOPA EG . Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies. *J Neurosurg* 1996; 85: 1091-1094.

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

MONTEIRO RQ, REZAIIE AR, RIBEIRO JM, FRANSCISCHETTI IM. Ixolaris: a factor xa heparin binding exosite inhibitor. *Biochem J* 2005; 387: 871-7.

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: 307-314.

MUELLER BM, REISFELD RA, EDGINGTON TS, RUF W. Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 11832-11836.

NAZARETH RA, TOMAZ LS, ORTIZ-COSTA S, ATELLA GC, RIBEIRO JM, FRANCISCHETTI IM, MONTEIRO RQ. Antithrombotic properties of Ixolaris, a potent inhibitor of the extrinsic pathway of the coagulation cascade. *Thromb Haemost* 2006; 96: 7-13.

ORNSTEIN DL, MEEHAN KR & ZACHARSKI LR. The coagulation system as a target for the treatment of human gliomas. *Semin Thromb Hemost* 2002; 28: 19-28.

PAVIC M, DEBOURDEAU P, ALETTI M, FARGE-BANCEL D, ROUSSET H. Venous thromboembolism and cancer. *Rev Med Interne* 2006; 27: 313-322.

PARSAN A, CHAKRABARTI MD, HURLEY P, JHON C, JONATAHN S, KAISER M, JEFFREY B. Limitations of the C6/wistar rat intracerebral glioma model: Implications for evaluating immunotherapy. *Neurosurgery* 2000 47: 993-1000.

PAXINOS, G. FRANKLIN K.B.J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2nd edition. Academic Press 2001.

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. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 459-467.

PLUNKETT RJ, WEBER RJ, OLDFIELD EH. Stereotaxic implantation of dispersed cell suspensions into brain. *J Neurosurg* 1988; 69: 228-233.

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 Haemost* 2006; 32: 54-70.

RAO JS. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: The role of proteases. *Nat Reviews* 2003; 3: 489-501.

RAO LV, PENDURTHI UR. Tissue factor-factor VIIa signaling. *Arterioscler Thromb vasc Biol* 2005; 25: 47-56.

RICKLES FR, EDWARDS RL. Activation of blood coagulation in cancer: Trousseau's syndrome revisited. *Blood* 1983; 62: 14-31.

RIEWALD M, RUF W. Orchestration of coagulation protease signaling by tissue factor. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12: 149-154.

RONG Y, DURDEN DL, VAN MEIR EG, BRAT DJ. Pseudopalisating necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65: 529-39.

RUF W. Tissue factor-dependent signaling in tumor biology. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33 S1: 28-30.

SAMBRANO GR, WEISS EJ, ZHENG YW, HUANG W, COUGHLIN SR. Role of thrombin signaling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature* 2001; 413: 74-78.

SCHIFFER D, CAVALLA P, CHIO A, RICHIARD P, GIORDANA MT. Proliferative activity and prognosis of low-grade astrocytomas. *J Neurooncol* 1997; 34(1):31-5.

SØRENSEN HT, JOHNSEN SP, NØRGÅRD B, ZACHARSKI LR, BARON JA. Cancer and venous thromboembolism: a multidisciplinary approach. *Clin Lab* 2003; 49: 615-623.

STHEINHOFF M, BUDDENKOTE J, SHPACOVITH V, RATTENHOLL A, MOORMANN C, VERGNOLLE N, LUGER TA, HOLLENBERG MD. Proteinase-activated receptors: Transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev* 2005; 26: 1-43.

STUPP, R, MASON, WP, VAN DEN BENT, MJ, WELLER, M, FISCHER, B, TAPHOORN, MJ, BELANGER, K, BRANDES, AA, MAROSI, C, BOGDAHN, U Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for Glioblastoma. *N Engl. J. Med* 2007; 352, 987-996.

TEHRANI M, FRIEDMAN TM, OLSON JJ, BRAT DJ. Intravascular Thrombosis in central nervous system malignancies a potential role in astrocytoma progression to glioblastoma. *Brain Pathol* 2008; 18:164-171.

VANDENBERG SR. Current diagnostic concepts of astrocytic tumors. *J neuropathol* 1992; 51 (6): 644-57.

VARKI A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood* 2007; 110: 1723-1729.

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.

VERSTEEG HH, SCHAFFNER F, KERVER M, ELLIES LG, ANDRADE-GORDON P, MUELLER BM, RUF W. Protease-activated receptor (PAR) 2, but not PAR1, signaling promotes the development of mammary adenocarcinoma in polyoma middle T mice. *Cancer Res* 2008a; 68: 7219-7227.

VERSTEEG HH, SCHAFFNER F, KERVER M, PETERSEN HH, AHAMED J, FELDING-HABERMANN B, TAKADA Y, MUELLER BM, RUF W. Inhibition of tissue factor signaling suppresses tumor growth. *Blood* 2008b; 111: 190-199.

WHITE RH, CHEW H, WUN T. Targeting patients for anticoagulant prophylaxis trials in patients with cancer: Who is at highest risk? *Thromb Res* 2007; 120 (suppl 2): S29-40.

YIN YJ, SALAH Z, GRISARU-GRANOVSKY S, COHEN I, EVEN-RAM SC, MAOZ M, UZIELY B, PERETZ T, BAR-SHAVIT R. Human protease-activated receptor 1 expression in malignant epithelia: A role in invasiveness. *Arterioscler Thromb vasc Biol* 2003; 23: 940-944.

ZACHARSKI LR, PRANDONI P, MONREAL M. Warfarin versus low-molecular-weight heparin therapy in cancer patients. *Oncologist* 2005; 10: 72-79.

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](#)