

Cinthia Figueiredo

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Avaliação das propriedades antitumoral e  
antimetastática de fração proteolítica do látex de  
*Carica candamarcensis* em modelo de melanoma  
murino**

Orientadora: Profa Dra Miriam Teresa Paz  
Lopes

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos E. Salas Bravo

Belo Horizonte

2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

Cinthia Figueiredo

**Avaliação das propriedades antitumoral e  
antimetastática de fração proteolítica do látex de  
*Carica candamarcensis* em modelo de melanoma  
murino**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, com ênfase em Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: **Farmacologia**

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Miriam Teresa Paz  
Lopes

**Co-orientador:** Prof. Dr. Carlos E. Salas Bravo

Belo Horizonte

2009

Dedico este trabalho aos meus pais Ivan e Nadir e a minha irmã Thays

“Tenhas sempre presente que a pele se enruga, o cabelo embranquece  
Os dias convertem-se em anos  
Mas, o que é importante não muda, a tua força e convicção não tem idade  
O teu espírito é como qualquer teia de aranha  
Atrás de cada linha de chegada, há uma de partida  
Atrás de cada conquista, vem um novo desafio  
Enquanto estiveres viva, sente-te viva  
Se sente saudades do que fazias, volte a fazê-lo  
Não vivas de fotografias amareladas  
Continua, quando todos esperarem que desistas  
Não deixes que enferruje o ferro que existe em ti  
Faz com que em vez de pena, te tenham respeito  
Quando não conseguires mais correr através dos anos, trota  
Quando não consigas trotar, caminha  
Quando não consigas caminhar, usa uma bengala  
Mas, nunca te detenhas!”  
(Madre Tereza de Calcutá)

## **Agradecimentos:**

A Deus por abençoar a minha vida;

A minha família por me apoiar incondicionalmente e por ser tudo o que eu tenho de mais valioso;

A Prof<sup>a</sup>. Miriam e ao Prof. Salas pela oportunidade e pela paciência;

Aos amigos inesquecíveis do LSAT pelo carinho, pela amizade e pelo auxílio em todos os momentos;

Aos alunos do Laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais pela ajuda em alguns dos experimentos;

Aos professores colaboradores (Sílvia, Valbert e Giovanni) e seus alunos pela boa vontade;

A Prof<sup>a</sup> Janetti e seus alunos pela presteza e por cederem o espaço para grande parte dos experimentos executados nesse trabalho;

Aos colegas de departamento, em especial ao Bruno, por ter me apresentado os caminhos científicos;

A Tatiane, minha secretária, por ter sido meu braço direito em todo o tempo de execução do mestrado;

A Celinha, aos funcionários do Biotério e demais funcionários do ICB pelos serviços prestados;

Aos amigos e parentes pelo carinho;

A todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram com a execução deste trabalho.

## **COLABORADORES:**

- Prof Geovanni Dantas Cassali, Departamento de Patologia Geral, ICB-UFMG.
- Prof<sup>a</sup> Sílvia Passos Andrade, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG.
- Prof. Valbert Nascimento Cardoso, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia, UFMG.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b>	<b>i</b>
<b>RESUMO</b>	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>vi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Fatores iniciadores e promotores do câncer	1
1.2 Desenvolvimento tumoral	2
1.3 Estratégias para o tratamento do câncer	6
1.3.1 Fração proteolítica derivada do látex de <i>C. candamarcensis</i> - P1G10	10
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
2.1 Geral	12
2.2 Específicos	12
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Materiais</b>	<b>13</b>
3.1.1 Biológicos	13
3.1.2 Reagentes químicos	13
3.1.3 Equipamentos	15
3.1.4 Materiais diversos	16
3.1.5 Fármacos utilizados	17
3.1.6 Soluções	17
<b>3.2 Metodologia</b>	<b>22</b>
3.2.1 Obtenção de P1G10	22
3.2.1.1 Inibição de P1G10 por iodoacetamida	22
3.2.1.2 Marcação de P1G10 com <sup>99m</sup> Tc	23
3.2.2 Avaliação da citotoxicidade de P1G10	23
3.2.2.1 Cultivo celular	23



3.2.2.2	Avaliação da viabilidade celular pelo teste do MTT	24
3.2.3	Avaliação da atividade antitumoral de P1G10	25
3.2.3.1	Avaliação da variação da massa tumoral	25
3.2.3.2	Avaliação do tempo de sobrevivência	25
3.2.3.3	Avaliação da dependência da atividade proteolítica de P1G10 em seu efeito antitumoral	26
3.2.3.4	Avaliação do efeito de P1G10 sobre a angiogênese tumoral	27
3.2.3.4.1	Quantificação da angiogênese através da dosagem de hemoglobina (Hb)	27
3.2.3.4.2	Dosagem da atividade de N-acetil-b-D-glicosaminidase (NAG)	27
3.2.3.4.3	Ensaio imunoenzimático para dosagem de VEGF, TNF- $\alpha$ e TGF- $\beta$	28
3.2.3.5	Biodistribuição de P1G10	29
3.2.3.5.1	Imagens cintilográficas	30
3.2.4	Avaliação da atividade antimetastática de P1G10	30
3.2.4.1	Avaliação da ocorrência e número de pontos de metástase	30
3.2.4.2	Avaliação do tempo de sobrevivência	31
3.2.4.3	Biodistribuição de P1G10	31
3.2.4.3.1	Imagens cintilográficas	32
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
4.1	Citotoxicidade de P1G10 sobre linhagens de células normais e tumorais	33
4.2	Atividade antitumoral em animais tratados com P1G10	36
4.2.1	Variação da massa tumoral	37
4.2.2	Tempo de sobrevida	38
4.2.3	Efeito de P1G10 sobre a angiogênese tumoral	41
4.2.4	Avaliação da dependência da atividade proteolítica de P1G10 em seu efeito antitumoral	45
4.2.5	Biodistribuição de P1G10	45
4.3	Atividade antimetastática	48

4.3.1	Variação no percentual de ocorrência e do número de pontos de metástase	48
4.3.2	Tempo de sobrevivência	52
4.3.3	Biodistribuição de P1G10	56
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>59</b>
5.1	Atividade antitumoral	60
5.2	Atividade antimetastática	70
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>76</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>85</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-FU - Fluoruracila

ANOVA – Análise de variância

CEBIO- Centro de Bioterismo do ICB, UFMG

Cpm – Contagem por minuto

D.O. - Densidade óptica

DMSO – Dimetilsulfóxido

DTT- ditioneitol

ELISA- Enzima Linked Immunosorbent assay (ensaio imunoenzimático)

H.E.- coloração hematoxilina- eosina

Hb- hemoglobina

HTAB- brometo de hexadeciltrimetilamônio

IAA- Iodoacetamida

IC<sub>50</sub> - Concentração inibitória para 50% da população

K<sub>p</sub> – Coeficiente de partição

MTT- Brometo de 3-[4',5'-dimetiltiazol-2'ila]-2,5 difeniltetrazol

NAG - N- acetil-β-D-glicosaminidase

PBS- tampão fosfato de sódio

TGF-β - Transforming Growth Factor (Fator transformador de crescimento β)

TNF-α - Tumor Necrosis Factor (Fator de Necrose Tumoral α)

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)

## RESUMO

Estudos prévios demonstraram a utilização de proteases como fármaco principal ou adjuvante na Oncologia. Com base nesses achados, o objetivo deste trabalho, foi avaliar as propriedades antitumoral e antimetastática da fração proteolítica rica em cisteino proteases advinda do látex de *Carica candamarcensis* (P1G10), utilizando modelos murinos de melanoma B16F1 (não metastático) e B16F10 (metastático). Inicialmente, observamos uma redução da massa tumoral de 88,6% (modelo B16F1) para o grupo tratado com a dose de 5 mg/kg ( $0,26 \pm 0,62$  g) em relação ao grupo controle ( $2,28 \pm 1,01$  g,  $*p < 0,05$ , ANOVA com pós teste Bonferroni). Estudos de sobrevivência também apontaram que, entre o 13º e o 15º dias após o término do tratamento, animais tratados com P1G10 5 mg/kg apresentaram 54,2% de mortalidade, enquanto o grupo controle apresentou 77,1% ( $*p < 0,05$ , Teste de Logrank). Essa atividade antitumoral parece não depender da atividade proteolítica da fração, visto que a redução de massa tumoral foi semelhante para os grupos tratados com a fração inibida ( $1,23 \pm 1,21$  g) ou ativa ( $1,05 \pm 0,92$  g), ambos na dose de 5 mg/kg. Nossos dados ainda sugerem importante atividade antiangiogênica para P1G10 uma vez que foi constatada uma redução da quantidade de hemoglobina (Hb,  $2,15 \pm 1,19$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tumor;  $*p < 0,01$ , Teste t de Student para o grupo tratado com P1G10 5 mg/kg em relação ao grupo controle) e nos níveis de Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF,  $1,4 \pm 0,35$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tumor;  $*p < 0,01$ , Teste t de Student para o grupo tratado com P1G10 5 mg/kg em relação ao grupo controle). Dados de biodistribuição corroboram o já demonstrado, visto que esses dados mostram a redução de captação de P1G10 marcado com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  pelo tumor ao longo do tempo, valor que foi de  $0,86 \pm 0,25$  no 5º dia, de  $0,44 \pm 0,12$  no 10º e de  $0,39 \pm 0,08$  no 16º ( $*p < 0,05$ , 10º e 16º comparado ao 5º dia, ANOVA pós teste Bonferroni). No modelo metastático (B16F10), foi observada redução no percentual de metástases no grupo de 5 mg/kg (16,6% de animais acometidos por metástase) em relação ao controle (50%). Além disso, em relação a sobrevida, se observou que, entre o 13º e o 15º dias após o término do tratamento, o percentual de mortalidade foi de 23,1% para o grupo P1G10 5 mg/kg, enquanto que para o grupo controle, este foi de 61,5%. ( $*p < 0,05$ , Teste de Logrank) Achados de biodistribuição mostraram que não há maior captação de P1G10 em pulmões de animais portadores de melanoma

B16F10 de grupos tratados em relação ao controle. Não encontramos também maior seletividade, em ensaios *in vitro*, para as células tumorais B16F1 e B16F10. Em face desses resultados, é possível sugerir que, à diferença de outras proteases, a atividade antitumoral de P1G10 não depende de sua atividade proteolítica e, tão pouco, de atividade citotóxica, mas que há o envolvimento da ação antiangiogênica. Em relação à atividade antimetastática de P1G10, os resultados obtidos mostram um efeito expressivo em dose menor que as utilizadas para outras proteases. Desta forma, a continuidade do estudo sobre os mecanismos de ação pelos quais a fração atua se faz necessária.

Palavras - chave: Antitumoral, Antimetastática, Proteases, *C. candamarcensis*

## ABSTRACT

Pharmacological and pre-clinical studies have demonstrated that plant cysteine proteases have therapeutical potential in Oncology. In this work, we evaluated the antitumoral and antimetastatic properties of a proteolytic fraction from *Carica candamacensis* latex, designated as P1G10 that has an elevated content of cysteine proteases, using B16F1 (non metastatic) and B16F10 (metastatic) melanoma models. Firstly, we observed a reduction of tumor mass (88,6%) in mice s.c. given 5mg/kg P1G10 ( $0,26 \pm 0,62$  g) compared to control ( $2,28 \pm 1,01$  g, \* $p < 0,05$ , ANOVA post test Bonferroni). Survival analysis showed that, between 13<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> day after the end of treatment, the group treated with 5 mg/kg of P1G10 had 54,2% cases of death, while the control group had 77,1% (\* $p < 0,05$ , Logrank test). The antitumoral effect of P1G10 on the B16F1melanoma model may not depend on the proteolytic activity because the a reduction of tumor mass was similar for the group 5 mg/kg P1G10 inhibited ( $1,23 \pm 1,21$  g) or active ( $1,05 \pm 0,92$  g), both at the dose of 5 mg/kg. Results suggested that an antiangiogenic activity of P1G10 may be one of the causes for the reduction in tumor size observed, as reduction of quantification of hemoglobin or Vascular Endothelial Growth factor (Hb-  $2,15 \pm 1,19$   $\mu$ g/mg tumor; VEGF-  $1,4 \pm 0,35$   $\mu$ g/mg tumor; \* $p < 0,01$ , Student Test) compared to control. This hipotesis was confirmed with results that shows reduction of caption of Technetium-99m labeling of P1G10 on biodistribution experiments, these values were  $0,86 \pm 0,25$  on the 5<sup>th</sup> day,  $0,44 \pm 0,12$  on 10<sup>th</sup> and  $0,39 \pm 0,08$  on 16<sup>th</sup> (\* $p < 0,05$ , 10<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> compared to 5<sup>th</sup> day, ANOVA post test Bonferroni). On metastatic model (B16F10), we observed a percentual reduction in 5 mg/kg P1G10 group (16,6% of metastasis) compared to control (50%). At this side, survival studies showed that, between 13<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> day after the end of treatment, the group treated with 5 mg/kg of P1G10 had 23,1% cases of death, while the control group had 61,5% (\* $p < 0,05$ , Logrank test). Biodistribution experiments using Technetium-99m labeling of P1G10 did not show more caption levels on metastatic lungs compared to normal ones. We also observed that is no selectivity, in vitro, for B16F1 and B16F10 melanoma cells. We suggest that, differently from the other proteases the antitumoral effect of P1G10 on the B16F1melanoma model does not depend on the proteolytic activity, and that the antiangiogenic activity of P1G10 may be one of the causes for the reduction in tumor size observed. We also observed an expressive antimetastatic effect at minor dose

than described for other proteases. On this way, a next step is to investigate the underlying mechanisms.

Key-words: Antitumoral, Antimetastatic, Proteases, *Carica candamarcensis*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Tabela 1.</b> Determinação da IC <sub>50</sub> de P1G10 sobre linhagens celulares normais e tumorais.....	34
<b>Figura 1.</b> Gráficos representativos da determinação da IC <sub>50</sub> de células normais e tumorais à P1G10.....	35
<b>Figura 2.</b> Determinação do crescimento de melanoma B16F1 em camundongos C <sub>57</sub> Bl <sub>6</sub> em função do tempo.....	36
<b>Figura 3.</b> Avaliação da atividade antitumoral de P1G10 sobre modelo de melanoma B16F1.....	37
<b>Figura 4.</b> Sobrevivência de camundongos C <sub>57</sub> Bl <sub>6</sub> tratados com P1G10.....	39
<b>Figura 5.</b> Massa tumoral de animais C <sub>57</sub> Bl <sub>6</sub> mortos durante o ensaio de sobrevivência.....	40
<b>Figura 6.</b> Quantificação da hemoglobina em melanoma B16F1 de camundongos C <sub>57</sub> Bl <sub>6</sub> tratados com P1G10.....	41
<b>Figura 7.</b> Dosagem da atividade de NAG em melanoma B16F1 de camundongos C <sub>57</sub> Bl <sub>6</sub> tratados com P1G10.....	42
<b>Figura 8.</b> Determinação dos níveis de citocinas em melanoma B16F1 de animais tratados com P1G10.....	43
<b>Figura 9.</b> Determinação dos níveis de citocinas em soro de animais portadores de melanomas B16F1 tratados com P1G10.....	44
<b>Figura 10.</b> Avaliação da dependência da atividade proteolítica da fração para sua atividade antitumoral.....	45
<b>Figura 11.</b> Coeficiente de partição de P1G10 marcado com <sup>99m</sup> Tc em tumores B16F1.....	46
<b>Figura 12.</b> Distribuição de P1G10 em modelo de melanoma B16F1.....	47
<b>Figura 13.</b> Percentual de ocorrência de desenvolvimento de metástase para camundongos C <sub>57</sub> Bl <sub>6</sub> ao longo do tempo.....	48



<b>Figura 14.</b> Avaliação da atividade antimetastática de P1G10 em modelo B16F1.....	49
<b>Figura 15.</b> Avaliação da atividade antimetastática de P1G10 através do número de pontos em animais acometidos por metástase para modelo B16F10.....	50
<b>Figura 16.</b> Aspecto macroscópico dos focos metastáticos pulmonares de animais tratados com P1G10.....	50
<b>Figura 17.</b> Aspecto microscópico dos focos metastáticos pulmonares de animais tratados com P1G10.....	51
<b>Figura 18.</b> Sobrevivência de animais C <sub>57</sub> Bl <sub>6</sub> tratados com P1G10.....	53
<b>Figura 19.</b> Percentual de ocorrência de metástases em animais C <sub>57</sub> Bl <sub>6</sub> mortos durante o ensaio de sobrevivência.....	55
<b>Figura 20.</b> Coeficiente de partição de P1G10 marcado com <sup>99m</sup> Tc em pulmões de animais sadios e portadores de melanoma B16F10.....	57
<b>Figura 21.</b> Distribuição de P1G10 em modelo de melanoma B16F10.....	58

## **1) INTRODUÇÃO:**

O estudo do câncer é de fundamental importância na atualidade, visto que, mundialmente, é uma das principais causas de morte. Segundo a Organização Mundial de Saúde, o número estimado de novos casos crescerá de 10 milhões em 2000 para 15 milhões em 2020. No Brasil, as estimativas para o ano de 2008 e, válidas também para 2009, apontam que ocorrerão 466.730 novos casos de câncer ([www.inca.gov.br/estimativa/2008/conteudo\\_view.asp?ID=2](http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/conteudo_view.asp?ID=2)).

O aumento da incidência relacionada ao câncer ocorreu devido à industrialização, que gerou mudanças e uma maior uniformidade das condições de vida, trabalho, nutrição e consumo entre as diferentes classes sócio-econômicas. Desta forma, houve uma mudança no perfil de mortalidade, com diminuição das taxas desta para doenças infecciosas e aumento para doenças crônicas degenerativas como o câncer, doença de Alzheimer e doenças cardiovasculares em função do aumento da expectativa de vida (Waters, 2001).

As altas taxas de morbidade se devem, especialmente em tumores com alta capacidade de metastatização, à falta de terapias que sejam efetivas nos estágios avançados da doença. Além disto, o diagnóstico nas fases iniciais da doença é difícil, visto que, o padrão ouro para o diagnóstico definitivo continua sendo em muitos casos, a biópsia com análise histológica, que é uma técnica invasiva e executada muitas vezes em fases tardias, após a identificação da malignidade (Gadeliya et al, 2009).

### **1.1) Fatores iniciadores e promotores do câncer:**

Desde o início do século XX, o aparecimento de casos de câncer em uma mesma família propulsionou a busca por causas genéticas responsáveis por esta patologia. Nas décadas seguintes, os avanços na identificação molecular das alterações responsáveis pelo processo da carcinogênese foram determinantes para defini-la como um processo aonde, inicialmente, as células acumulam alterações genéticas distintas (Hanahan & Weinberg, 2000). Essas alterações moleculares se constituem de eventos como a inativação de genes supressores tumorais (*p.e.* p53 ou Rb) ou ativação de proto-oncogenes (*p.e.* Ras ou Myc). Essas mutações geram instabilidade genômica, afetam mecanismos de controle da divisão celular e

permitem a formação do tumor primário (Mazzone & Comoglio, 2006). Microscopicamente, as células tumorais apresentam algumas características que as distinguem das normais como: alta proporção do núcleo em relação ao citoplasma, nucléolo proeminente, mitocôndria com menor funcionalidade, alterações no citoesqueleto e poucas estruturas especializadas (Alonso et al, 2004).

Os fatores ambientais se traduzem em genéticos, sendo que há uma ampla variedade de substâncias às quais estamos expostos e que apresentam propriedades carcinogênicas ou mutagênicas. Tabagismo (especialmente devido à nitrosamina), exposição ao sol, dieta, produtos do metabolismo da inflamação e vírus, como o da hepatite B ou C, são alguns exemplos de fatores ambientais que podem contribuir com o aumento do risco de desenvolver a doença (Wogan et al, 2004).

#### 1.2) Desenvolvimento tumoral:

Conforme dito anteriormente, o câncer é uma doença que se origina de alterações genéticas que são transmitidas da célula alterada às suas células filhas. Apesar de estarmos expostos diariamente a inúmeros carcinógenos ambientais, o desenvolvimento de um clone celular tumoral é um evento relativamente raro. Isto ocorre por que a célula precisa transpor uma série de barreiras fisiológicas, que são denominadas pontos de controle, para se tornar tumoral. A progressão pelo ciclo celular é regulada, em parte, por uma série de proteínas como as ciclinas e as quinases dependentes de ciclinas, principalmente nas transições de fases, tanto de G1 (fase de preparo para a síntese de DNA) para S (fase de síntese de DNA), onde, caso haja alguma irregularidade, o gene p53 desencadeia o processo de apoptose; quanto de G2 (intervalo entre a fase S e a mitose) para a mitose, onde os mecanismos não estão bem elucidados (Nurse et al, 1998). Desta forma, anormalidades nos genes da transcrição dessas proteínas regulatórias desregulam o ciclo e permitem que células alteradas escapem ao processo de apoptose; (Guimarães & Linden, 2004).

As células modificadas vão se multiplicando e formam uma massa tumoral. A idéia atual é de que o tumor seja constituído não só por células transformadas, mas também por outras do hospedeiro como as células endoteliais, musculares lisas,

fibroblastos e as células do sistema imunológico, que interagem entre si. Essa formação denominada de microambiente tumoral é determinante para o processo de progressão tumor (Hanahan & Weinberg, 2000).

Com a expansão do tumor, ocorre o aumento da distância de difusão do oxigênio e nutrientes para determinadas áreas do tumor. A hipóxia (diminuição de níveis de oxigênio nos tecidos) ativa o fator heterodimérico induzível pela hipóxia (HIF – Hypoxia Inducible Factors) que induz a transcrição de genes que, conjuntamente com outras proteínas como a angiopoetina-2, estimulam a formação de novos vasos que migram para a massa tumoral. Este processo é denominado angiogênese e garante o estabelecimento do oxigênio e a homeostase nutricional do tumor (Brahimi & Pouyssegur, 2006). Desta forma, a inibição da angiogênese pode significar a inibição da progressão e invasividade tumoral (Ferrara & Kerbel, 2005).

A angiogênese tumoral apresenta características que a diferenciam da inflamatória. Na inflamação, a maior fonte de fatores angiogênicos são os leucócitos infiltrados e as plaquetas, enquanto que para o tumor, as maiores produtoras são as células tumorais com uma contribuição menor dos leucócitos. Os vasos presentes no tumor apresentam arquitetura e função anormal, são desorganizados, dilatados, tortuosos e com diâmetro aumentado, são mais fenestrados com membrana basal descontínua ou ausente, sendo mais permeáveis. As alterações observadas na angiogênese e a permeabilidade vascular variam de acordo com o tipo de tumor e do órgão do hospedeiro onde o tumor está se desenvolvendo, em parte pelas diferenças entre os órgãos que, apresentando diferentes células em seu estroma, produzirão diferentes proporções de moléculas pró e antiangiogênicas (Carmeliet & Jain, 2000; Bian et al, 2004).

Dentre as moléculas pró-angiogênicas, se destacam as citocinas, que são secretadas pelas células normais e tumorais. Estas moléculas participam de vários eventos biológicos como a imunidade inata, apresentação de antígeno, diferenciação das células na medula óssea e expressão de moléculas de adesão (Müller, 2002). Dentre estas, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor) tem papel importante por desempenhar funções, tais como o aumento da permeabilidade vascular, estímulo da diferenciação, proliferação, migração e sobrevivência celular (Stefanini et al, 2008).

O aumento de sua expressão parece ser uma característica de patologias como o câncer, a artrite e a doença cardiovascular (Harper & Bates, 2008). Os níveis de VEGF são controlados no tumor, principalmente, pela hipóxia e, além disso, por algumas citocinas e fatores de crescimento como o derivado de plaquetas (PDGF – Platelet Derived Growth Factor), o de necrose tumoral (TNF –  $\alpha$  – Tumor Necrosis Factor), o transformador (TGF–  $\beta$  - Transforming Growth Factor) e o epidermal (EGF– Epidermal Growth Factor) que induzem a transcrição de VEGF (Akagi et al, 1999).

Outras citocinas também apresentam papel de destaque na angiogênese, entre estas, o TNF- $\alpha$  e o TGF- $\beta$ . O TNF- $\alpha$  é um dos principais mediadores das reações imunológicas, inflamatórias e patofisiológicas. Sua atividade antitumoral advem de efeitos diretos sobre as células tumorais, através da ativação da resposta imune e/ou efeitos citotóxicos diretos (Fiers, 1991). Esta citocina tem sido associada ao desenvolvimento e progressão tumoral em modelos pré clínicos e sua secreção pelas células do microambiente parece estar relacionada com a invasão e migração celular (Mocellini & Nitti, 2008). Experimentos *in vivo* e *in vitro* sugerem que o TGF-  $\beta$  pode promover o câncer de várias formas, afetando o microambiente tumoral, aumentando invasividade e inibindo o sistema imune (Pádua & Massagué, 2009). Assim como estes fatores citados e outros, como o NOS (óxido nítrico sintase) e a COX-2 (ciclooxigenase 2), atuam como ativadores outros, atuam como inibidores (*p.e.*: angiostatina e endostatina) e o desbalanço entre esses pode resultar em aumento da neoformação vascular (Ziello et al, 2007).

A presença do tumor gera uma resposta inflamatória, como uma tentativa do organismo de controlar a doença (Talmadge et al, 1981). Por essa razão, o microambiente tumoral é rico em células inflamatórias, especialmente os macrófagos, sendo que estas células podem afetar o desenvolvimento do tumor de várias formas. Lu e colaboradores (2006) afirmaram que macrófagos ativados são recrutados para a eliminação das células transformadas. Contudo, a idéia corrente é que, na presença do tumor, ocorre uma mudança de fenótipo dos macrófagos que passam a estimular a angiogênese pela produção de fatores de crescimento e, também, geram a ruptura da membrana extracelular, promovendo a progressão e invasão tumoral (Schäfer & Werner, 2008). Desta forma, a ação dos macrófagos em

relação ao desenvolvimento do tumor é paradoxal. Ao mesmo tempo em que podem atuar reduzindo a invasão e geram uma grande quantidade de antígenos, que podem auxiliar no reconhecimento da célula tumoral pelo sistema imune, podem, também, gerar o aumento da vascularização, subverter a imunidade e aumentar a produção de elementos facilitadores do crescimento tumoral (Bidard et al, 2008).

Simultaneamente aos eventos angiogênicos, outros de degradação e de remodelamento da matriz extracelular ocorrem para que o tumor e a rede vascular continuem se desenvolvendo, eventos que resultam em invasão de tecidos adjacentes. Esses processos ocorrem através da ação das proteases endógenas que são produzidas pelas células do estroma e, principalmente, pelas tumorais. Nas células normais, as enzimas proteolíticas estão localizadas em lisossomas ou outros compartimentos intracelulares, porém, nas tumorais, estas são translocadas dos compartimentos intracelulares para a superfície celular e então, são secretadas. Existe uma grande variedade dessas enzimas, são elas as metalo, aspártico, cisteíno e serino proteases (Deryugina et al, 2006, Minarowska et al, 2008). Essas enzimas são ativadas em pH ácido (entre 3,5 e 5,5) e, portanto, suas atividades estão aumentadas em ambientes onde há hipóxia, como o tumoral (Nagase & Woesser, 1999). Cada tipo de tumor apresenta características próprias de degradação proteolítica, como, por exemplo, a perda do colágeno tipo VII que ocorre precocemente no melanoma (Kirkham et al, 1989), no câncer de mama (Wetzels et al, 1991) e no câncer de próstata (Nagle et al, 1995), enquanto que para o tumor de cólon, a perda da laminina-5 é a mais comum (Pyke et al, 1994).

Além da degradação da matriz extracelular pelas proteases endógenas, outros mecanismos mediados por moléculas de adesão, como as caderinas, selectinas e integrinas, estão envolvidos na migração e invasão tumoral. As integrinas, glicoproteínas de adesão, além de promover a migração da célula tumoral também medeiam vias sinalizadoras de sobrevivência celular, permitindo que a célula consiga sobreviver longe do seu local de origem (Stupack, 2005; Frisch & Screaton, 2001; Jin & Varner, 2004). Para a célula migrar, é necessário que ela passe por uma transição denominada epitélio mesenquimal, na qual a célula tumoral, de origem epitelial passa a expressar genes tipicamente expressos em células de tecido

conjuntivo. Neste processo, ocorrem mudanças de morfologia, arquitetura e adesão aumentando a capacidade migratória da célula (Lee et al, 2006).

O ápice da progressão neoplásica ocorre com a metástase que é o processo no qual as células migram do sítio primário e colonizam áreas à distância. Assim, as células tumorais penetram pelo sistema linfático ou corrente sanguínea através de um processo semelhante ao realizado por leucócitos na diapedese, ou através de destruição da parede do vaso (Strell & Entschladen, 2008). O mecanismo pelo qual ocorre a perda de adesão às células endoteliais ainda não está completamente esclarecido (Chiarugi & Gianonni, 2008) e não existem estudos suficientes para quantificar o percentual de células tumorais que sobrevivem e conseguem colonizar áreas secundárias (Eccles & Welch, 2007).

Ao atingir o sítio secundário, a célula metastática pode ficar quiescente em seu novo ambiente até o momento em que inicie a produção de fatores de crescimento e, ocorra uma adequada angiogênese no local. Nesta fase denominada fase de dormência, a metástase é assintomática e ainda não é detectável clinicamente. Dados da literatura revelam que o tumor primário exerce efeito supressor sobre o crescimento das metástases nas áreas secundárias e que, a remoção deste pode reduzir os níveis de angiostatina e expandir as micrometástases pré existentes (Holmgren et al, 1995; Zetter, 1998; Daí et al, 2006).

### 1.3) Tratamento do câncer:

Um dos maiores desafios para o tratamento do câncer é a ocorrência de metástase, visto que o mecanismo pelo qual as células colonizam áreas distantes é elucidado, constituindo a maior causa de morte e falhas do tratamento (Zetter, 1998). As modalidades de tratamento mais comuns atuam sobre o tumor primário e, são estas: a ressecção cirúrgica, quimioterapia, radioterapia e a imunoterapia.

A retirada cirúrgica do tumor, já vem sendo executada por mais de cem anos e continua sendo a pedra angular para o tratamento do câncer de tumores sólidos. A ressecção do tumor primário é feita em duas etapas. Inicialmente, é realizada a biópsia para estabelecer o diagnóstico, avaliar a espessura e características histopatológicas. Posteriormente, para lesões confirmadas de neoplasias, o

processo cirúrgico requer uma excisão o mais extensa possível com amplas margens de segurança (Wainstein & Belfort, 2004; Katz et al, 2005; Kitano et al, 2006). A dissecação eletiva de linfonodos sentinelas é controversa e a metastasectomia (ressecção cirúrgica das metástases) é de difícil execução, especialmente para estágios mais tardios do câncer (Esser, 2003).

Na radioterapia, se utiliza a radiação ionizante para destruir as células tumorais. A morte celular induzida pela radiação gera injúrias no material genético, impedindo a divisão celular. Porém, seus efeitos não são seletivos para as células tumorais, advindo daí, os efeitos colaterais deste tratamento. A radioterapia é indicada como terapia adjuvante pós-cirúrgica, eliminando as células tumorais residuais (Formenti & Demaria, 2008).

Quando combinada com outras abordagens terapêuticas, a imunoterapia pode ser uma ferramenta de tratamento efetiva. Várias técnicas vêm sendo desenvolvidas como a transferência de linfócitos T citotóxicos (CD8T) e pode ser usada para reduzir células tumorais residuais e reduzir o risco de recorrência e metástase (Krüger et al, 2007).

O tratamento quimioterápico constitui um grande desafio para a medicina moderna visto que, geralmente, atua em nível celular, sem especificidade, interferindo no processo de crescimento e divisão, não destruindo seletiva ou exclusivamente células tumorais. Os efeitos colaterais da quimioterapia estão relacionados à destruição de células saudáveis que estão em mitose, e incluem: toxicidade hematológica, com depressão da medula óssea, que é manifestada por leucopenia, trombocitopenia e anemia; toxicidade gastrointestinal, manifestada através de náuseas, vômitos, mucosite, anorexia, diarreia e constipação; toxicidades cardíaca, hepática, pulmonar, neurológica, vesical/renal; alterações metabólicas, como hipomagnesemia, hiponatremia, hipercalcemia e hiperuricemia; toxicidade dermatológica, com alterações nas unhas, alopecia, eritema, urticária, hiperpigmentação e fotossensibilidade; reações alérgicas e anafilaxia (Araújo et al, 2006).

Dentre os fármacos utilizados, temos os agentes citotóxicos, hormônios e agentes antiangiogênicos. Os agentes citotóxicos atuam de forma a interromper a divisão



celular e desencadear o processo de apoptose. Podem agir também ativando cascatas apoptóticas, como a via das caspases (Shalajja et al, 2004). Neste grupo, estão presentes os agentes alquilantes, os antimetabólitos, os antibióticos e os inibidores mitóticos. Os agentes alquilantes atuam formando ligações covalentes com componentes celulares nucleares e seus efeitos estão diretamente relacionados com a alquilação do DNA, a cisplatina, representante desse grupo, é um análogo da platina e atravessa a membrana através de seus canais transmembranares, formando adutos com o DNA (Jamieson & Lippard, 1999). Já os agentes antimetabólitos afetam a biossíntese de componentes essenciais do DNA e do RNA; a fluoruracila (5-FU) pertence a este grupo e foi desenvolvida como um análogo da base uracila contendo flúor. Seu principal mecanismo de ação é a inibição da timidilato sintase e, conseqüentemente, a síntese do DNA (Thomas & Zalcborg, 1998). Os antibióticos formam uma classe com estrutura química variada e que não atuam especificamente sobre uma fase do ciclo celular, neste grupo, destacamos a mitomicina C que atua aumentando expressão de caspases 8 e 3, conseqüentemente, gerando a apoptose. Outro grupo importante é formado pelos inibidores mitóticos que paralisam a mitose através de sua ação sobre a tubulina formadora dos fusos mitóticos; a vincristina que é um alcalóide da vinca é um dos antineoplásicos deste grupo (Kuboyama et al, 2004). Existem, também, outros agentes citotóxicos que não pertencem a esses grupos, como o etoposídeo, derivado semi-sintético da podofilotoxina, que atua como inibidor da topoisomerase II (Meresse et al, 2004).

Outros agentes podem atuar de forma não citotóxica no tratamento das neoplasias, como a terapia hormonal que é utilizada quando o tumor é derivado de tecidos sensíveis a um determinado hormônio e dependem dele para seu crescimento e sobrevivência, como o tumor de mama ou de próstata. Dentre os fármacos utilizados, podemos citar o tamoxifeno, que é um inibidor competitivo da ligação do estrogênio ao seu receptor ou a ciproterona, que é um inibidor competitivo dos receptores de androgênios. Este tratamento leva à uma queda nos níveis ou antagonizam a ação dos esteróides sexuais (De La Taille, 2001; Schroth et al, 2007). Agentes antiangiogênicos como o bevacizumab (que é um anticorpo monoclonal anti-VEGF) ou o sorafenid (inibidor de quinases que atua inibindo crescimento e ativando apoptose de células endoteliais e alguns tipos de tumorais) também vêm

sendo utilizados por aumentarem o tempo de sobrevivência do paciente. Contudo, seu uso é muito recente e é necessário um maior tempo de monitoramento do paciente e resolução de problemas como a resistência ao tratamento a longo prazo (Sessa et al, 2008). Os anticorpos monoclonais podem ser gerados para reconhecer e se ligar a antígenos específicos do tumor e são utilizados conjuntamente com agentes citotóxicos ou podem ser ligados a radioisótopos para aumentar a sua atividade (Ravi & Chari, 2007)

Há algum tempo, estudos clínicos sobre a utilização de proteases na Oncologia vêm sendo realizados e comprovando a sua importância como fármaco principal ou adjuvante. Misturas enzimáticas contendo papaína, tripsina e quimiotripsina demonstraram ter eficácia clínica atuando como supressores tumorigênicos, reduzindo disseminação metastática e aumentando o tempo de sobrevivência ou mesmo aliviando os efeitos adversos gerados pelo tratamento convencional e melhorando a qualidade de vida dos pacientes (Leipner & Saller, 2000). Foi demonstrado, também, que a administração oral de bromelina, enzima proteolítica advinda de *Ananas comosus*, trouxe remissão de tumores malignos com poucos efeitos colaterais para os pacientes (Gerard, 1974).

Apesar dos inúmeros estudos sobre as formas de atuação das proteases no câncer, os seus mecanismos de ação não estão completamente elucidados. Um possível mecanismo de ação é a atuação sobre o balanço entre proteases e antiproteases (inibidores de proteases). Acredita-se que as proteases exógenas possam induzir a síntese de inibidores de proteases, como as  $\alpha_2$  macroglobulinas, que inativam proteases endógenas que participam do processo de metástases (Sloane et al, 1990).

Outro possível mecanismo de ação das proteases no câncer é através da modulação da expressão de várias moléculas de adesão. Estudos demonstraram que a bromelina é capaz de remover moléculas de adesão como CD44, CD45RA (uma isoforma de CD45), CD6, CD7, CD8 e Leu8/LAM1 por proteólise. Desser e colaboradores (2001) relatou a ação das misturas proteolíticas combinadas com a bromelina na redução dos níveis da citocina TGF- $\beta$  em sangue humano. Este fator

está relacionado a proliferação, diferenciação celular e à atividade imunossupressora tumoral (Moses et al. 1994)

Dentre as proteases citadas anteriormente, a papaína que é advinda do látex de *Carica papaya*, foi a primeira a ser caracterizada e é utilizada, também, na indústria como amaciante de carnes, no curtimento de couros ou na clarificação da cerveja, portanto se destaca pela sua importância comercial (Castro, 1981). Proteases como a papaína ou como a bromelina, são endopeptidases denominadas cisteíno proteases ou tiol proteases. Elas possuem uma cisteína no sítio ativo e seu mecanismo de catálise envolve a participação do grupo tiólico. A família de cisteíno proteases C1 é a mais numerosa família destas proteases e compreende as enzimas semelhantes estruturalmente à papaína. Elas estão distribuídas em animais, vírus, bactérias e plantas, principalmente as que pertencem à família *Caricaceae* (Bromme et al., 2004).

#### 1.3.1) Fração proteolítica derivada do látex de *C. candamarcensis* - P1G10:

Frações proteolíticas do látex de *Carica candamarcensis* vêm sendo caracterizadas bioquímica e farmacologicamente pelo Laboratório de Substâncias Antitumorais e pelo Laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais, ambos do ICB, UFMG. Essa é uma planta típica da costa oeste da América do Sul caracterizada por seu caule grosso, ramificado na porção apical. Possui cerca de 5 metros de altura e seu fruto é amarelo, elipsóide e comestível após o cozimento. O látex de *C. candamarcensis* é coletado geralmente das camadas mais externas dos endocarpos dos frutos verdes, onde os canais lactíferos são numerosos (foto em anexo - ANEXO 1). Esse se apresenta rico em carboidratos, vitaminas, sais minerais e peptídeos de baixo peso molecular, além de enzimas da classe das cisteíno proteases, ausentes na *Carica papaya* (Baeza et al, 1990; Bravo et al,1994). Algumas dessas enzimas apresentam características diferentes das descritas para papaína, tais como pH ótimo, ponto isoelétrico, atividade catalítica e reatividade imunológica (Teixeira et al, 2008). Sabemos que pela separação cromatográfica do látex de *C. candamarcensis* em Sephadex G10 se obtêm frações proteolíticas que podem ser agrupadas em dois picos denominados de P1 e P2G10, que são constituídos por proteínas de massa molecular de cerca de 23 kDa (gráfico em anexo – ANEXO 2). Pereira e colaboradores (2001) relataram significativa similaridade entre a estrutura primária

da fração purificada proveniente do látex de *C. candamarcensis* (CC23) e proteases purificadas da *C. papaya*. A menor homologia foi obtida com a papaína (59,5%), seguida pela papaya protease IV (67,6%), papaya protease III (69,7%) e, finalmente, com a chimopapaína (74,3%).

Inicialmente, descrevemos a atividade mitogênica, *in vitro*, de frações de P1G10 obtidas por cromatografia de troca iônica. Estudos *in vivo* demonstraram uma interessante capacidade cicatrizante, dose dependente, de P1G10 em modelo murino de dermoabrasões. Esta atividade pode ser justificada pela angiogênese e atividade proteolítica, possivelmente, debridante observadas que, em conjunto, participam do processo de cicatrização (Gomes et al, 2005; Mello et al, 2006). Estudos subseqüentes evidenciaram as atividades protetora e cicatrizante gástrica de P1G10 em modelos de lesões ulcerosas agudas induzidas pela indometacina e crônicas induzidas pelo ácido acético (Mello et al, 2008; Silva et al, 2008). Já foi relatada, também, a ação antitumoral de P1G10 em relação ao modelo de carcinoma de Ehrlich, com redução de cerca de 41% da massa tumoral (Viana et al, 2008).

Devemos considerar que a fonte destas substâncias são espécies edíveis e, portanto, representam um risco minimizado para a saúde humana. Trabalhos pré clínicos de toxicologia aguda realizados pelo nosso grupo mostraram que, para as vias intraperitoneais (*i.p.*) e subcutâneas (*s.c.*) apenas altas doses (acima de 50 mg/kg) causaram morte em cerca de 30 minutos. Em estudos toxicológicos subcrônicos, utilizando administração oral, só se observou o aparecimento de sinais tóxicos para a dose de 300 mg/kg a partir do 45º dia. Esses resultados demonstram a baixa toxicidade de P1G10 por via sistêmica, permitindo a execução de estudos com segurança (Villalba et al, dados não publicados).

Considerando que os efeitos aqui descritos são concentração/dose dependente e que algumas outras proteases vêm sendo estudadas como antitumoral/antimetastáticas, visamos com este trabalho avaliar esta capacidade para P1G10.

## 2) OBJETIVOS:

### 2.1) Objetivo geral:

- Avaliar as atividades antitumoral e antimetastática da fração P1G10 do látex de *Carica candamarcensis* sobre os modelos *in vivo* de melanoma murino metastático (B16F10) e não metastático (B16F1).

### 2.2) Objetivos específicos:

- Determinar a citotoxicidade de P1G10 sobre linhagens normais e tumorais através da medida de viabilidade celular pelo método do MTT.
- Estabelecer as condições técnicas ideais para dois modelos de melanoma (metastático e não metastático) em camundongos C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub>.
- Determinar a dose máxima tolerada por via subcutânea, bem como a mais eficaz de P1G10 para modelos de tumor metastático e não metastático sobre a linhagem de camundongos C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub>.
- Determinar o tempo de sobrevivência de camundongos C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> portadores de melanoma, metastático ou não, tratados com P1G10.
- Avaliar marcadores angiogênicos tumorais, assim como inflamatórios em camundongos tratados com P1G10, como:
  - concentração de hemoglobina
  - dosagem da atividade de NAG
  - dosagem de VEGF, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$
- Avaliar se a biodistribuição de P1G10 é alterada na presença do tumor para os diferentes modelos.
- Avaliar a participação da atividade proteolítica de P1G10 na atividade antitumoral.

### **3) MATERIAIS E MÉTODOS:**

#### **3.1) MATERIAIS:**

##### **3.1.1) Biológicos:**

###### **3.1.1.1) Animais:**

- Camundongos da linhagem C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> apresentando entre 6-8 semanas fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UFMG (CEBIO)

###### **3.1.1.2) Linhagens celulares:**

- B16F1 (células de melanoma com baixo potencial de colonização pulmonar), gentilmente cedidas pelo Prof. Ricardo Brentani do Instituto Ludwig, São Paulo, SP, Brasil.
- B16F10 (células de melanoma com alto potencial de colonização pulmonar), gentilmente cedidas pelo Prof. Ricardo Brentani do Instituto Ludwig, São Paulo, SP, Brasil.
- CHO (células de ovário de hamster chinês), gentilmente cedidas pelo Prof. Ricardo Brentani do Instituto Ludwig, São Paulo, SP, Brasil
- BHK-21 (fibroblastos de rim de hamster), adquiridas através do Banco de Células do Rio de Janeiro (código CR007)
- CIPs (endotélio de aorta de coelho), gentilmente cedido pela Dr<sup>a</sup>. Helena Nader do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo (UNESP), São Paulo, SP, Brasil

###### **3.1.2) Reagentes químicos:**

- **Amershan Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra** - FBS (Soro Fetal Bovino).
- **Bristol-Meyes-Squibb Indústria Farmacêutica S/A, São Paulo, SP, Brasil** - Anfotericina B.

- **Calbiochem, St. Diego, EUA** - BSA 0,1% e 1% (albumina de soro bovino tipo V).
- **Gibco-BRL Corporate Headquarters, Gaithersburg, EUA** - Pancreatina, meio de cultura F12 Ham desidratado, meio de cultura RPMI - 1640 desidratado.
- **Instituto Adolpho Lutz, São Paulo, SP, Brasil** - ATV (solução aquosa de tripsina) contendo: tripsina (0,20 g), versene (0,02 g) e água deionizada q.s.p. (100 mL).
- **Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil** - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio), KCl P.A. (cloreto de potássio), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> P.A. (dihidrogenofosfato de potássico), NaCl P.A. (cloreto de sódio), NaOH P.A. (hidróxido de sódio), Twen 80 (polioxietilinsorbitano monolaurato).
- **Labtest Produtos para Análises Clínicas Ltda, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil** - Reagente de hemoglobina (KCN 500 mg/dL).
- **Laboratórios Wyeth-Whitehall, São Paulo, SP, Brasil** - Ampicilina sódica.
- **Merck, Darmstadt, Alemanha** - Bicarbonato de sódio P.A., DMSO (dimetil sulfóxido), EDTA P.A. (etileno-diamino-tetracetato dissódico dihidratado), etanol absoluto, fosfato monobásico de potássio P.A., fosfato monobásico e dibásico de sódio P. A., Triton X-100.
- **R & D Systems, Mineapolis, EUA** - Kits de imunoenensaio DuoSet® VEGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  anti-mouse.
- **Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA** - Ácido cítrico monohidratado; brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazólio ou sal de tetrazólio (MTT); EBSS (Earle's balanced salt solution); estreptomicina, HCl P.A (ácido clorídrico); hepes (N-[2-hydroxyetyl]-piperazine-N'-2 ethaneusulphonic acid); H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ácido sulfúrico); HTAB (Brometo de hexa - 1,6 - bis-deciltrimetilamônio); IAA (iodoacetamida); OPD (o-fenilenodiamina); TMB (3,3',5,5'- tetrametilbenzidina).
- **White Martins do Brasil S/A, Contagem, MG, Brasil** - Nitrogênio líquido.

- P1G10 produzida no Laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

### **3.1.3) Equipamentos:**

- **Abbott Laboratories, Chicago, EUA** - Contador gama ANSR.
- **Consul - Multibrás Eletrodomésticos S/A, São Bernardo do Campo, SP, Brasil** - Refrigerador ajustado à temperatura de +4°C; freezer à temperatura de – 20°C.
- **Fanem, São Paulo, SP, Brasil** – Banho-maria calibrado a 37°C, centrífuga Excelsa 2 modelo 205 N.
- **Fisher Scientific, California, EUA** - Ultra-sonicador modelo FS-28H.
- **Fizatron Equipamentos Elétricos para Laboratório, São Paulo, SP, Brasil** - Agitador magnético modelo 252.
- **Janke & Kunkel IKA, Labortenik, Alemanha** - Homogeneizador Ultra- turrax.
- **Mettler Micronal Instrumentos S/A, São Paulo, SP, Brasil** - Balança eletrônica analítica modelo MT-200.
- **Milipore Corporation, Bedford, EUA** - Deionizador de água por meio de osmose reversa.
- **Nevoni Equipamentos Médicos e Odontológicos, São Paulo, SP, Brasil** - Bomba aspirante modelo “H”.
- **Novatécnica Equipamentos para Laboratórios, Piracicaba, SP, Brasil** - Medidor de pH modelo NT-PH2 - equipado com eletrodo modelo V-620 C - Analion Aparelhos & Sensores Ind. & Com., Ribeirão Preto, SP, Brasil
- **Nuaire Equipaments, Pymouth, Minneapolis, EUA.** Estufa incubadora 36,5 °C, atmosfera controlada e contendo 2,5% CO<sub>2</sub> (v/v).
- **Olympus Corporation, New York, EUA.** Microscópio ótico linha CB, microscópio ótico invertido modelo CK2.



- **Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão.** Espectrofotômetro de duplo feixe para faixas UV (ultravioleta) e visível modelo UV-150-02.
- **Spectramax Plus, Molecular Devices, CA, EUA** - Leitor de microplacas de ELISA.
- **Thermolyne, Dubuque, Iowa, EUA** - Shaker Roto Mix modelo 48200.
- **Veco do Brasil Indústria & Companhia de Equipamentos, Campinas, SP, Brasil** - Capela com fluxo laminar de ar ultrafiltrado.

#### 3.1.4) Materiais diversos:

- **Biodinâmica, Iporã, PR, Brasil** - Fio de sutura Suturim 1x10 m.
- **Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EUA** - Tubos tipo "eppendorf" com capacidade para 0,5 e 1,5 mL.
- **Fenin-Optik, Blakenburg, Alemanha** - Câmaras de Neubauer.
- **Fizatron, Equipamentos Eletrônicos para Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil** - Barras magnéticas.
- **Gilson Sas, França** - Pipetadores automáticos com capacidade máxima de 2, 20, 200 e 1000 µl, acompanhados de ponteiras de polipropileno.
- **Millipore Corporation, Bedford, EUA** - Membranas filtrantes de nitrato de celulose, com 0,45 µm e 0,22 µm de diâmetro de poro.
- **Nunc Inter Med A/S, Roskilde, Dinamarca** - Garrafas de poliestireno de 50 ml para cultura, placas de poliestireno multicavidades de 96 cavidades.
- **Quimex Corning Incorporated, New York, New York, EUA** - Pipetas graduadas de vidro, tubos de polipropileno com fundo cônico de 15 e 50 ml de capacidade e dotados de tampa rosqueável.
- **Sigma Chemical Co, St. Louis, MD, EUA** - Saco de diálise com poro 10 kDa de diâmetro.
- **S.S White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil** - Material cirúrgico.

- **Sytat Software Inc., Richmond, California, EUA** - Software Sigma Plot versão 5.0 e Prisma versão 3.0 para análise de resultados em forma gráfica e testes estatísticos.
- **Vidrolabor-Thermex Astra Brasil Ind. Vidros, F. Vasconcelos, SP, Brasil** - Vidraria (kitazato de 1000 ml, béquer 1000 ml e tubos de ensaio com 14 X 1 cm de dimensões).

### 3.1.5) Fármacos utilizados:

- **Cespo industria e Comércio Ltda, Jacareí, São Paulo** – Quetamina (Dopalen®).
- **Laboratórios Calier S.A., Barcelona, Espanha** – Xilasina (Dopaser®).
- **Valeant Farmacêutica do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil** – 5-Fluorouracila (Fluoro- Uracil®) solução injetável 250 mg/10 mL.

### 3.1.6) Soluções:

- Fosfato de sódio a 0,1 M :

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....7,09 g  
 Água destilada q.s.p..... 500,00 mL

- Glicina a 0,8 M :

Glicina.....15,01 g  
 Água destilada q.s.p.....250,00 mL

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1,2 mM em tampão fosfato de sódio:

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....1,60 µL  
 Tampão fosfato de sódio 80 mM.....25,00 mL

- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 4 M :

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.....115,00 mL

Água destilada q.s.p.....500,00 mL

- Meio F12 HAM (NaHCO<sub>3</sub> 31 mM, Hepes 10 mM, Ampicilina 0,27 mM, Estreptomicina 0,06 mM) :

Meio F12 Ham desidratado (comercial).....10,60 g

Bicarbonato de sódio .....2,67 g

Hepes.....2,38 g

Ampicilina sódica .....0,10 g

Estreptomicina .....0,10 g

Água deionizada q.s.p. ....1,00 L

*Após ajustado o pH, 0,005 g de Anfotericina B foi adicionado e esterilizado por filtração em membrana Millipore com porosidade absoluta de 0,22 µm.*

- Meio RPMI-1640 pH 7,4 (NaHCO<sub>3</sub> 14 mM, Hepes 4 mM, Ampicilina 0,27 mM, Estreptomicina 0,06 mM) :

Meio RPMI-1640 desidratado (comercial) .....10,43 g

Bicarbonato de sódio .....1,20 g

Hepes .....2,38 g

Ampicilina sódica.....0,10 g

Estreptomicina .....0,10 g

Água deionizada q.s.p. ....1,00 L

*Após ajustado o pH, 0,005 g de Anfotericina B foi adicionado e esterilizado por filtração em membrana Millipore com porosidade absoluta de 0,22 µm*

- NaCl a 0,8 M :

NaCl.....11,70 g

Água destilada q.s.p.....250,00 mL

- NaOH a 0,8 M :

NaOH.....8,00 g

Água destilada q.s.p.....250,00 mL

- p-nitrofenil-N-acetil-b-D-glicosamina a 2,24 mM :

p-nitrofenil-N-acetil-b-D-glicosamina.....0,77 mg

Tampão citrato/fosfato.....1,00 mL

- PBS pH 7,2 - 7,4 :

NaCl .....8,00 g

KCl.....0,20 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....1,15 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0,21 g

Água deionizada q.s.p.....1,00 L

- Reagente diluente (utilizado nos ensaios imunoenzimáticos) :

PBS estéril.....40,00 mL

BSA 0,1%.....0,04 g

- Solução de ácido cítrico a 0,1 M :

Ácido cítrico monohidratado.....10,51 g

Água destilada q.s.p.....500,00 mL

- Solução de ácido sulfúrico a 4M :

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (18M).....115,00 mL

Água destilada q.s.p.....500,00 mL

- Solução anestésica “Ketapun” (quetamina 10% e xilasina 2%) :

Quetamina 10%.....10,00 mL

Xilasina 2%.....7,50 mL

- Solução de Drabkin :

Reagente de hemoglobina (KCN 500 mg/dL).....10,00 mL

Água destilada..... 990,00 mL

- Solução de HTAB (brometo de hexa – 1,6 - bis- deciltrimetilamônio) a 5% :

HTAB.....	0,10 g
Tampão fosfato de sódio (80 mM, pH 5,4).....	20,00 mL
• <u>Solução NaCl 0,9% :</u>	
NaCl.....	0,90 g
Água destilada q.s.p.....	100,00 mL
• <u>Solução de pancreatina 0,2 % v/v em tampão EBSS pH 7,4 :</u>	
Pancreatina.....	1,00 mL
EBSS q.s.p.....	10,00 mL
• <u>Solução para paralisação da reação (VEGF) :</u>	
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4M.....	30,00 mL
Água destilada q.s.p.....	10,00 mL
• <u>Solução Triton X-100 :</u>	
Triton X- 100.....	1,00 mL
Solução salina a 0,9% q.s.p.....	1,00 L
• <u>Tampão de bloqueio (ensaios imunoenzimáticos) :</u>	
PBS estéril.....	40,00 mL
BSA 1%.....	0,40 g
• <u>Tampão citrato/fosfato (pH 5) :</u>	
➤ Solução A:	
Ácido cítrico 0,1 M.....	9,60 g
Água deionizada q.s.p.....	500,00 mL
➤ Solução B:	
Fosfato de sódio dibásico.....	35,82 g

Água deionizada q.s.p.....500,00 mL

➤ Tampão citrato/ fosfato:

Solução A.....24,30 mL

Solução B.....25,70 mL

Água deionizada q.s.p.....100,00 mL

• Tampão glicina a 0,2 M :

Glicina a 0,8 M.....100,00 mL

NaCl a 0,8 M.....100,00 mL

NaOH a 0,8 M.....100,00 mL

• Tampão de lavagem (ensaios imunoenzimáticos) :

Polioxietilinsorbitano monolaurato 20 (Tween 20).....650,00 µL

PBS.....1,30 L

• TMB (3,3',5,5'- tetrametilbenzidina).a 6,4 mM em DMSO :

TMB.....1,54 mg

DMSO.....1,00 mL

• Polioxietilinsorbitano monolaurato 20 (Tween 20) :

Polioxietilinsorbitano monolaurato 20 (Tween 20).....1,00 mL

Água deionizada estéril.....3,00 mL

## **3.2) METODOLOGIA:**

### **3.2.1) Obtenção de P1G10:**

A fração proteolítica foi obtida e fornecida pelo Prof. Carlos Edmundo Salas Bravo do Laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB, UFMG.

Na preparação, 3,0 g de látex liofilizado de *C. candamarcensis* foi suspenso em 20 mL de tampão acetato de sódio 1 M (pH 5,0); contendo cisteína, 25 mM; EDTA, 10 mM; e DTT, 5 mM. Após 30 minutos de agitação lenta à temperatura ambiente, o material foi centrifugado durante 10 minutos a 9000 x G a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 µm de porosidade e constituiu o “látex ativado”, usado posteriormente na purificação.

A resina “Sephadex G-10” (50 g) foi equilibrada durante 48 horas com 200 mL de tampão acetato de sódio 1 M (pH 5,0). Em seguida, o sobrenadante obtido anteriormente foi aplicado sobre a resina, utilizando acetato de sódio 1 M (pH 5,0) com um fluxo constante de 0,25 mL/minuto à temperatura ambiente e coletando frações de 5 mL, as quais posteriormente foram triadas mediante a determinação da densidade óptica em 280 e 405 nm (concentração de proteína e atividade amidásica, respectivamente) (Gomes et al, 2005).

#### **3.2.1.1.) Inibição de P1G10 por iodoacetamida:**

Para a inibição enzimática de P1G10, se utilizou com o inibidor irreversível iodoacetamida (IAA). Inicialmente, foi preparada uma solução aquosa (35 mL) de P1G10 na concentração de 2 mg/mL, à qual foram adicionados 4,9 µg de DTT. A solução resultante foi incubada à 4 °C, sob agitação constante, por 30 min. Após este período, a solução foi incubada com 2,94 mg de IAA por 100 minutos. As amostras então foram dialisadas com leve agitação contra 2500 mL de água mili-Q a 4°C durante 48 h (trocando a água a cada 12 h), para eliminar o excesso de inibidor. Após este procedimento, as amostras foram esterilizadas e estavam prontas para os ensaios biológicos (Gomes et al, 2005).

### 3.2.1.2) Marcação de P1G10 com $^{99m}\text{Tc}$ :

As amostras de P1G10 foram marcadas radioativamente e fornecidas pelo Laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia da UFMG sob coordenação do Prof. Valbert Cardoso. Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  das soluções de P1G10 foram incubadas à temperatura ambiente durante 20 minutos com  $\text{SnCl}_2$  e 2  $\mu\text{L}$  de borohidreto de sódio. O pH foi ajustado para 7,0 e adicionado à mistura 100  $\mu\text{L}$  das soluções de pertecnetato de sódio, aguardando por 20 minutos para posterior determinação do rendimento de marcação e separação das impurezas radioquímicas executadas conforme já padronizado anteriormente no laboratório citado.

### **Avaliação *in vitro*:**

### 3.2.2) Avaliação da citotoxicidade de P1G10:

#### 3.2.2.1) Cultivo celular:

O teste utilizado para avaliação da citotoxicidade foi o teste do MTT. As células B16F10, B16F1, CHO e BHK-21 foram cultivadas em meio RPMI 1640 a 5% (v/v) de FBS, enquanto que para as células CIPs, o meio utilizado foi o F12-Ham suplementado com 10% FBS. Todas as linhagens foram mantidas em estufa a 5% de  $\text{CO}_2$  e 37° C com atmosfera úmida. Ao atingirem aproximadamente 90% de confluência, subcultivos das linhagens foram realizados para ampliação da cultura e posterior congelamento. As células B16F10, B16F1, CHO e BHK-21 foram inicialmente lavadas com PBS/EDTA pH 7,4 e em seguida adicionou-se tripsina a 0,2% (v/v) para a retirada das células aderidas à superfície do frasco de cultivo. Quando as células apresentavam-se completamente desprendidas, foi adicionado meio RPMI com 5% FBS para inativar a tripsina. Já nas células CIPs o mesmo procedimento foi executado, no entanto a enzima utilizada foi a pancreatina 0,2% (v/v) em tampão EBSS e para a inativação da mesma foi utilizado o meio F12 Ham 10% de FBS. O congelamento para a manutenção das células viáveis em estoque foi efetuado a partir da preparação de criotubos contendo alíquotas de 650  $\mu\text{L}$  das



linhagens celulares (em 30% FBS e 10% DMSO). As alíquotas foram inicialmente congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por duas horas e depois estocados em nitrogênio líquido.

### 3.2.2.2) Avaliação da viabilidade celular pelo método do MTT:

A suspensão celular obtida foi semeada em placas de poliestireno de 96 cavidades nas densidades de  $0,8 \times 10^3$  células/cavidade (B16F10 e B16F1);  $1,0 \times 10^3$  células/cavidade (CHO e BHK-21) ou  $2,5 \times 10^3$  células/cavidade (CIPs), suspensas em 100  $\mu\text{L}$  de meio RPMI mais 5% (v/v) de FBS ou F12 Ham com 10% de FBS para CIPs. As culturas foram incubadas em estufa a  $36,5^{\circ}\text{C}$  com atmosfera úmida e 5% (v/v) de  $\text{CO}_2$ . Após adesão dessas células na superfície das cavidades, essas foram expostas a concentrações diferenciadas da fração P1G10 (variando entre  $10^{-8}$  e  $10^{-4}$  g/mL), sendo que os controles receberam apenas meio/soro.

Os testes foram realizados em hexaplicatas. Houve exposição das células à fração proteolítica por 120 horas. Anteriormente à leitura, foi realizada a adição de 10  $\mu\text{L}$  de uma solução de sal de tetrazólio (5 mg/mL) em cada cavidade (resultando na concentração final de 0,05 mg/10  $\mu\text{L}$ ) e, 4 horas após, os cristais de sal de tetrazólio (formazan) foram diluídos em 100  $\mu\text{L}$  de DMSO. Então, realizou-se a leitura espectrofotométrica (540 nm). Para o cálculo da concentração inibitória para 50% da população, as médias aritméticas das densidades óticas obtidas para os controles foram consideradas como 100% de viabilidade celular. A porcentagem de células viáveis foi calculada, então, pela fórmula:  $B/A \times 100$ , onde A= média aritmética da densidade ótica do controle e B = média aritmética da densidade ótica na presença da amostra (Heo et al, 1990).

- Análise estatística:

O teste estatístico dos dados obtidos foi feito utilizando a análise de variância, one-way ANOVA pós teste Dunnett (GhaphPad Prism 5), os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Em seguida, através de regressão linear utilizando o programa SigmaPlot 8.0, determinou-se a concentração inibitória para 50% da população celular ( $\text{IC}_{50}$ ).

## **Avaliação *In vivo*:**

### **3.2.3) Avaliação da atividade antitumoral de P1G10:**

Células B16F1 (células de melanoma com baixo potencial metastático) foram cultivadas e obtidas conforme descrito no item 3.2.2.1. Após a obtenção da suspensão celular, esta foi centrifugada e suspensa em RPMI 1640 (veículo utilizado na administração) e, então, foram inoculadas subcutâneamente (s.c.) no volume de 100 µL, contendo  $5 \times 10^5$  células, na região do flanco direito de camundongos C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub>. (Zuberek et al, 2003).

#### **3.2.3.1) Avaliação da variação da massa tumoral:**

O tratamento foi iniciado quatro dias após o inóculo de células por via s.c e feito diariamente por 15 dias. Os animais foram separados em três grupos: o controle que recebeu somente veículo (solução salina a 0,9%) e os grupos testes que receberam a substância na dose de 1 e 5 mg/kg. Os animais foram pesados em dias alternados para ajuste da dose.

Ao término do tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os tumores tiveram suas massas mensuradas.

- **Análise estatística:**

Os resultados obtidos das massas dos tumores foram expressos como média ± erro padrão da média e comparados com os controles através da análise de variância, one-way ANOVA pós teste Bonferroni (GhaphPad Prism 5). Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

#### **3.2.3.2) Avaliação do tempo de sobrevivência:**

Após o inóculo celular inicial ( $5 \times 10^5$  células em 100 µL), foram formados 3 grupos de animais: o grupo controle negativo, tratado com solução salina 0,9%; o grupo tratado com a dose mais eficaz de P1G10 via s.c e o grupo controle positivo, tratado com um fármaco com eficácia reconhecida contra o tratamento de uma ampla variedade de cânceres, o fluoruracil (5-FU), na dose de 20 mg/kg por via *i.p.* (Baez

et al, 2007). O tratamento teve a duração de 15 dias para todos os grupos, porém para o grupo tratado com o 5-FU foi realizado em ciclos de 5 dias. Após o término do tratamento, foi feito o acompanhamento diário dos animais e foram contabilizados os óbitos/dia. Os animais mortos tiveram seus tumores removidos e suas massas foram medidas. Os resultados obtidos foram expressos em percentual de mortalidade nos tempos de 1 a 8, 9 a 12 e 13 a 15 dias após o término do tratamento (Ashour et al, 2007).

- Análise estatística:

Os dados obtidos foram expressos graficamente pela curva de sobrevivência de Kaplan – Meier e os resultados comparados entre si pelo teste de Logrank. Os valores das massas tumorais apresentados pelos grupos foram comparados entre si pelo Teste t de Student. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

### 3.2.3.3) Avaliação da dependência da atividade proteolítica de P1G10 em seu efeito antitumoral:

Inicialmente, as células ( $5 \times 10^5$  células em  $100 \mu\text{L}$ ) foram inoculadas por via s.c. e 3 grupos de animais foram formados: um controle (tratado com solução salina 0,9%), um grupo tratado com P1G10 na dose mais eficaz e outro tratado com a dose mais eficaz de P1G10, porém com inibição da atividade proteolítica por iodoacetamida (IAA). Após 15 dias de tratamento diário, os animais foram sacrificados por exsanguinação, sendo o sangue coletado e os tumores removidos para medida de suas massas.

- Análise estatística:

Os resultados obtidos das massas dos tumores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e comparados com os controles através da análise de variância, one-way ANOVA pós teste Bonferroni (GraphPad Prism 5). Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

#### 3.2.3.4) Avaliação do efeito de P1G10 sobre a angiogênese tumoral:

Neste ensaio, foram utilizados os tumores e o sangue coletados durante o experimento de avaliação da dependência da atividade proteolítica na atividade antitumoral de P1G10. Os tumores relativos aos grupos controle e tratado com a dose mais eficaz de P1G10 foram homogeneizados, fracionados e separados em criotubos. O sangue foi centrifugado por 10 minutos a 12.000 r.p.m para obtenção do soro. Os tecidos e o soro foram mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Os parâmetros utilizados para a avaliação da atividade angiogênica da fração foram as dosagens: de hemoglobina (Hb), da atividade da N-acetil-b-D glicosaminidase (NAG) e a determinação dos níveis das citocinas VEGF, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  (Teixeira et al, 2006).

##### 3.2.3.4.1) Quantificação da angiogênese através da dosagem de hemoglobina (Hb):

A avaliação da angiogênese foi realizada através do método colorimétrico de Drabkin & Austin (1935) adaptado por Plunkett (1990). Para este experimento, aos fragmentos tumorais (cujas massas tinham valores de aproximadamente 100 mg) foram adicionados 2 mL de reagente de Drabkin e homogeneizados com o auxílio do aparelho homogeneizador ultra-turrax. Esse homogenato foi centrifugado por 40 minutos a 10.000 r.p.m e filtrado em filtro Milipore de  $0,22\ \mu\text{m}$ . As amostras em duplicatas (100  $\mu\text{L}$  por cavidade), assim como o padrão foram distribuídos em placas de 96 poços. A concentração de Hb foi determinada através de leitura espectrofotométrica a 540 nm em leitor de ELISA e os valores obtidos foram divididos pelos valores de suas respectivas massas e comparados às de uma curva padrão de Hb previamente estabelecida.

##### 3.2.3.4.2) Dosagem da atividade da N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG):

Esse ensaio foi feito utilizando parte do sedimento obtido na dosagem de Hb ao qual foi adicionada solução de NaCl a 0,9% contendo 0,1 % (v/v) de Triton-X-100. Houve a homogeneização por 30 segundos e a centrifugação por 10 minutos a 3.000 r.p.m a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante (100  $\mu\text{L}$ ) foi utilizado para a realização do ensaio. Foram adicionados à placa de 96 poços 100  $\mu\text{L}$  das amostras, 100  $\mu\text{L}$  do substrato p-nitrofenil-N- acetil- $\beta$ -D- glicosamina e 2,24 mM em tampão citrato/fosfato de sódio

0,1 M pH 4,5. Após uma incubação a 37° C durante 10 minutos, foram adicionados 100 µL de tampão glicina 0,2 M pH 10,6 para paralisar a reação. A absorbância foi medida por leitura espectrofotométrica a 405 nm e os resultados obtidos foram expressos em densidade ótica (Teixeira et al, 2006).

#### 3.2.3.4.3) Ensaio imunoenzimático para dosagem de VEGF, TNF- $\alpha$ e TGF- $\beta$ :

As amostras dos tumores (100 µL do sobrenadante da dosagem de Hb) e do soro (150 µL) foram homogeneizadas em 500 µl de PBS pH 7,4 contendo 0,05% de Tween 20, centrifugadas a 12.000g/4° C por 30 minutos e o sobrenadante foi reservado. As citocinas foram dosadas em 150 µL do sobrenadante usando kits de imunoenensaio da R & D Systems, seguindo seus protocolos. A placa de microtitulação foi sensibilizada com 100 µL/ cavidade de anticorpo primário (anti-camundongo) específico para a citocina a ser avaliada e incubada a 4° C *overnight*. A placa foi lavada por 6 vezes com 400 µL de PBS pH 7,4 contendo 0,05% de Tween 20 (tampão de lavagem). Foram, então, adicionados à placa 200 µL/ poço de PBS pH 7,4 com 1% BSA (Albumina de Soro Bovino), seguido de incubação por 1 hora para bloquear os sítios de ligações inespecíficas. A placa foi novamente lavada com tampão de lavagem. Os padrões e as amostras diluídas em PBS pH 7,4 com 0,1% BSA e 0,05% Tween 20 (100 µL por poço) foram adicionadas à placa e incubados a 4°C *overnight*. A placa foi lavada com o tampão de lavagem e foram adicionados 100 µL/cavidade do apropriado anticorpo de detecção biotilado e incubado por 2 horas. A placa foi lavada com o tampão de lavagem novamente e foram adicionados 100 µL/ poço do conjugado estreptavidina-peroxidase e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após nova lavagem da placa, 100 µL/ poço de OPD foi diluído em tampão citrato a 0,03% pH 5,0 contendo 0,02% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 v/v foram adicionados. A placa foi incubada abrigada de luz durante 30 minutos. A reação foi interrompida por adição de 50 µL/cavidade de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. A leitura das placas foi feita em espectrofotômetro a 492 nm. Todas as amostras foram ensaiadas em duplicata e as incubações (exceto *overnight*) foram à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em µg/mg de tecido ou µg/ml. Uma curva-padrão, com sete pontos, foi construída usando, diluições seriadas a partir de 1000 µg/ml (Ferreira et al, 2007).

- Análise estatística:

Os resultados obtidos nos ensaios anteriores (em  $\rho\text{g}/\text{mg}$  de tumor para dosagem de Hb, OD/mg tumor para dosagem de NAG,  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tumor para dosagem de citocinas no tumor ou  $\text{mg}/150\ \mu\text{L}$  de soro para dosagem de citocinas no soro) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e comparados com os controles através do Teste t de Student (GhaphPad Prism 5). Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

### 3.2.3.5) Biodistribuição de P1G10:

Neste ensaio, camundongos C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> foram subdivididos em 2 grupos: um grupo sadio (que não recebeu o inóculo celular) e o grupo portador de melanoma B16F1 (que recebeu inóculo celular na densidade de  $5 \times 10^5$  células em  $100\ \mu\text{L}$ ). O tratamento com P1G10  $5\ \text{mg}/\text{kg}$  foi iniciado quatro dias após o inóculo de células por via s.c., por 15 dias diariamente, sendo ao final do tratamento administrado P1G10 marcada com <sup>99m</sup>Tc. Os animais foram sacrificados em tempos diferenciados ao longo do tratamento (1<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup> e 16<sup>o</sup> dia).

A distribuição tecidual foi determinada 1 hora após a administração, nos animais previamente anestesiados com mistura de xilasina e quetamina na proporção de 7,5:10 (0,1 mL/ 100 g de peso do animal via intramuscular) para a coleta de sangue. Os animais foram sacrificados, tiveram seus tumores removidos e suas massas determinadas. As porcentagens em relação à dose injetada presente nos tumores e as porcentagens em relação à dose injetada por grama de tumor foram calculadas para determinação da taxa de captação.

- Análise estatística:

Os resultados obtidos para a captação tumoral de P1G10 foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e comparados com os controles através da análise de variância, one-way ANOVA pós teste Bonferroni (GhaphPad Prism 5). As diferenças foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

#### 3.2.3.5.1) Imagens cintilográficas:

Para obtenção das imagens cintilográficas, os animais tratados com P1G10 5 mg/kg marcada com  $^{99m}\text{Tc}$ . foram anestesiados e, em seguida, posicionados em decúbito ventral. Através das imagens, é possível avaliar a biodistribuição de P1G10 no organismo do animal. As imagens foram obtidas pela gama câmara no tempo de 1 hora após a administração e o detector foi posicionado de forma a ficar sobre a região posterior do animal.

### **3.2.4) Avaliação da atividade antimetastática de P1G10 :**

Células B16F10 (células de melanoma com alto potencial de colonização pulmonar) foram cultivadas e obtidas conforme descrito no item 3.2.2.1 e, então, foram centrifugadas e suspensas em RPMI 1640 (veículo usado na administração). Foram inoculados 100  $\mu\text{l}$  da suspensão celular contendo  $5 \times 10^4$  células, por via s.c., na orelha direita dos camundongos C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub>. Quinze dias após o inóculo inicial, os animais foram anestesiados com xilasina e quetamina na proporção de 7,5 : 10 (0,1 mL/ 100 g de peso do animal via *i.m.*) para realização da cirurgia de remoção das orelhas, de forma a extirpar completamente o tumor (Fidler et al, 1978) .

#### **3.2.4.1) Avaliação da ocorrência e número de pontos de metástase:**

Os animais foram divididos em 4 grupos: o controle (tratado com solução salina a 0,9%) e outros três que receberam a fração nas doses de 1; 5 e 10 mg/kg por 21 dias diariamente por via s.c. Os animais foram pesados em dias alternados para ajuste da dose. O tratamento iniciou-se no dia da cirurgia e, após o seu término, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, tiveram seus pulmões removidos e analisados quanto ao percentual de ocorrência e número de pontos de metástases. Esses foram classificados em relação ao tamanho com o auxílio de uma lupa (pontuais ou menores de 1 mm, até 3 mm e acima de 3 mm).

- **Análise estatística:**

Os resultados obtidos foram expressos em percentual de ocorrência e número de pontos metastáticos. Esse último foi expresso como média  $\pm$  erro padrão da média e comparados com os controles através da análise de variância, one-way ANOVA pós

teste Dunnet (GhaphPad Prism 5). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

#### 3.2.4.2) Avaliação do tempo de sobrevivência:

Após o inóculo celular inicial ( $5 \times 10^4$  em 100  $\mu\text{L}$ ) e cirurgia, os animais foram divididos em 3 grupos : o grupo controle negativo tratado com solução salina 0,9%; o grupo tratado com a dose mais eficaz de P1G10 via s.c. e o grupo controle positivo, tratado com fluoruracil, cuja administração foi realizada em ciclos de 5 dias na dose de 20 mg/kg via *i.p.* Para todos os grupos, o tratamento teve a duração de 21 dias. Após o término do tratamento, foi feito o acompanhamento diário dos animais e foram contabilizados os óbitos/dia. Os animais mortos tiveram seus pulmões avaliados quanto à ocorrência e número de pontos de metástase. Os resultados obtidos foram expressos em percentual de mortalidade e ocorrência percentual de metástase nos tempos de 1 a 9, 10 a 12 e 13 a 16 dias após o término do tratamento (Baez et al, 2007) .

- Análise estatística:

Os dados obtidos foram expressos graficamente pela curva de sobrevivência de Kaplan – Meier e os resultados comparados entre si pelo teste de Logrank. As diferenças entre os números de pontos de metástases apresentadas pelos grupos foram comparadas entre si pelo Teste t de Student.

#### 3.2.4.3) Biodistribuição de P1G10:

Para marcação de P1G10, em amostras de 1 mg da fração, dissolvidas em 100  $\mu\text{L}$  de NaCl a 0,9% p/v, foram acrescentados de 4 a 40  $\mu\text{g}$  de cloreto estano (SnCl<sub>2</sub> diluído em HCl 0,25 N) e 2  $\mu\text{L}$  de borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub> 10,0 mg/mL em NaOH 0,1 M). O pH foi ajustado para 7,0 e após 20 minutos de incubação, foi adicionado à mistura de 1 a 5 mCi de pertecnetato de sódio (Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>). Aguardou-se 20 minutos para posterior determinação do rendimento de marcação e separação das impurezas radioquímicas(Lemos et al, 2008).



Camundongos C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> foram subdivididos em 2 grupos: um grupo sadio (que não recebeu o inóculo celular) e o grupo portador de melanoma B16F10 (que recebeu inóculo celular na densidade de  $5 \times 10^4$  células em 100  $\mu$ L e sofreu cirurgia). O tratamento com P1G10 5 mg/kg foi iniciado imediatamente após a remoção cirúrgica das orelhas por via *s.c.*, por 21 dias diariamente. Os animais foram sacrificados em tempos diferenciados ao longo do tratamento (2<sup>o</sup>, 9<sup>o</sup> e 16<sup>o</sup>) e, apenas no dia do sacrifício, foram tratados com P1G10 marcada com <sup>99m</sup>Tc.

A distribuição tecidual foi determinada 1 hora após a administração da fração, nos animais previamente anestesiados com mistura de xilasina e quetamina na proporção de 7,5:10 (0,1 mL/ 100 g de peso do animal via intramuscular) para coleta de sangue. Os animais foram sacrificados para a remoção, pesagem e determinação da radioatividade dos pulmões, através da leitura em contador gama ANSR. As porcentagens em relação à dose injetada presente em cada pulmão e as porcentagens em relação à dose injetada por grama de pulmão foram calculadas para determinação da taxa de captação (Nunan et al, 2002; Lemos et al, 2008).

#### 3.2.4.3.1) Imagens cintilográficas:

Para obtenção das imagens cintilográficas, os animais tratados com P1G10 5 mg/kg marcada com <sup>99m</sup>Tc foram anestesiados por via *i.p.* e, em seguida, posicionados em decúbito ventral. As imagens mostram a biodistribuição de P1G10 no organismo do animal e foram obtidas pela gama câmara no tempo de 1 hora após a administração, sendo o detector posicionado de forma a ficar sobre a região posterior do animal.

- Análise estatística:

Os resultados obtidos para a captação pulmonar de P1G10 foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e comparados com os controles para cada tempo (2<sup>o</sup>, 9<sup>o</sup> e 16<sup>o</sup> dias) através do Teste t de Student (GhaphPad Prism 5), sendo os valores considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

#### **4) RESULTADOS :**

Com o intuito de avaliar a atividade antitumoral e antimetastática de P1G10, estudamos *in vivo*, sua ação em modelos de melanoma não metastático - B16F1 e metastático – B16F10, bem como iniciamos ensaios para delinear o mecanismo de ação da fração, considerando como possíveis atividades envolvidas a citotóxica e a antiangiogênica. Os resultados obtidos, através desses experimentos, estão descritos abaixo.

##### **Avaliação *in vitro*:**

##### **4.1) Citotoxicidade de P1G10 sobre linhagens de células normais e tumorais:**

A citotoxicidade em linhagens celulares foi avaliada após o plaqueamento de linhagens normais e tumorais e exposição das mesmas por 120 horas a concentrações de P1G10 variando entre  $10^{-8}$  a  $10^{-4}$  g/mL e posterior análise da viabilidade celular pelo método colorimétrico do MTT. O percentual de células viáveis foi calculado e, a partir da curva de regressão linear, foram determinadas as concentrações inibitórias para 50% da população ( $IC_{50}$ ). O tratamento com a fração mostrou efeitos citotóxicos concentração dependente, tanto para as células normais (CHO, BHK-21 e CIPs) quanto para as células tumorais (B16F1 e B16F10).

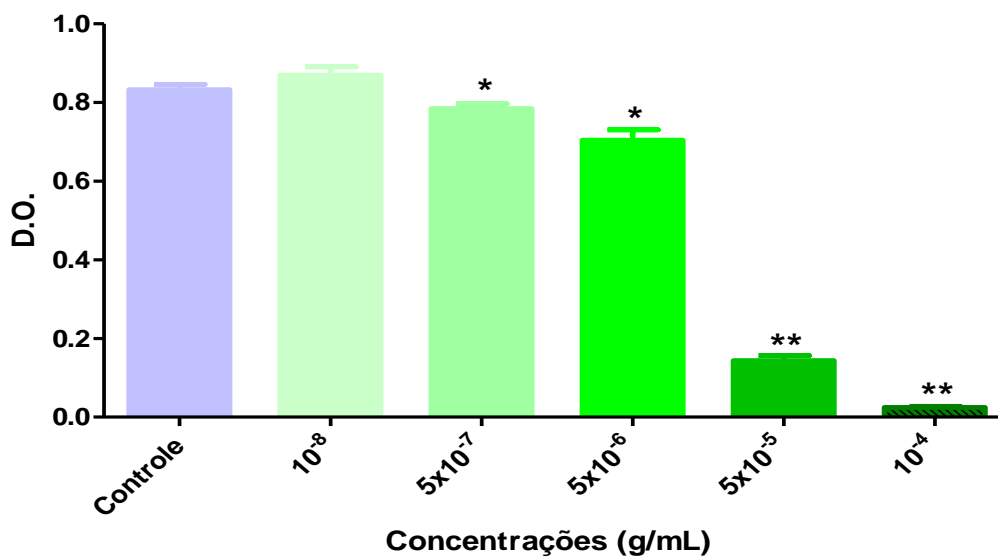
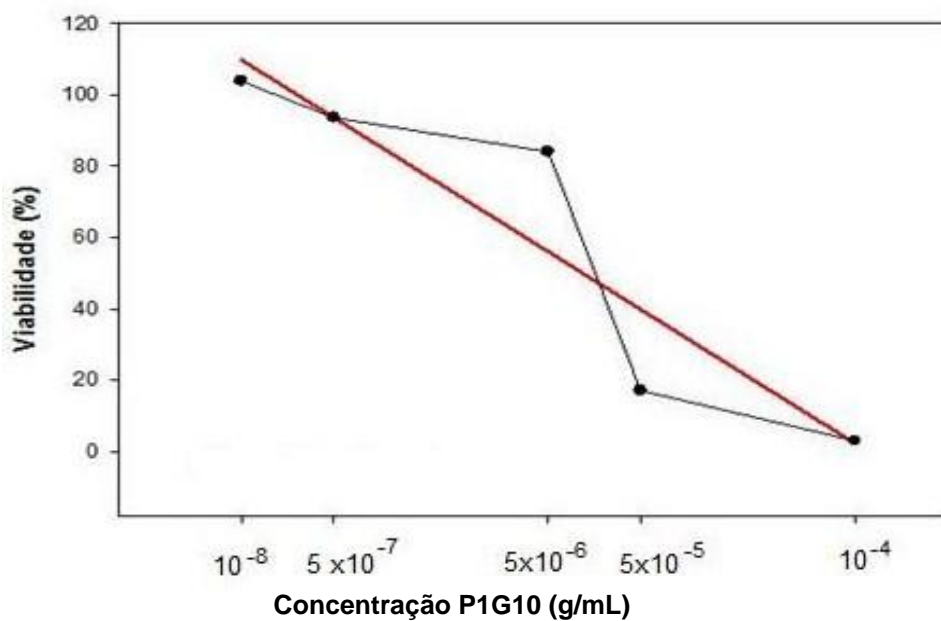
Podemos observar na Tabela 1 que as doses inibitórias apresentam valores de  $IC_{50}$  semelhantes para todas as linhagens estudadas. Estes valores variaram entre  $10^{-6}$  e  $10^{-5}$ , sendo a  $IC_{50}$  mais baixa ( $1,74 \times 10^{-6}$  g/mL) encontrada para a linhagem normal CHO.

**Tabela 1. Determinação da IC<sub>50</sub> de P1G10 sobre linhagens celulares normais e tumorais.**

<b>Linhagens celulares</b>	<b>IC<sub>50</sub> (g/mL)</b>
<b>Tumorais</b>	
B16F1	3,23 x 10 <sup>-5</sup>
B16F10	3,32 x 10 <sup>-5</sup>
<b>Normais</b>	
CHO	1,74 x 10 <sup>-6</sup>
CIPs	1,66 x 10 <sup>-5</sup>
BHK-21	6,31 x 10 <sup>-5</sup>

Células foram expostas por 120 horas a concentrações crescentes da fração, sendo a viabilidade celular determinada pela metabolização do MTT. As IC<sub>50</sub> foram determinadas após a regressão linear dos dados experimentais. (B16F1 = células de melanoma com baixo potencial de colonização pulmonar, CHO = células de ovário de hamster chinês, CIPs= células de endotélio de aorta de coelho, BHK-21 = fibroblastos de rim de hamster baby)

Na Figura 1A, estão apresentados os valores das densidades óticas obtidas para as diferentes concentrações de P1G10 utilizadas sobre a linhagem celular BHK-21. A Figura 1B mostra um gráfico representativo do perfil da atividade citotóxica da fração observada na figura anterior, considerando que os perfis e valores de IC<sub>50</sub> foram semelhantes para todas as linhagens estudadas.

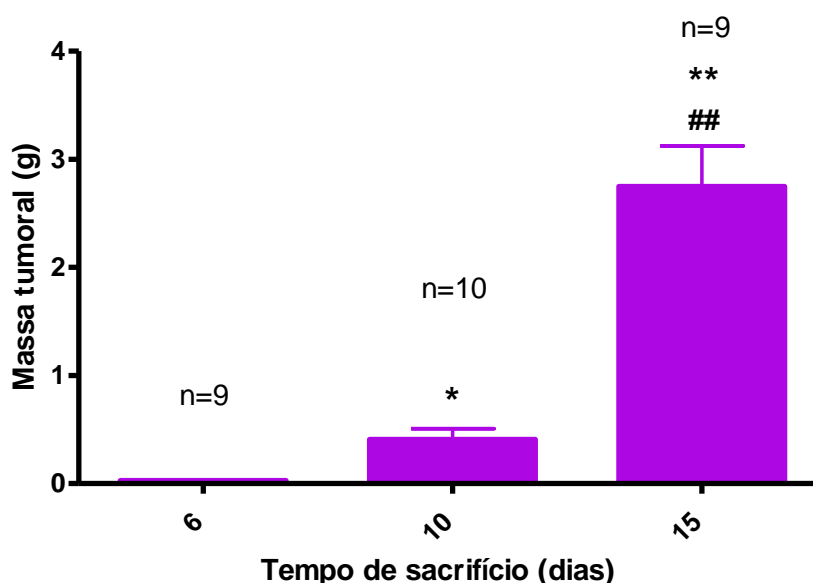
**A****B**

**Figura 1. Gráficos representativos da determinação da  $IC_{50}$  de células normais e tumorais à P1G10.** Células BHK-21 (fibroblastos de rim de hãmur de hamster) foram expostas a concentrações crescentes de P1G10 por 120 horas e a viabilidade celular avaliada ao final do período pelo teste do MTT. **(A)** Valores das densidades óticas (D.O.) obtidas para cada concentração, sendo o controle considerado como 100% de viabilidade celular (\* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ , comparados ao grupo controle, ANOVA pós teste Dunnett). **(B)** Após ajuste dos dados por regressão linear, determinou-se a  $IC_{50}$  correspondente.

## Avaliações *in vivo* :

### 4.2) Atividade antitumoral em animais tratados com P1G10:

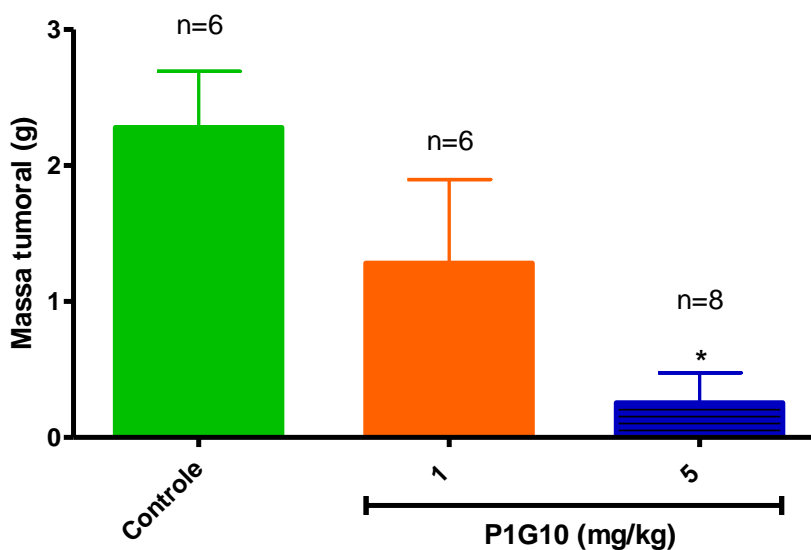
Para a determinação do crescimento dos tumores em função do tempo, camundongos C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> receberam inóculo celular (B16F1), via subcutânea (s.c.) na densidade celular de  $5 \times 10^5$  células em 100  $\mu$ L. Os animais foram sacrificados em intervalos de tempo de 6, 10 e 15 dias, após o inóculo. Observou-se o perfil do crescimento da massa tumoral, sendo que os valores foram de  $0,03 \pm 0,13$  g para tumores removidos em 6 dias;  $0,41 \pm 0,32$  g para os removidos em 10 dias (\* $p < 0,05$ , comparado ao grupo de 6 dias) e  $2,75 \pm 1,13$  g (\*\* $p < 0,01$ , comparado ao grupo de 6 dias e ##  $p < 0,01$ , comparado ao grupo de 10 dias, ANOVA pós teste Bonferroni) para os removidos em 15 dias (Figura 2). Nesta última medida, se observou que a massa tumoral foi equivalente a 9,16% da massa corporal total do animal (cerca de 30 g).



**Figura 2. Determinação do crescimento de melanoma B16F1 em camundongos C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> em função do tempo.** Camundongos C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> receberam inóculos de B16F1 ( $5 \times 10^5$  células em 100  $\mu$ L), foram sacrificados após 6 ; 10 e 15 dias e tiveram suas massas tumorais medidas (\* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  comparados ao grupo de 6 dias; ##  $p < 0,01$ , comparado ao grupo de 10 dias, ANOVA com pós teste Bonferroni).

#### 4.2.1) Variação da massa tumoral:

A atividade antitumoral foi avaliada após 15 dias de tratamento com P1G10 via s.c., o qual foi iniciado 4 dias após o inóculo celular. Três grupos foram formados: controle, P1G10 nas doses de 1 e de 5 mg/kg, sendo os animais pesados em dias alternados para ajuste da dose. Ao término do tratamento os animais foram sacrificados e tiveram suas massas tumorais medidas. Foi observada uma redução de 88,6% da massa tumoral do grupo tratado com a dose de 5 mg/kg ( $0,26 \pm 0,62$  g) em relação ao grupo controle ( $2,28 \pm 1,01$  g,  $*p < 0,05$ , ANOVA com pós teste Bonferroni). O grupo tratado com a dose de 1 mg/kg ( $1,28 \pm 1,51$  g) também demonstrou redução da massa tumoral (43,9% em relação ao controle) porém, não foi encontrada diferença estatística, conforme mostrado na Figura 3.

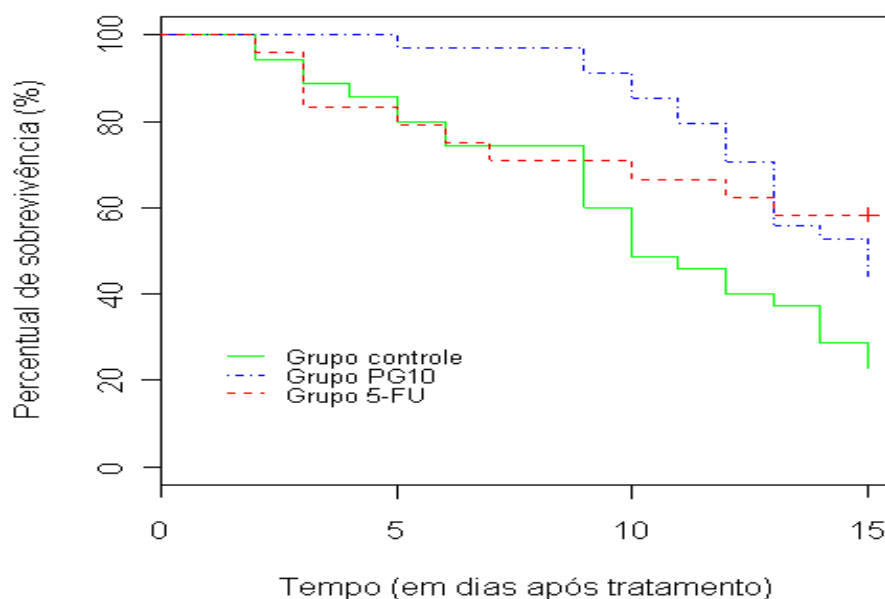


**Figura 3. Avaliação da atividade antitumoral de P1G10 sobre modelo de melanoma B16F1.** Camundongos  $C_{57}Bl_6$  receberam inóculos de B16F1 ( $5 \times 10^5$  células em  $100 \mu L$ ), foram tratados com solução salina (controle) ou P1G10 1 ou 5 mg/kg via s.c. Após 15 dias de tratamento, foram sacrificados e tiveram suas massas tumorais medidas ( $*p < 0,05$ , ANOVA com pós teste Bonferroni).

#### 4.2.2) Tempo de sobrevivência:

Para avaliar o tempo de sobrevivência gerado por P1G10 em animais portadores de melanoma B16F1, foram formados 3 grupos: o controle negativo (solução salina; n=35), o grupo tratado com a dose eficaz de P1G10 (5 mg/kg; n=35), via s.c., diariamente por 15 dias e o grupo tratado com fluoruracila (5-FU) 20 mg/kg (n=24), via intraperitoneal (*i.p.*), em ciclos de 5 dias por 15 dias, como controle positivo.

Conforme mostrado na Figura 4A, observamos que entre o 1º e o 8º dia após o término do tratamento ocorreu apenas um óbito para o grupo tratado com P1G10 (2,9%), número significativamente inferior aos obtidos nos grupos 5-FU (7 animais mortos ou 29,2%) e controle negativo (9 mortes ou 25,7%). Porém, se observou que o percentual de mortalidade se diferenciou entre os grupos ao longo do tempo. Do 9º ao 12º dia após o término do tratamento, o tratamento com 5-FU gerou uma redução maior no número de mortes (2 óbitos, totalizando 9 ou 37,5%) em relação aos grupos P1G10 (9 mortes, totalizando 10 ou 28,6%) e controle negativo (12 óbitos, totalizando 21 ou 60%). Nos últimos dias de ensaio (13º ao 15º dia após o término do tratamento), foram contabilizadas 9 mortes para o grupo P1G10 (totalizando 19 ou 54,3%), número superior ao grupo controle que apresentou 6 óbitos (totalizando 27 ou 77,1%) e apenas uma morte para o grupo 5-FU (totalizando 10 ou 41,7%). Na Figura 4B, observamos que, pelo teste de Logrank, existem diferenças estatísticas entre todos os grupos tratados em relação ao controle negativo, sendo 5-FU e P1G10 semelhantes entre si.

**A****B**

Grupos comparados	Estatística do teste	Valor de p
Controle x P1G10 x 5-FU	8,7000	0,0131
Controle x P1G10	6,5000	0,0107
Controle x 5-FU	5,6000	0,0179
P1G10 x 5-FU	0,2000	0,6730

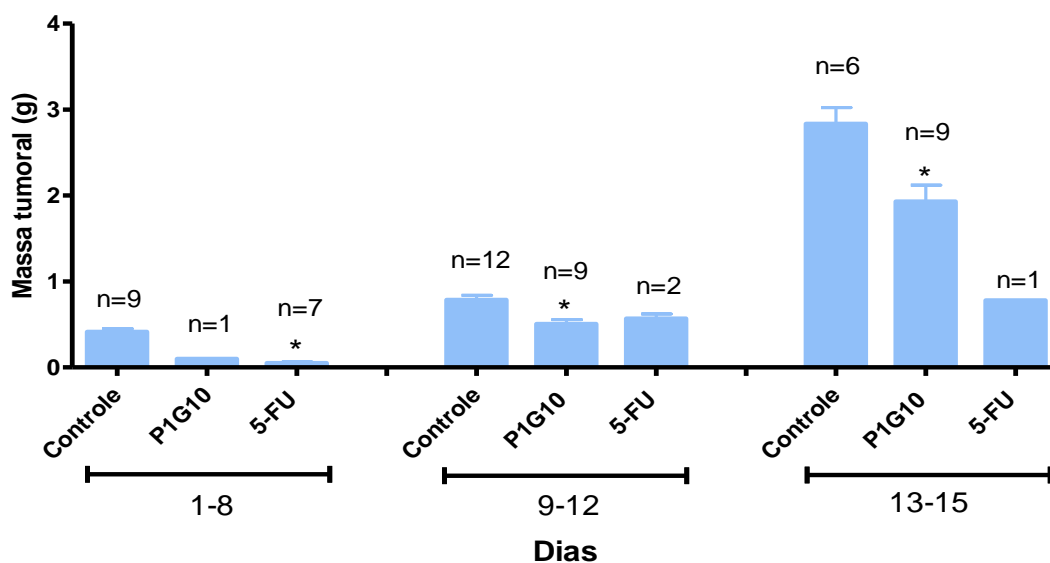
**Figura 4. Sobrevivência de camundongos  $C_{57}Bl_6$  tratados com P1G10.** Os animais receberam inóculos (B16F1-  $5 \times 10^5$  células em  $100 \mu\text{L}$ ) e foram tratados com P1G10 5mg/kg ou salina (ambas por via s.c. e por 15 dias) ou 5-FU via *i.p.* por 15 dias em ciclos de 5 dias. Ao final, foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com ração e água *ad libitum* e os óbitos foram contabilizados diariamente. **(A)** Através da curva de Kaplan- Meier é possível observar diferenças entre os grupos P1G10 e 5-FU em relação ao grupo controle. **(B)** Teste de Logrank, demonstrando as diferenças estatísticas entre os grupos (1= controle, 2= P1G10 5 mg/kg, 3= 5-FU 20 mg/kg). Os valores de p destacados em vermelho se referem aos significativos.

A ocorrência de tumor nesse ensaio foi de 100% nos animais mortos durante o experimento e esses tiveram seus tumores removidos e as massas determinadas. No período entre o 1º e 8º dia após o término do tratamento, não foi possível analisar estatisticamente a variação de massa tumoral entre os três grupos, pois o grupo tratado com P1G10 apresentou apenas um óbito (a massa tumoral foi de 0,10



g). O grupo tratado com 5-FU apresentou massas tumorais diferentes estatisticamente ( $0,05 \pm 0,04$  g,  $*p < 0,05$ , Teste t de Student) em relação às observadas no grupo controle ( $0,41 \pm 0,11$ g).

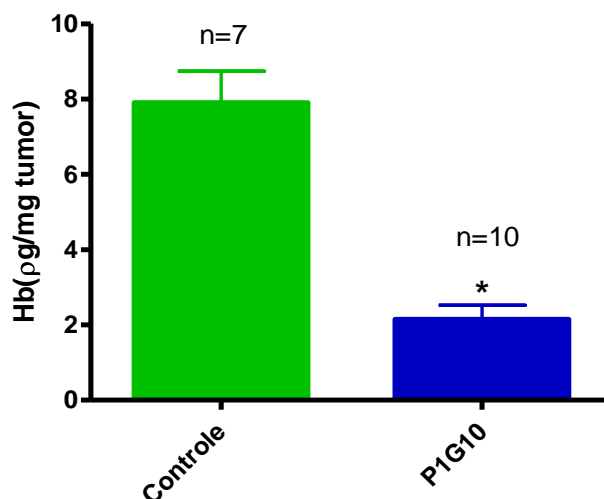
Entre o 9º e o 12º dia, se observou, também, uma redução significativa na massa tumoral do grupo tratado com P1G10 ( $0,50 \pm 0,16$  g,  $*p < 0,05$ , Teste t de Student) em relação ao grupo controle ( $0,78 \pm 0,19$  g), porém, não houve diferença em relação ao grupo tratado com 5-FU ( $0,57 \pm 0,08$  g). Vale ressaltar que, neste período, houve menos mortes para o grupo 5-FU em relação aos outros dois. No período entre 13º e o 15º dia, o grupo tratado com 5-FU apresentou apenas um óbito (tumor com massa de 0,78 g). Neste período, houve diferença estatística entre o grupo controle ( $2,83 \pm 0,46$ ) e o tratado com P1G10 ( $1,93 \pm 0,58$  g,  $*p < 0,05$ , Teste T de Student). Os dados descritos estão expressos graficamente na Figura 5.



**Figura 5. Massa tumoral de animais  $C_{57}Bl_6$  mortos durante o ensaio de sobrevivência.** Os animais receberam inóculos (B16F1-  $5 \times 10^5$  células em  $100 \mu\text{L}$ ) e foram tratados com P1G10 ou salina via s.c. por 15 dias e 5-FU via i.p. por 15 dias em ciclos de 5 dias. O n representa o número de óbitos que foram contabilizados por até 15 dias após o término do tratamento. Na medida em que foram constatadas as mortes dos animais, estes tiveram os tumores removidos e as massas determinadas. ( $*p < 0,05$ , Teste t de Student).

#### 4.2.3) Efeito de P1G10 sobre a angiogênese tumoral:

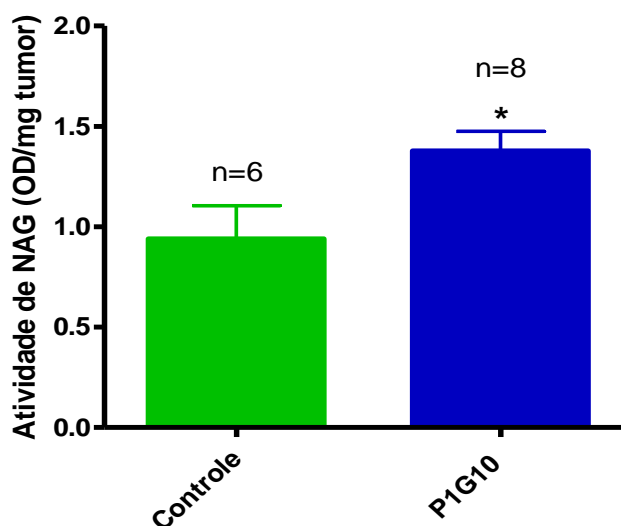
Para avaliar a atividade angiogênica, foram coletados fragmentos de tumor e amostras de sangue por punção da artéria braquial. Iniciou-se com o processamento dos tumores e coleta do sobrenadante para quantificação da hemoglobina (Hb), conforme descrito na seção “Materiais e Métodos” item 3.2.3.4.1. Na Figura 6, é possível verificar a redução da quantidade de Hb, em  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tumor, do grupo tratado com P1G10 5 mg/kg ( $2,15 \pm 1,19$ ) em relação ao grupo controle ( $7,90 \pm 2,04$ ,  $*p < 0,01$ , Teste t de Student). Em valor percentual, a quantidade de Hb foi reduzida em 72,8% para o grupo tratado com P1G10 5mg/kg.



**Figura 6. Quantificação da hemoglobina em melanoma B16F1 de camundongos C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> tratados com P1G10.** Os animais receberam inóculo celular (B16F1-  $5 \times 10^5$  células em 100  $\mu\text{L}$ ) e foram tratados com P1G10 5 mg/kg ou salina via s.c. por 15 dias. Os tumores foram processados como preconizado por Plunkett e colaboradores (1990) e o sobrenadante obtido foi utilizado para dosagem de hemoglobina. ( $*p < 0,01$ , Teste t de Student).

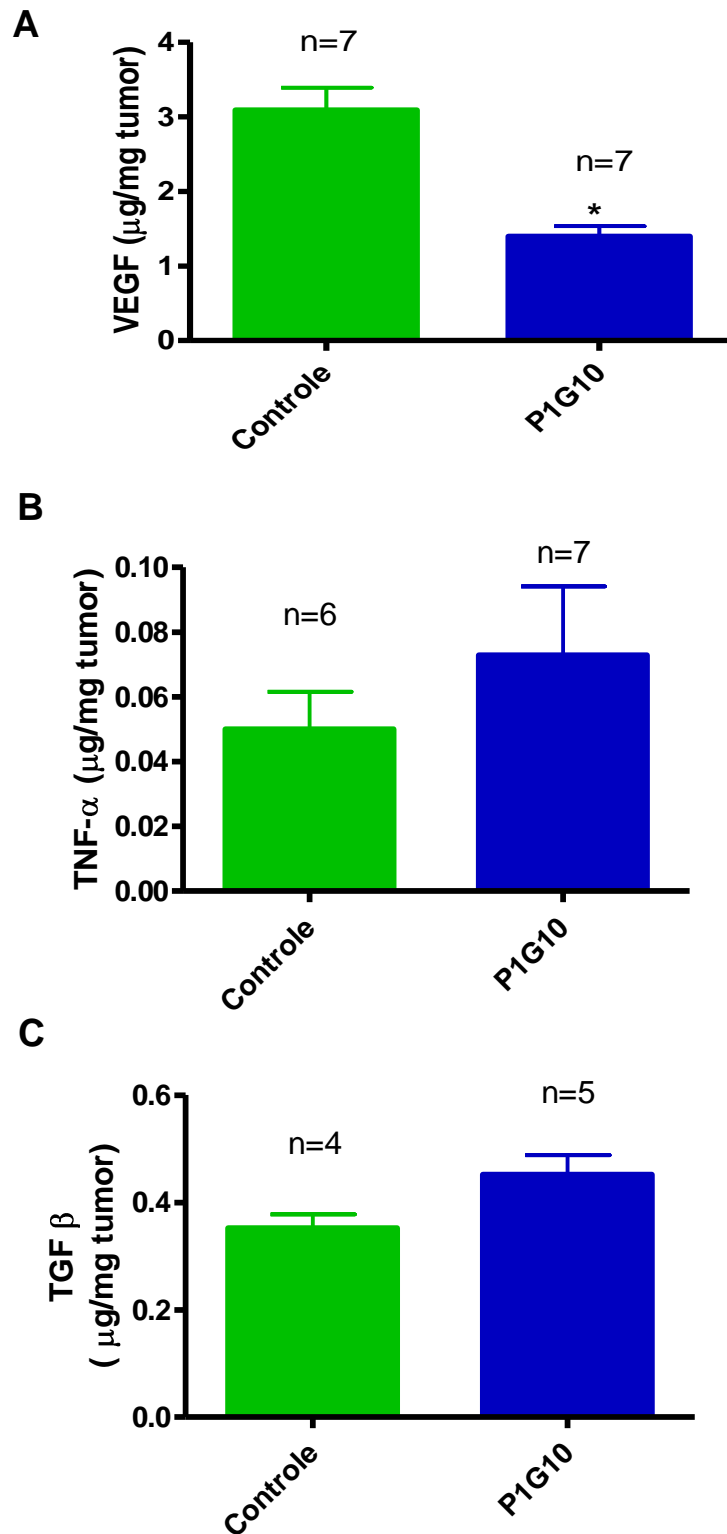
Os “pellets” dos tumores obtidos após o processamento foram divididos, tiveram massas estabelecidas e foram utilizados para dosagem da atividade de NAG (N-acetil-b-D glicosaminidase). Esse ensaio foi realizado para avaliar o infiltrado de macrófagos ativados no tumor (Bailey, 1988) gerado pelo tratamento com a fração. Observou-se diferença estatística, em OD/mg de tumor, entre o grupo controle ( $0,94 \pm 0,40$ ) e o grupo tratado com P1G10 5 mg/kg ( $1,38 \pm 0,27$ ), conforme mostrado na

Figura 7. O grupo tratado, portanto, obteve um aumento da atividade de NAG de 46,8% em relação ao controle.



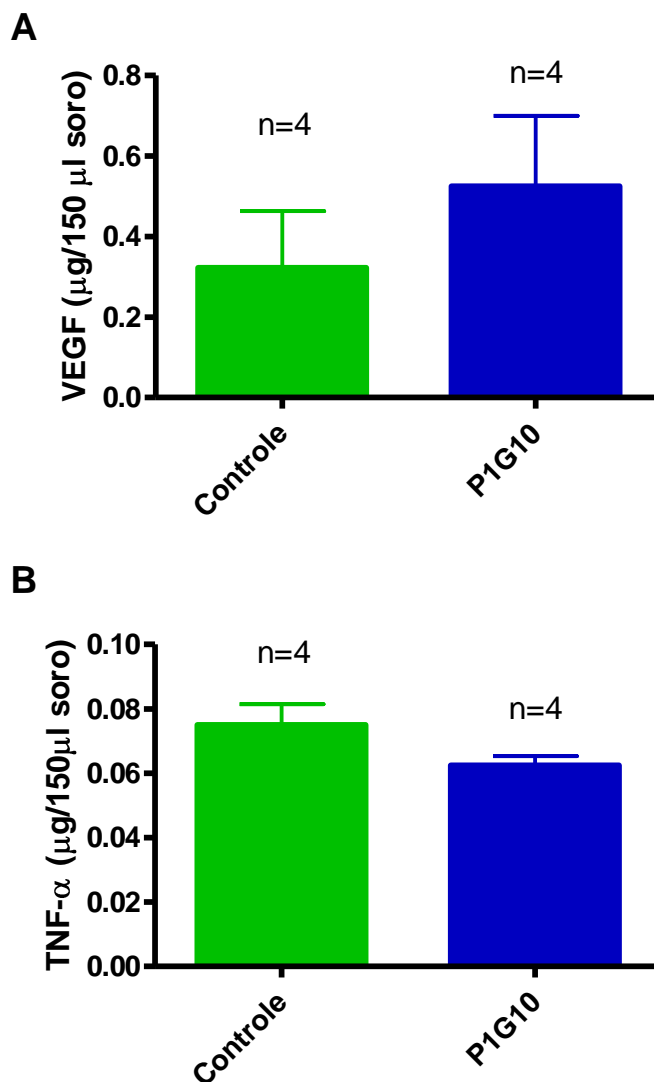
**Figura 7. Dosagem da atividade de NAG em melanoma B16F1 de camundongos C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> tratados com P1G10.** Os animais receberam inóculos celulares (B16F1-  $5 \times 10^5$  células em  $100 \mu\text{L}$ ) e foram tratados com P1G10 5 mg/kg ou salina, ambas por 15 dias via s.c. Os tumores foram processados como preconizado por Plunkett e colaboradores (1990) e o “pellet” obtido foi utilizado para dosagem da atividade de NAG. (\*  $p < 0,05$ , Teste t de Student).

As dosagens de citocinas VEGF, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  total no tumor foram feitas usando o sobrenadante obtido no ensaio de quantificação da hemoglobina, sendo os ensaios realizados conforme os protocolos dos fabricantes dos kits da R&D Systems. Quanto aos níveis de VEGF, como mostrado na Figura 8 A, houve uma redução, em  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tumor, para o grupo tratado ( $1,4 \pm 0,35$ ) em relação ao grupo controle ( $3,09 \pm 0,80$ ). Na Figura 8 (B e C), podemos observar que, tanto para os níveis de TNF- $\alpha$  quanto para TGF- $\beta$ , não houve diferenças, em  $\mu\text{g}/\text{mg}$  tumor, entre os grupos controle ( $0,05 \pm 0,03$  para TNF- $\alpha$  e  $0,35 \pm 0,05$  para TGF- $\beta$ ) e tratado com P1G10 ( $0,07 \pm 0,06$  e  $0,45 \pm 0,08$ , para TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , respectivamente).



**Figura 8. Determinação dos níveis de citocinas em melanoma B16F1 de animais tratados com P1G10.** Camundongos  $C_{57}Bl_6$  receberam inóculos (B16F1-  $5 \times 10^5$  cél em  $100 \mu\text{L}$ ) e foram tratados com P1G10 5 mg/kg ou salina, ambas por 15 dias e via s.c. Os tumores foram processados como preconizado por Teixeira e colaboradores (2006) e o sobrenadante obtido foi utilizado para dosagens de citocinas. **(A)** Determinação dos níveis de VEGF (\* $p < 0,01$ , teste t de Student comparado ao controle). **(B)** Determinação dos níveis tumorais de TNF- $\alpha$  **(C)** Determinação dos níveis totais de TGF- $\beta$ .

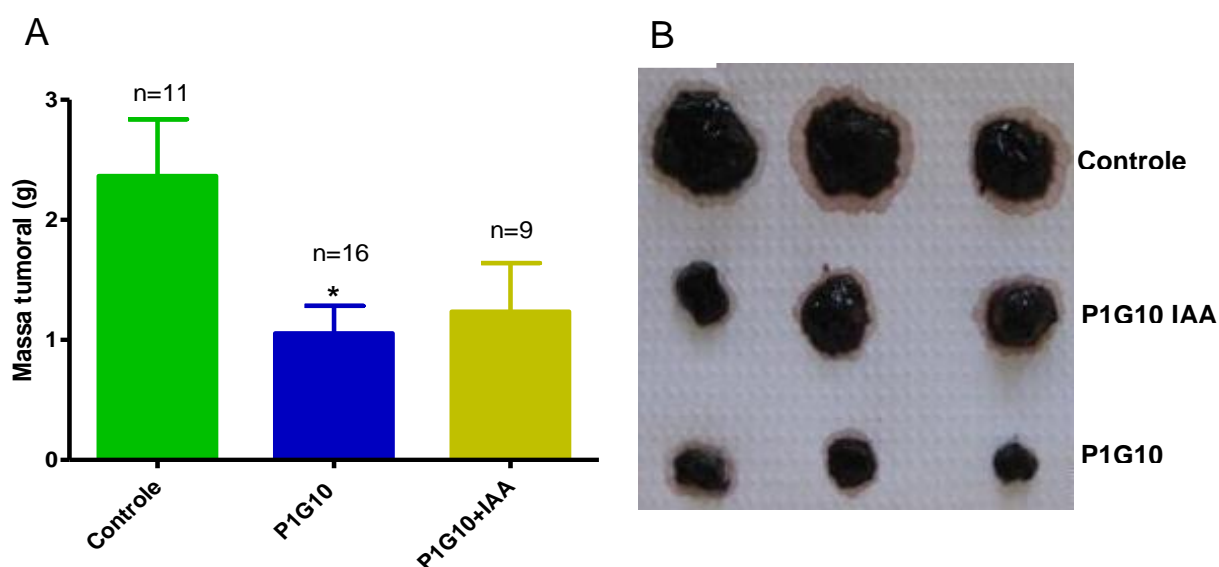
A determinação dos níveis de VEGF e TNF- $\alpha$  (Figura 9 A e B, respectivamente) também foi executada no soro dos animais, porém não houve diferença estatística entre os grupos tratados ( $0,52 \pm 0,35$  e  $0,06 \pm 0,01$ , para VEGF e TNF- $\alpha$ , respectivamente) e controle ( $0,32 \pm 0,28$  e  $0,08 \pm 0,01$ , para VEGF e TNF- $\alpha$ , respectivamente). Não foi realizada a dosagem de TGF- $\beta$  em soro por falta de amostras.



**Figura 9. Determinação dos níveis de citocinas em soro de animais portadores de melanomas B16F1 tratados com P1G10.** Camundongos  $C_{57}Bl_6$  receberam inóculos (B16F1-  $5 \times 10^5$  células em  $100 \mu\text{L}$ ) e foram tratados com P1G10 ou salina. Esses camundongos tiveram seu sangue coletado e o soro utilizado para dosagem de citocinas. **(A)** Determinação de VEGF, **(B)** Determinação de TNF- $\alpha$ .

#### 4.2.4) Avaliação da dependência da atividade proteolítica de P1G10 em seu efeito antitumoral:

Camundongos C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> foram tratados com P1G10 5 mg/kg ou solução salina (controle) ou P1G10 5 mg/kg com sua atividade proteolítica inibida pela iodoacetamida (IAA) para verificar se a atividade antitumoral observada é dependente da atividade proteolítica da fração. Observou-se, conforme apresentado na Figura 10 A, que o grupo tratado com a fração inibida apresentou redução da massa tumoral (1,23 ± 1,21 g) semelhante à do grupo tratado com P1G10 (1,05 ± 0,92 g). Porém apenas o último grupo foi estatisticamente diferente em relação ao controle (2,36 ± 1,57g, \*p<0,05, ANOVA com pós teste Bonferroni.) Na figura 10 B, podemos observar macroscopicamente a redução relatada.



**Figura 10. Avaliação da dependência da atividade proteolítica da fração para sua atividade antitumoral.** Camundongos C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> receberam inóculo (B16F1) e, 4 dias após, foram tratados com P1G10, P1G10 inibida por IAA e solução salina via s.c. no período de 15 dias. **(A)** Medida da massa tumoral de animais tratados ou não com P1G10 5 mg/kg ou P1G10-IAA 5 mg/kg (\*p<0,05, ANOVA com pós teste Bonferroni). **(B)** Aspecto macroscópico dos tumores B16F1 para todos os grupos (Cont= controle; P1G10 I= P1G10 inibido por IAA; P1G10 na dose de 5 mg/kg).

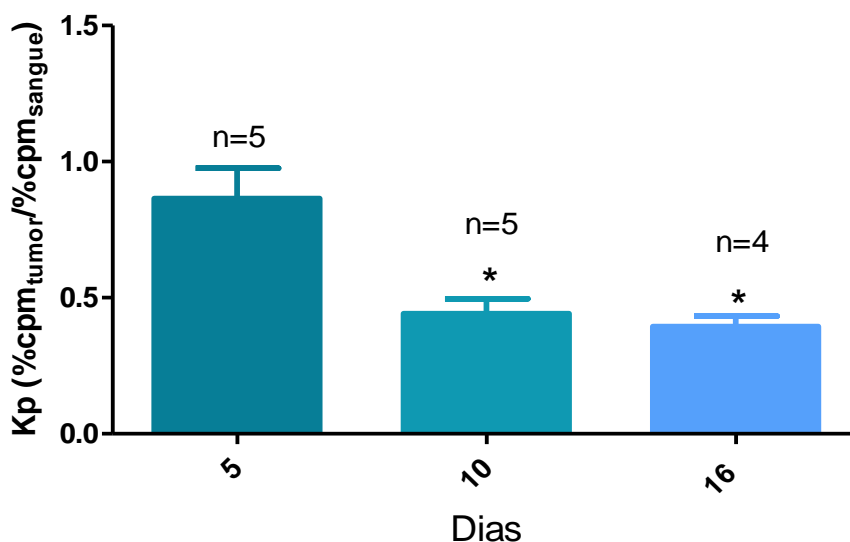
#### 4.2.5) Biodistribuição de P1G10:

Buscando avaliar o acesso de P1G10 ao tumor e, portanto, a interação entre ambos, foi proposto um ensaio onde camundongos saudáveis (grupo controle) e camundongos portadores de melanoma B16F1 foram tratados com P1G10 5mg/kg, diariamente,

sendo ao final do tratamento administrado P1G10 na mesma dose, porém, marcada com  $^{99m}\text{Tc}$ . O esquema terapêutico variou em relação ao número de dias de tratamento (5, 10 e 16 dias).

As taxas de captação de radioatividade obtidas em cada tumor foram corrigidas pela taxa correspondente ao total administrado e pelas massas tumorais. Esses resultados foram então utilizados para o cálculo do coeficiente de partição tumor/sangue ( $K_p$ ), ou seja, a relação entre a quantidade de fração distribuída no tumor e a presente na corrente sanguínea.

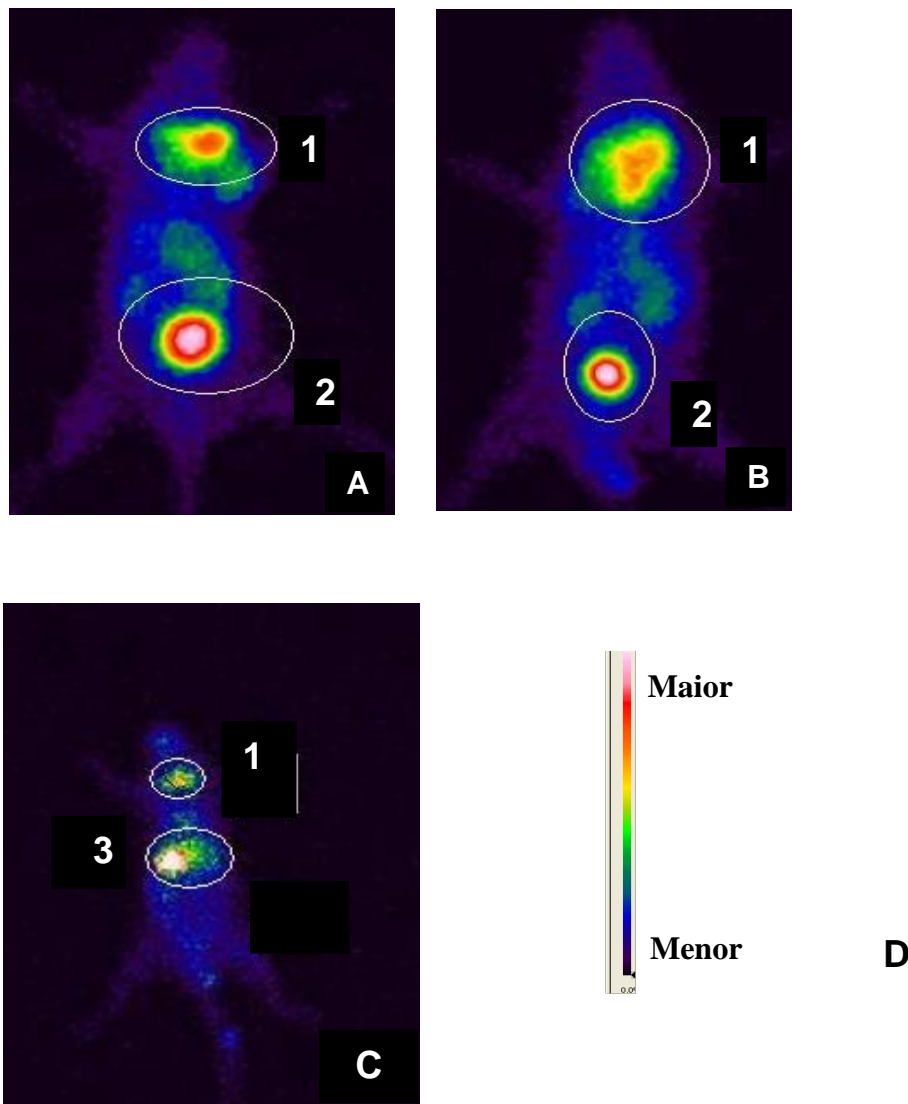
Verifica-se uma redução do  $K_p$  ao longo do tempo, sendo maior no 5<sup>o</sup> dia ( $0,86 \pm 0,25$ ) e reduzindo significativamente nos 10<sup>o</sup> ( $0,44 \pm 0,12$ ) e 16<sup>o</sup> dias ( $0,39 \pm 0,07$ ), \* $p < 0,05$ , comparado ao grupo 5 dias, ANOVA pós teste Bonferroni), conforme Figura 11.



**Figura 11. Coeficiente de partição de P1G10 marcado com  $^{99m}\text{Tc}$  em tumores B16F1.** Camundongos  $C_{57}Bl_6$  portadores de melanoma B16F1 foram tratados com P1G10 diariamente e marcada com  $^{99m}\text{Tc}$  1 hora antes das medidas, quando os tumores foram removidos e a radioatividade captada medida em contador gama. (\* $p < 0,05$ , comparado ao grupo 5 dias, ANOVA pós teste Bonferroni).

A Figura 12 mostra as imagens cintilográficas obtidas através da gama câmara para o maior tempo de tratamento utilizado (16 dias) para os grupos sadio e com inóculo de células B16F1. É possível observar que a distribuição da fração foi semelhante para as diferentes condições, havendo uma maior captação da radioatividade

principalmente nos órgãos relativos a excreção (rins e bexiga). A captação na área do tumor, que está localizado à direita do animal na região do flanco, não foi detectada por este método de visualização. Como controle, foi formado um grupo que recebeu apenas  $^{99m}\text{Tc}$  livre e a sua distribuição se caracteriza por apresentar uma maior captação em tireóide e estômago.



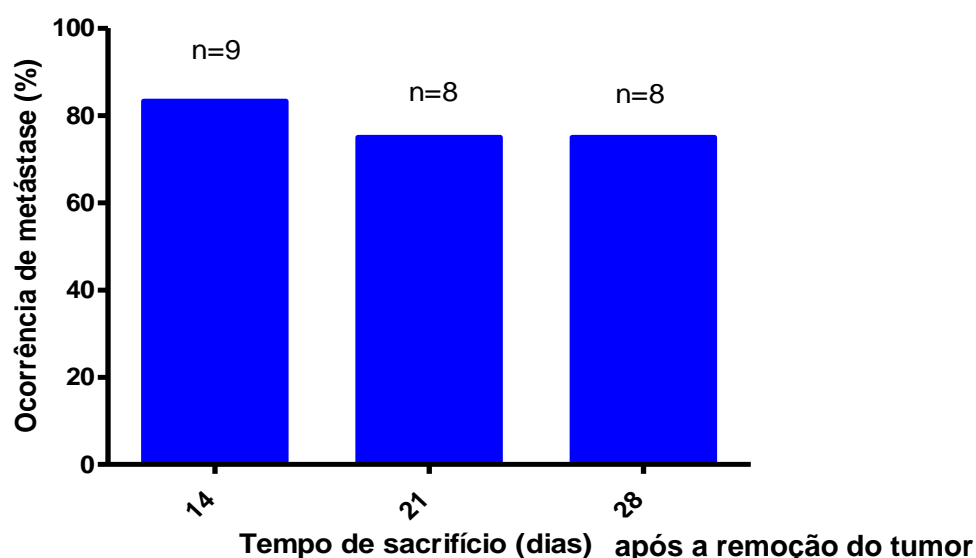
**Figura 12. Distribuição de P1G10 em modelo de melanoma B16F1.** Camundongos  $C_{57}Bl_6$  sadios e portadores de melanomas B16F1 foram tratados com P1G10 5 mg/kg via s.c. diariamente, sendo ao final do tratamento, administrado P1G10 na mesma dose, porém, marcada com  $^{99m}\text{Tc}$ . As imagens cintilográficas foram tomadas 1 hora após a administração de P1G10 -  $^{99m}\text{Tc}$ . Os tempos de tratamento variaram entre os grupos (5, 10 e 16 dias). **(A)** Animal sem o inóculo celular; **(B)** Animal portador de melanoma B16F1; **(C)** Animal tratado somente com  $^{99m}\text{Tc}$  livre (1= Ponto de administração; 2= Bexiga; 3= Estômago); **(D)** Escala de captação indicando que as cores “quentes” (vermelho, amarelo e laranja) representam maiores taxas de captação, enquanto as cores “frias” (azul, verde e roxo) representam menores taxas.



#### 4.3) Atividade antimetastática:

Para a padronização do modelo tumoral metastático B16F10, 15 dias após o inóculo de células ( $5 \times 10^4$  em  $100 \mu\text{L}$ ) s.c. na orelha direita de camundongos  $C_{57}Bl_6$ , foi realizada a cirurgia de remoção das mesmas. Após esta amputação, em diferentes tempos, os animais foram sacrificados para verificação da presença de pontos metastáticos pulmonares.

Conforme observado na Figura 13, a ocorrência de metástases não variou em relação ao tempo de sacrifício. Este percentual oscilou entre 75 e 83%.



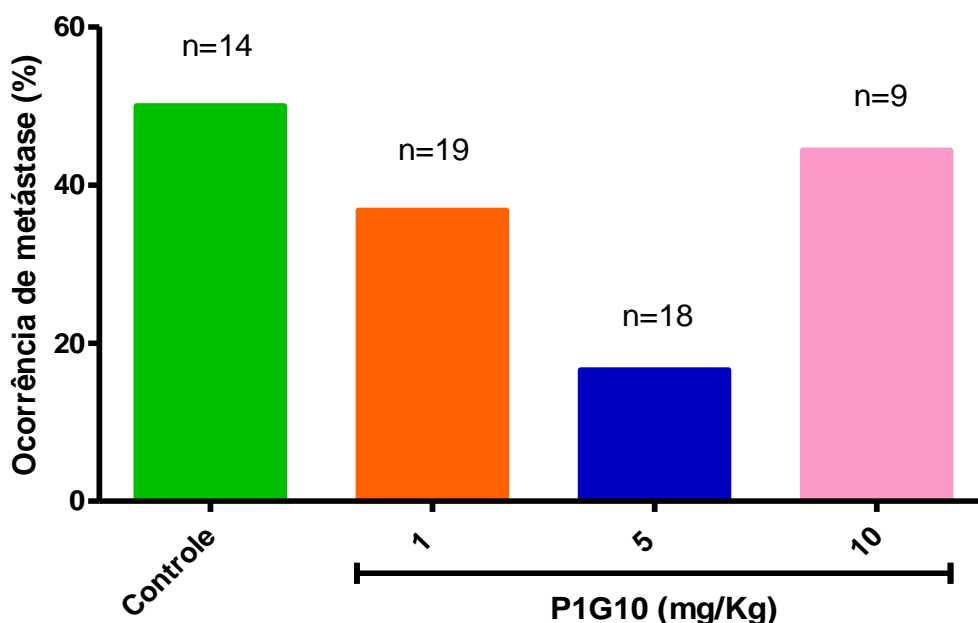
**Figura 13. Percentual de ocorrência de desenvolvimento de metástase para camundongos  $C_{57}Bl_6$  ao longo do tempo.** Foram inoculadas  $5 \times 10^4/100 \text{ L}$  de células B16F10 na orelha de camundongos  $C_{57}Bl_6$ . Após 15 dias, foi realizada a extirpação das orelhas e, após a cirurgia, foram determinados diferentes tempos (14; 21 e 28 dias) para o sacrifício.

#### 4.3.1) Variação do percentual de ocorrência e do número de pontos de metástase:

Com o tempo de tratamento com P1G10 de 21 dias, iniciado após a extirpação da orelha, foi realizado o ensaio para definir a dose antimetastática eficaz. Para tal, foram formados 4 grupos: controle (salina) e P1G10 nas doses de 1; 5 e 10 mg/kg.

Observou-se que, como representado na Figura 14, a dose mais eficiente foi a de 5 mg/kg (16,6% de animais acometidos por metástase). O grupo tratado com P1G10 1 mg/kg também apresentou redução, porém menor (36,8% de animais acometidos), enquanto que, a dose de P1G10 10 mg/kg (44,4%) apresentou percentual de

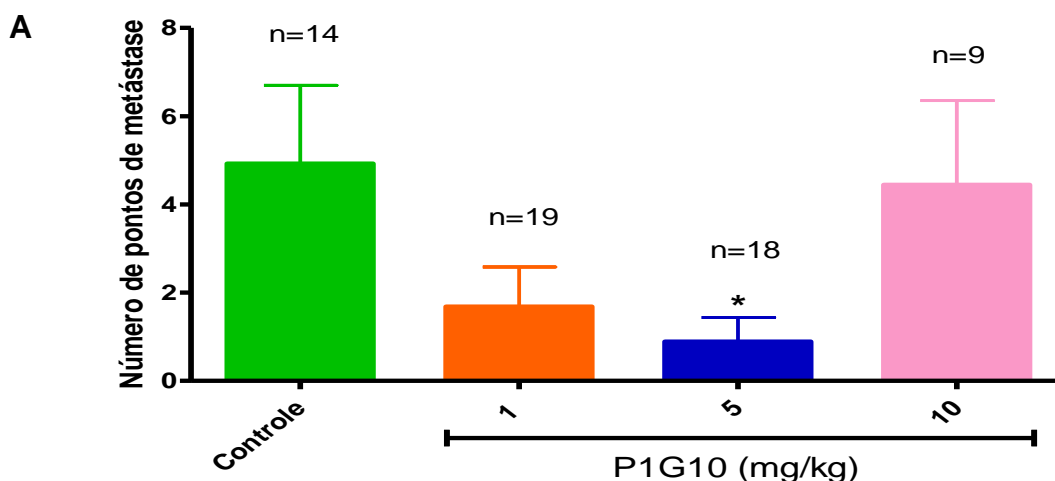
ocorrência similar ao grupo controle (50%), além de ter causado necrose cutânea grave nos animais.



**Figura 14. Avaliação da atividade antimetastática de P1G10 em modelo B16F10.** Camundongos C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> receberam inóculo ( $5 \times 10^4$  cél/100  $\mu$ L) na orelha direita e tiveram as mesmas extirpadas após 15 dias. Após a cirurgia, receberam diariamente 1; 5 ou 10 mg/kg de P1G10 ou solução salina via s.c. por 21 dias. Após o tratamento, os animais foram sacrificados sendo calculado o percentual de ocorrência de metástases para cada tratamento.

Dentre os animais que apresentaram metástases, foi quantificado o número de pontos para cada pulmão avaliado. Observou-se que, conforme representado graficamente na Figura 15, também houve redução no número de pontos metastáticos para o grupo tratado com P1G10 5 mg/kg ( $0,88 \pm 2,32$ ) em relação ao grupo controle ( $4,92 \pm 6,41$ ,  $*p < 0,05$ , ANOVA com pós teste Dunnet). O grupo tratado com P1G10 1 mg/kg também demonstrou uma tendência à redução ( $1,68 \pm 3,92$ ), porém sem significância estatística. O grupo P1G10 10 mg/kg ( $4,44 \pm 5,72$ ) apresentou resultado semelhante ao grupo controle.

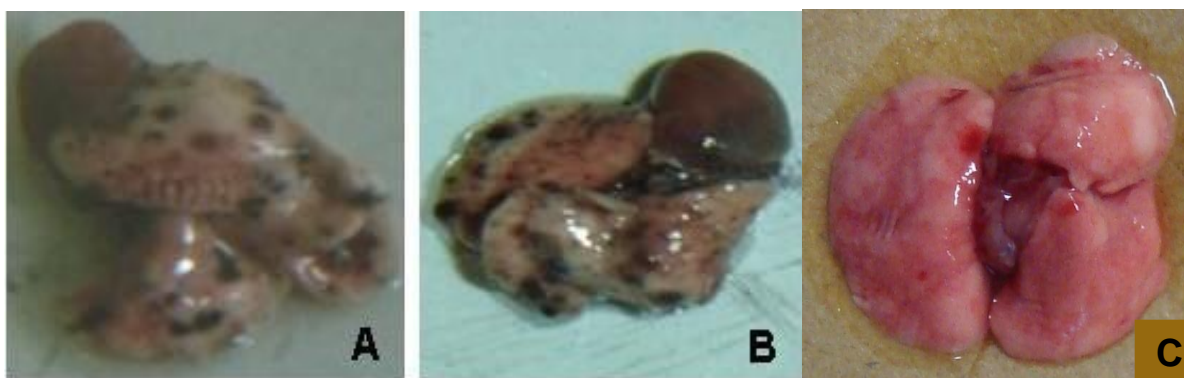
Na Figura 16, é possível observar, macroscopicamente, a redução no número de pontos e no tamanho dos focos metastáticos pulmonares para o grupo tratado com P1G10 5 mg/kg em relação ao grupo controle e, na Figura 17, esta redução pode ser analisada histopatologicamente em lâminas coradas por hematoxilina-eosina em aumento de 600 vezes.



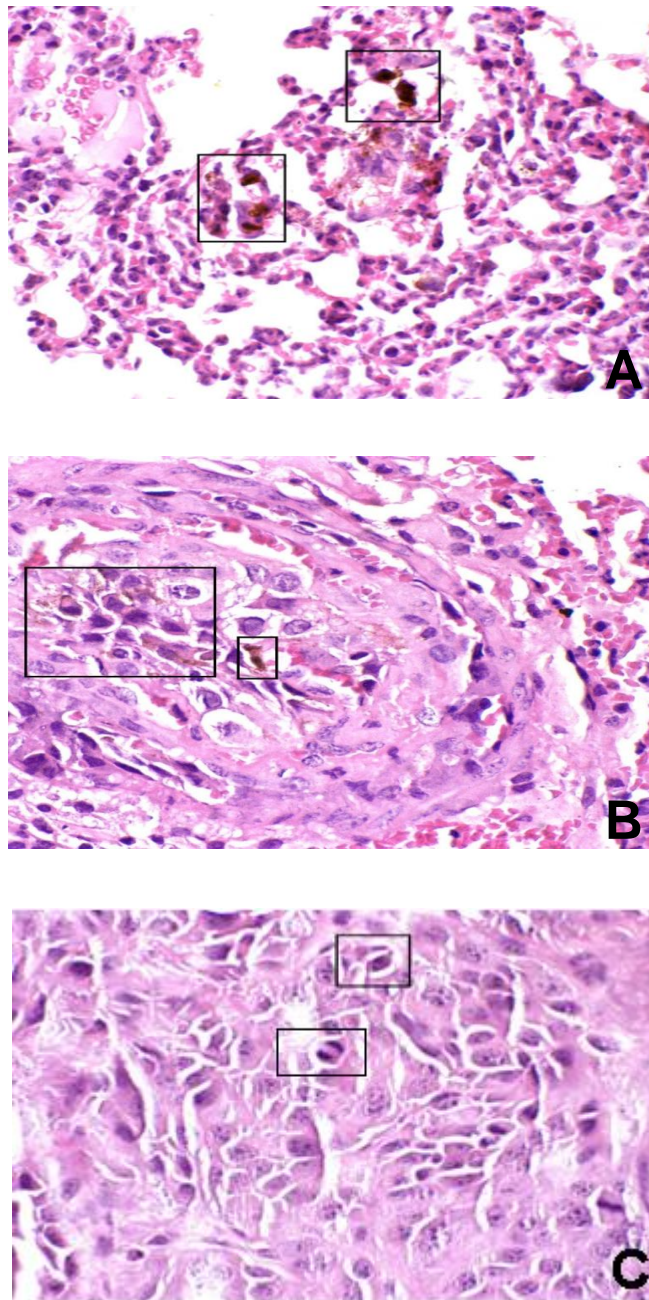
**B**

Diâmetro dos pontos metastáticos			
Tratamentos	< 1 mm	1 - 3 mm	> 3 mm
P1G10			
Controle (salina)	-	43%	57%
1 mg/kg	57%	29%	14%
5 mg/kg	67%	33%	-
10 mg/kg	-	50%	50%

**Figura 15. Avaliação da atividade antimetastática de P1G10 através do número e do tamanho dos pontos em animais acometidos por metástase para modelo B16F10.** Camundongos C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> receberam inóculo ( $5 \times 10^4$  cél/100  $\mu$ L) na orelha direita e tiveram as mesmas removidas cirurgicamente após 15 dias. Logo após, receberam diariamente 1; 5 e 10 mg/kg de P1G10 ou solução salina via s.c. por 21 dias **(A)** Após o tratamento, os animais foram sacrificados sendo contabilizado o número de pontos de metástases. (\* $p < 0,05$ , ANOVA com pós teste Dunnet, comparado ao controle **(B)** Os animais portadores de metástase foram divididos em 3 grupos conforme o diâmetro dos pontos metastáticos.



**Figura 16. Aspecto macroscópico dos focos metastáticos pulmonares de animais tratados com P1G10.** Camundongos C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> receberam inóculo ( $5 \times 10^4$  cél/100  $\mu$ L) na orelha direita e tiveram as mesmas extirpadas após 15 dias. Após a cirurgia, foram tratados diariamente com solução salina ou P1G10 5 mg/kg via s.c. durante 21 dias. Logo após o tratamento, foram sacrificados e tiveram seus pulmões removidos. **(A)** e **(B)** Pulmões de animais tratados com solução salina **(C)** Pulmões de animais tratados com P1G10 5 mg/kg.



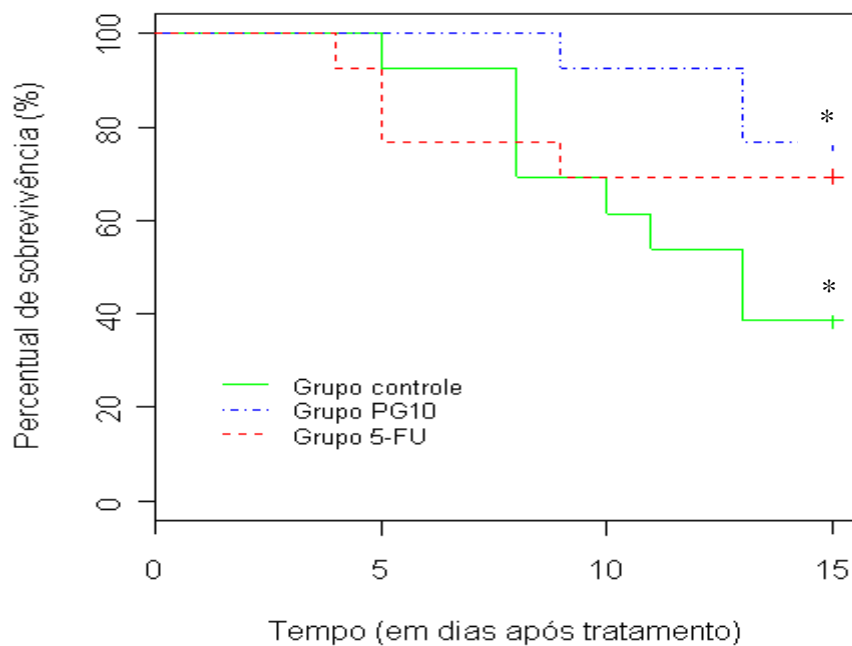
**Figura 17. Aspecto microscópico dos focos metastáticos pulmonares de animais tratados com P1G10.** Pulmões de camundongos C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> inoculados com B16F10 ( $5 \times 10^4$  células em 100  $\mu$ L) e tratados diariamente com P1G10 5 mg/kg ou solução salina via s.c. por 21 dias foram removidos, incluídos em parafina e cortados para montagem das lâminas. A coloração utilizada foi hematoxilina-eosina e o aumento das imagens é de 60 vezes. Alguns dos focos metastáticos foram marcados com um quadrado. **(A)** Pulmão de animal do grupo controle apresentando vários focos metastáticos. **(B)** Pulmão de animal do grupo controle apresentando células metastáticas invadindo um vaso sanguíneo. **(C)** Focos metastáticos mais discretos em animal do grupo tratado com P1G10 5 mg/kg.

#### 4.3.2) Tempo de sobrevivência:

Para a análise do tempo de sobrevivência gerado pela fração em modelo B16F10, foram formados 3 grupos: o controle negativo (n=13) tratado com salina, o grupo tratado com a dose eficaz de P1G10 - 5 mg/kg (n=13), ambos os tratamentos diários, executados após a retirada das orelhas e com duração de 21 dias, via s.c., e o grupo controle positivo, onde os animais foram tratados com fluoruracila (5-FU) 20 mg/kg (n=13), *i.p.*, em ciclos de 5 dias por 21 dias.

Na Figura 18 A, podemos observar que entre o 1º e o 8º dia após o término do tratamento, não houve morte no grupo tratado com P1G10. Já os grupos tratados com 5-FU e controle negativo apresentaram, respectivamente, 3 mortes (23,1%) e 4 mortes (30,8%). Do 9º ao 12º dia houve 1 óbito, tanto para o grupo tratado com P1G10 (7,7), quanto para o tratado com 5-FU (totalizando 4, ou 30,8%) e ocorreram 2 mortes para o controle (totalizando 6 ou 46,1%). Porém, ao final do ensaio, 13º ao 15º dia, o percentual de mortalidade passou a ser equivalente entre os grupos, aumentando para o grupo P1G10 e reduzindo para o grupo 5-FU. Para o grupo P1G10 foram contabilizadas 2 mortes (totalizando 3 ou 23,1%), para o grupo 5-FU nenhum óbito ocorreu (totalizando 4 ou 30,8%) e para o grupo controle ocorreram 2 mortes (totalizando 8 ou 61,5%).

Na Figura 18B, observamos que, pelo teste de Logrank, existe diferença estatística apenas entre o grupo P1G10 e o grupo controle negativo.

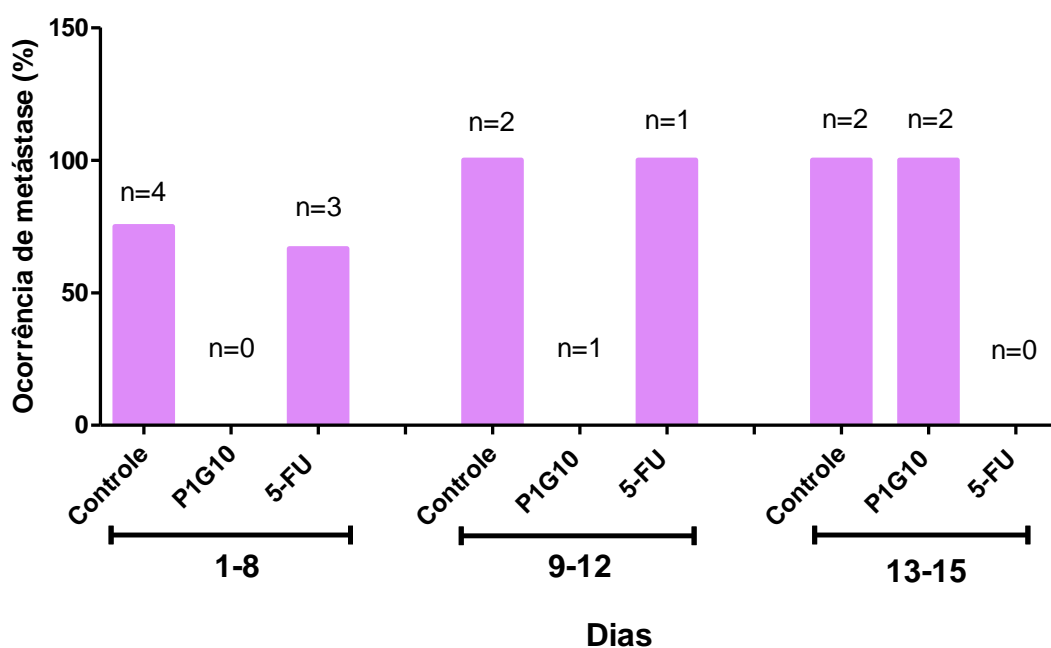
**A****B**

Grupos comparados	Estatística do teste	Valor de p
Controle x P1G10 x 5-FU	4,4000	0,1110
Controle x P1G10	4,6000	0,0327
Controle x 5-FU	1,4000	0,2370
P1G10 x 5-FU	0,4000	0,5280

**Figura 18. Sobrevivência de animais C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> tratados com P1G10.** Os animais receberam inóculos celulares (B16F10- 5x10<sup>4</sup> cél/100µL na orelha direita), sofreram cirurgia e foram tratados com P1G10, salina via s.c. por 21 dias e 5-FU via i.p por 21 dias em ciclos de 5 dias. Ao final, foram mantidos em ciclo de claro/escuro de 12/12 horas, água e ração *ad libitum* e os óbitos foram contabilizados diariamente. **(A)** Representação gráfica segundo Kaplan- Méier. **(B)** Teste estatístico de Logrank (1= controle, 2= P1G10 5 mg/kg, 3= 5-FU 20 mg/kg). O valor de p destacado em vermelho se refere ao significativo.

Os pulmões dos animais mortos durante o ensaio de sobrevivência foram coletados e tiveram os pontos metastáticos contabilizados. Entre o 1º e o 8º dia, no grupo controle, os 4 animais mortos apresentaram  $6,5 \pm 9,15$  pontos metastáticos e no grupo tratado com 5-FU, 3 animais apresentaram  $7,67 \pm 10,78$  pontos, lembrando que no grupo P1G10 não houve óbitos. No período entre o 9º e o 12º dia, 2 animais do grupo controle morreram e um do grupo tratado com 5-FU (15 pontos) apresentaram pontos metastáticos. Houve a perda de um animal do grupo tratado com P1G10, porém, esse não apresentou pontos metastáticos. No período entre o 13º e o 15º dia, os 2 animais do grupo controle, assim como os 2 do grupo tratado com P1G10 5 mg/kg, apresentaram pontos metastáticos, enquanto que, para o grupo tratado com 5-FU nenhum animal morreu. Os resultados referentes ao percentual de ocorrência e número de pontos de metástase deste experimento estão apresentados na Figura 19 (A e B).

**A**



**Figura 19. Percentual de ocorrência e número de pontos metastáticos de animais C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> mortos durante o ensaio de sobrevivência.** Os animais receberam inóculos (B16F10-  $5 \times 10^4$  cél/100  $\mu$ L) e foram submetidos à cirurgia após 15 dias. No mesmo dia, iniciou-se o tratamento com P1G10 5 mg/kg ou salina via s.c. por 21 dias e 5-FU 20 mg/kg via *i.p* por 21 dias em ciclos de 5 dias. Na medida em que foram constatadas as mortes dos animais, estes tiveram os pulmões removidos. Os resultados estão expressos no gráfico por intervalos de tempo após o término do tratamento. **(A)** Análise do percentual de ocorrência de metástase. O n representa o número de óbitos. **(B)** Determinação do número de pontos metastáticos.

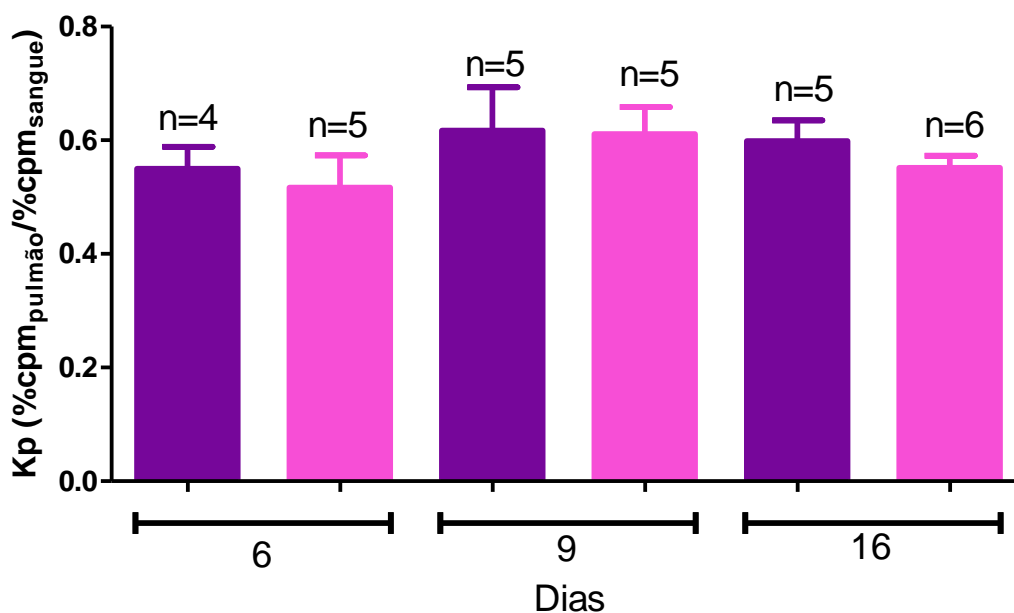
#### 4.3.3) Biodistribuição de P1G10:

Para avaliar o acesso de P1G10 aos pulmões acometidos por metástase, executamos um ensaio onde camundongos saudáveis (grupo controle) e camundongos portadores de melanoma B16F10, submetidos à cirurgia de extirpação da orelha direita, foram tratados com P1G10 5mg/kg, diariamente, sendo ao final do tratamento administrado P1G10 marcada com  $^{99m}\text{Tc}$ . O esquema terapêutico variou em relação ao número de dias de tratamento (2, 9 e 16 dias).

A taxa de captação de radioatividade obtida em cada pulmão foi corrigida pela massa e, então, foi calculado o coeficiente de partição pulmão/sangue ( $K_p$ ), ou seja, a relação entre a quantidade de fração distribuída no pulmão e a quantidade presente na corrente sanguínea (% de captação no pulmão/% captação no sangue). As taxas de captação de radioatividade obtidas em cada pulmão foram corrigidas pela taxa correspondente ao total administrado e pelas massas pulmonares. Esses resultados foram então utilizados e foi feito o cálculo do coeficiente de partição pulmão/sangue, ou seja a relação entre a quantidade de fração distribuída no pulmão e a presente na corrente sanguínea.

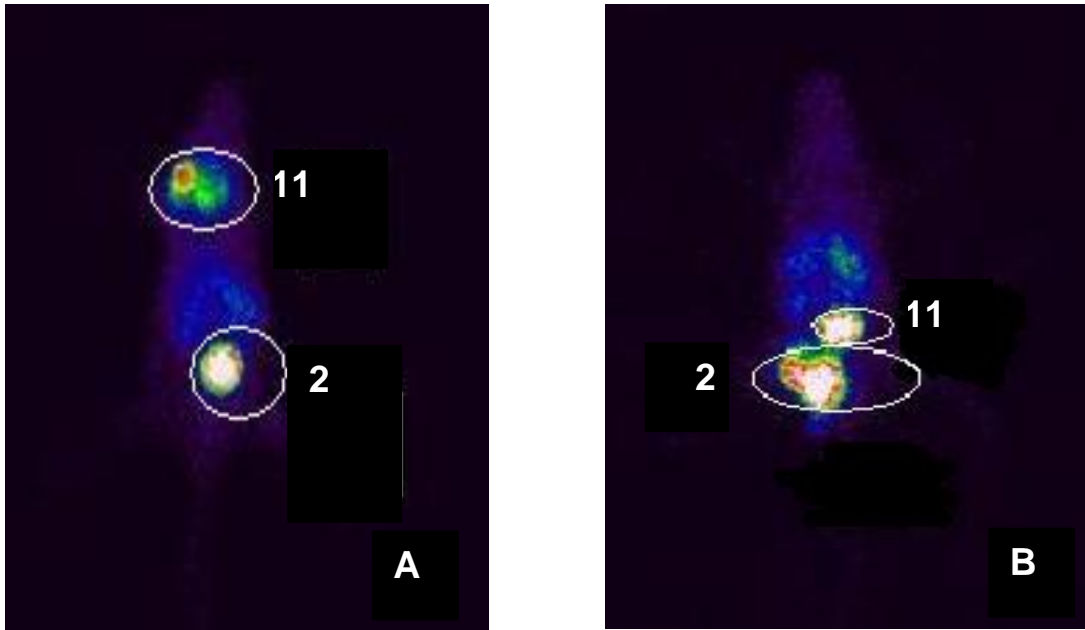
Analisando a captação pulmonar, não foi observada diferença estatística para os valores de  $K_p$  entre os grupos ao longo do tempo, conforme demonstrado na Figura 20.





**Figura 20. Coeficiente de partição de P1G10 marcado com  $^{99m}\text{Tc}$  em pulmões de animais sadios e portadores de melanoma B16F10.** Camundongos  $\text{C}_{57}\text{Bl}_6$  sadios (colunas roxas) e portadores de melanoma B16F10 (colunas rosa) foram tratados com P1G10 5mg/kg, diariamente, sendo ao final do tratamento administrado P1G10 marcada com  $^{99m}\text{Tc}$ . Após o sacrifício (2<sup>o</sup>, 9<sup>o</sup> e 16<sup>o</sup> dias) os pulmões foram removidos e a radioatividade captada foi medida em contador gama.

Na Figura 21A, estão apresentadas as imagens cintilográficas obtidas através da gama câmara para o maior tempo de tratamento utilizado para os grupos sadio (A) e com inóculo de células B16F10 (B). As áreas coloridas da imagem representam os locais com maior concentração de radioatividade, consequentemente, maior concentração da fração. Assim como no modelo B16F1, foi possível observar que a distribuição da fração foi semelhante para as diferentes condições, havendo uma maior captação da radioatividade nos órgãos relativos a excreção (rins e bexiga). Em 1 hora após a administração, a captação pulmonar foi pouco detectada por este método de visualização.



**Figura 21. Distribuição de P1G10 em modelo de melanoma B16F10.** Camundongos  $C_{57}Bl_6$  sadios e portadores de melanomas B16F10 foram tratados com P1G10 5mg/kg via s.c. durante 16 dias. No 16<sup>o</sup> de tratamento, as imagens cintilográficas foram tomadas em 1 hora após a administração de P1G10. **(A)** Imagem relativa a animal sadio **(B)** Imagem relativa a animal portador de melanoma B16F10 (1= Ponto de aplicação, no dorso em A e no flanco, em B; 2= Rins).

## 5) DISCUSSÃO:

Investigações *in vivo* e *in vitro* vêm demonstrando atividades imunológicas, antiinflamatórias, antiinfeciosas, e antitumoral/ antimetastática para misturas de enzimas proteolíticas (Beuth et al, 2008). Na literatura, está documentado o uso de proteases na Oncologia, como fármaco principal ou adjuvante, em estudos pré-clínicos e clínicos. Wald e colaboradores (1998) demonstraram que o tratamento de camundongos portadores de carcinoma pulmonar de Lewis com enzimas proteolíticas combinadas (tripsina, quimiotripsina e papaína) foi capaz de aumentar a taxa de sobrevivência desses animais, bem como impedir a disseminação metastática. Já em estudos clínicos com pacientes portadores de tumor mamário (Beuth et al, 2001), ovariano, cabeça e pescoço (Leipner & Saller, 2000), se evidenciou uma clara redução nos efeitos adversos provocados pela radioterapia e quimioterapia quando as proteases foram utilizadas como adjuvante com melhora do quadro geral e aumento da sobrevida. Beuth e colaboradores (2008) relataram, além dessas melhorias, redução significativa de tumores de mama, colon-retal e plasmacitoma.

Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa vem caracterizando bioquímica e farmacologicamente a fração proteolítica P1G10, advinda do látex de *Carica candamarcensis*. Esta fração foi obtida através da separação cromatográfica em coluna Sephadex G10 e é rica em cisteíno proteases cuja atividade proteolítica é cerca de 5 a 7 vezes maior que as enzimas contidas em *Carica papaya* (Teixeira et al, 2008). Dentre as ações de P1G10 estudadas, podemos destacar as atividades angiogênica, mitogênica, cicatrizante cutânea (Mello et al., 2006) e gástrica (Mello et al, 2008; Silva et al, 2008), além de termos obtido, em ensaios preliminares, atividade antitumoral para modelos de carcinoma de Ehrlich e cólon. Dando continuidade ao estudo dessas últimas atividades farmacológicas, o objetivo deste trabalho é a avaliação da atividade antitumoral e antimetastática de P1G10, bem como, investigar alguns de seus possíveis mecanismos de ação em modelo de melanoma murino.

Nesse sentido, foram utilizados modelos singênicos de melanoma B16F1 e B16F10, com inóculos subcutâneos, como preconizado pela Divisão para Tratamento do

Câncer da NCI - EUA para avaliação de novos agentes antineoplásicos (<http://www.cancer.gov/cancertopics/commoncancers>). Para se obter as linhagens celulares B16F1 e B16F10, células B16 são inoculadas por via intravenosa (*i.v.*) em camundongos C<sub>57</sub>Bl6 e, três semanas depois, são dissecadas das colônias pulmonares e cultivadas para serem inoculadas novamente por via *i.v.* O modelo B16F1 se utiliza das células obtidas nesta primeira passagem, enquanto que o modelo B16F10, se utiliza das obtidas na 10<sup>a</sup>, logo, ambas possuem a mesma origem, mas a B16F10 apresenta maior invasividade (Fidler, 1978). Esses modelos fazem parte de um painel juntamente com outros como os de leucemia murina L1210, carcinoma de Ehrlich, carcinoma pulmonar de Lewis e modelos humanos transplantados em animais - carcinomas de cólon, pulmão e mama, amplamente utilizados para os estudos dessas doenças.(Talmadge et al, 2007).

O melanoma humano se trata do segundo tipo de câncer com disseminação mais rápida em populações caucasianas. Embora seja uma neoplasia com bom prognóstico quando tratada precocemente, está associada com uma das mais altas taxas de mortalidade quando em nível mais avançado (Linden, 2004). Apesar de responder pobremente, tanto no homem quanto nos animais, às terapias antineoplásicas, particularmente quando em sua forma invasiva, optamos por esse modelo de estudo pela sua facilidade de execução e de comparação, visto que foi objeto de vários estudos (Perlis & Herly, 2004).

### **5.1) Atividade antitumoral:**

Segundo o Comitê de Ética da UFMG, para modelos tumorais, a massa tumoral não deve ultrapassar 10% do valor da massa do animal. Diante desse critério, inicialmente, acompanhamos o crescimento do tumor B16F1 em função do tempo (Figura 2) e verificamos que o valor máximo de massa tumoral permitido é encontrado por volta do 15<sup>o</sup> dia, após o inóculo celular. Em ensaios subseqüentes, observamos que o crescimento tumoral esteve mais lento, chegando ao valor de massa tumoral correspondente a 10% da corpórea em 20 dias após o inóculo. Atribuímos essa alteração a variações que tenham ocorrido no desenvolvimento da linhagem celular ou dos animais. Por isso, estabelecemos que o tempo experimental fosse de 20 dias, sendo o tratamento iniciado no 4<sup>o</sup> dia, tempo no qual é possível perceber através de manipulação a presença do tumor.

Nossos resultados mostraram que P1G10 apresentou atividade antitumoral, sendo que na dose de 5mg/kg, reduziu a massa tumoral em 88% (Figura 3). A outra dose analisada, 1mg/kg, também mostrou tendência à redução da massa tumoral (44%) em relação ao controle, porém sem significância estatística. Acreditamos que a utilização de um maior número de animais no estudo poderia diminuir as variações e com isso, a diferença poderia ser evidenciada já na menor dose.

Em relação ao modelo utilizado, comparamos nossos resultados com outros utilizando modelos tumorais semelhantes. Meneguelo e colaboradores (2005) avaliaram a massa de tumor primário de modelo B16F10 de camundongos Swiss tratados com a fosfoetanolamina sintética, molécula encontrada na membrana neuronal, porém fosforilada e com comprovada atividade citotóxica. Nesse estudo, foi obtida uma redução de 88% da massa tumoral para os animais tratados com a dose de 6,6 mg/kg. Em outro trabalho, utilizando também o modelo B16F10 subcutâneo, camundongos tratados com a dihidrocucurbitacina-B advinda de *Wilbrandia ebracteata*, um triterpeno oxigenado, na dose de 10 mg/kg apresentaram redução do tumor primário em cerca de 84% (Siqueira et al, 2008). Os dois resultados mostraram percentuais de redução similares às obtidas no nosso trabalho.

Em se tratando de uma amostra com atividade proteolítica, passamos a avaliar a importância desta no efeito descrito acima. Para isso, a fração foi inibida com iodoacetamida (IAA) que é um inibidor irreversível não específico de cisteíno proteases. A inibição das cisteíno proteases ocorre pela acilação da cisteína no sítio ativo pelo grupamento acilo-aminal da iodoacetamida (Salvensen & Nagase, 1990). Os resultados demonstraram uma redução semelhante da massa tumoral para os grupos tratados com P1G10 5 mg/kg e P1G10-IAA 5 mg/kg, porém significativa apenas para o primeiro destes em relação ao controle (Figura 10). A semelhança de efeito entre os dois grupos tratados sugere que a atividade proteolítica não é fundamental para sua eficácia.

Em contra posição, achados da literatura sobre a bromelina, relatam que suas atividades biológicas/farmacológicas, de um modo geral, dependem da atividade enzimática. Em relação ao câncer, a atividade proteolítica se correlaciona a clivagem de receptores de superfície, especialmente a CD44, que são importantes na adesão,

migração e ativação leucocitária, porém, a proteólise não está relacionada a uma atividade antiproliferativa (Maurer et al, 2001). A molécula de adesão CD44 está presente em células tumorais e normais e vários trabalhos já demonstraram que a bromelina altera sua função. Hayle e Haynes (1992) relataram que a bromelina aboliu a função não só de CD44, mas de outros receptores de superfície, como CD45RA, CD62L, CD7 e CD8, em linfócitos T, sem, contudo, apresentar toxicidade celular. Os autores desse trabalho atribuíram o efeito a uma ação proteolítica degradativa, que altera as interações dos receptores com seus ligantes na matriz extracelular. (Munzig et al, 1994). Engwerda e colaboradores (2001) descreveram a atividade imunomodulatória da bromelina, podendo inibir ou estimular a resposta imune de acordo com as populações celulares. Em leucócitos sanguíneos periféricos é mostrado, também, que o efeito proteolítico de bromelina sobre essas moléculas de superfície celulares ocorre de forma dose dependente e é inibido pela  $\alpha 2$ -macroglobulina presente no plasma. Nessas condições, apenas altas concentrações de bromelina são capazes de impedir o efeito inibitório dessas moléculas (Hale et al, 2002). Em contraposição a esta idéia, achados *in vitro* do nosso grupo para a protease purificada CMS2MS2, protease obtida após a cromatografia do CMS2 (protease purificada em CM-Sephadex) em coluna de troca catiônica Mono-S Sepharose, mostraram que a atividade proteolítica desta não é inibida na presença de  $\alpha 2$ -macroglobulina (Bilheiro et al, dados não publicados).

Avaliando o descrito na literatura, podemos observar que antitumorais citotóxicos com diferentes modos de ação, conhecidos e já utilizados na clínica, tem efeito semelhante ou inferior a nossa fração na dose de 5 mg/kg, como os exemplos dados a seguir. Haq e colaboradores (2000) demonstraram que a gemcitabina *i.v.* (120 mg/kg) reduz em cerca de 50% a massa de tumor pancreático humano (HPAC) inoculado (s.c.) em camundongos Balb/C. Podemos observar que a dose utilizada em nosso trabalho é 24 vezes inferior a dose de gemcitabina e que as vias de administração são diferentes. Outros trabalhos com modelo de melanoma B16F10 subcutâneo mostraram a redução do volume do tumor primário em cerca de 80% no 24º dia de tratamento com o alquilante cisplatina (100  $\mu$ g), resultado similar ao nosso, e uma redução bem inferior (cerca de 22%, no 10º dia) para animais tratados com o antimitótico taxano paraclitaxel (20  $\mu$ g) (Lavhale et al, 2009). Szende e colaboradores (2003) relataram o uso combinado do agente citotóxico dacarbazina

(60 mg/kg) com um análogo da somatostatina (TT-232- 1 mg/kg), que tem comprovada ação inibitória da proliferação de células em cultura, em modelo de melanoma B16F10, mostrando redução de 27% da massa tumoral para o grupo tratado. Dentre os estudos envolvendo extratos de plantas, podemos exemplificar a atividade antitumoral do extrato aquoso de *Indigosfera suffruticosa* (planta típica do nordeste brasileiro) rica em alcalóides, flavonóides e proteínas e com alta atividade citotóxica. Esse extrato foi utilizado no tratamento de camundongos Balb/C portadores de sarcoma 180 na dose de 50 mg/kg, via *i.p.*, por 7 dias e gerou uma redução tumoral de cerca de 75% (Vieira et al, 2007). Gupta e colaboradores (2004) relataram que o tratamento com extrato metanólico de *Caesalpinia bonducella* (dose de 200 mg/kg), cujos componentes químicos incluem flavonóides, diterpenoides e esteróides, reduziu em cerca de 71% o volume tumoral em modelo de carcinoma de Ehrlich. Outro trabalho, onde camundongos C57Bl6 portadores do melanoma humano ANDO-2 foram tratados oralmente com a dose de 50 mg/kg do extrato da planta *Calendula officinalis*, rica em flavonóides e saponinas, apresentaram redução de cerca de 75% do volume tumoral. Esse extrato se mostrou citotóxico, uma vez que, apresentou inibição da proliferação celular sobre as linhagens MDA MB231 (adenocarcinoma mamário), B16 (melanoma murino), ANDO-2 (melanoma humano) e JURKAT (células de linfoma de células T) (Jiménez-Medina et al, 2006). Podemos inferir sobre esses achados que P1G10, apesar de ser um “pool” de enzimas proteolíticas, gerou redução tumoral significativa quando utilizada em doses semelhantes às substâncias puras. Os extratos de plantas foram utilizados em doses cerca de 10 vezes superior para gerar um percentual de redução similar.

Em vista do exposto, consideramos a possibilidade da fração atuar como agente citotóxico. Assim, a avaliação da citotoxicidade foi feita através da determinação da IC<sub>50</sub> sobre linhagens celulares normais e tumorais. De acordo com Rieser e colaboradores (1996), para extratos de plantas não purificados, os valores de IC<sub>50</sub> inferiores a 20 µg/mL são considerados ativos, enquanto que para compostos puros, estes valores devem ser inferiores a 4 µg/mL (aproximadamente 10<sup>-6</sup> M). Levando em conta esses dados, podemos relatar a atividade citotóxica de proteases como a bromelina, visto que, esta apresentou valor de IC<sub>50</sub> dentro da faixa estabelecida para agentes citotóxicos sobre células de adenocarcinoma mamário (5x10<sup>-7</sup>M). Porém, o mesmo não ocorreu para as linhagens de melanoma B16F10 e Ehrlich, cujos valores

de IC<sub>50</sub> foram maiores que 10<sup>-6</sup> M (Baez et al, 2007). Em relação a P1G10, encontramos valores de IC<sub>50</sub> ligeiramente superiores à 30 µg/mL para linhagens tumorais, indicando uma baixa citotoxicidade para esta fração (Tabela e Figura 1). Além disso, não foi observada maior seletividade para as células tumorais em relação às normais, visto que, os valores de IC<sub>50</sub> foram semelhantes para todas as linhagens estudadas. O menor valor de IC<sub>50</sub> (1,74 x 10<sup>-6</sup> g/mL) encontrado no nosso estudo ocorreu para a linhagem não tumoral CHO. Contudo, não podemos afirmar que nenhum dos componentes da nossa fração, que é composta por um “pool” de proteínas com massa de aproximadamente 23 kDa e alta atividade enzimática, não apresenta atividade citotóxica. Já foi visto anteriormente que P2CMS e P3CMS, que são proteases purificadas de P1G10 obtidas após eluição em coluna CM-Sephadex, estimularam a atividade mitogênica de forma significativa em células da linhagem L929, o que não ocorre com o tratamento com P1G10 (Gomes et al, 2005). Da mesma forma, portanto, não é possível afirmar que, isoladamente, um ou mais dos componentes desse “pool” não possa ter atividade citotóxica, o que com esses resultados mostramos, é que a ação conjunta desses elementos não possui atividade citotóxica. Diante da observação de que a atividade citotóxica não parece ser o modo de ação responsável pela atividade antitumoral da fração P1G10, buscamos outros mecanismos que pudessem explicar tal atividade.

Em trabalhos anteriores, estudamos a atividade angiogênica de P1G10, utilizando modelo de implante de esponja no dorso de camundongos Swiss. Mello e colaboradores (2006), contudo, demonstraram para modelo de implante esponja ações dose dependentes de P1G10, onde, a dose de 1% foi capaz de reduzir a angiogênese em cerca de 50% em relação ao controle, enquanto que a de 0,1% foi capaz de dobrar os níveis de Hb. Em outro trabalho realizado por nosso grupo também avaliou a atividade angiogênica de P1G10 10 mg/kg na cicatrização de lesões gástricas, através da imunolocalização de PECAM/CD31, molécula de adesão celular que participa dos eventos iniciais da formação de novos vasos. Como resultado, observamos a tendência ao aumento da densidade vascular, já ocorrendo em torno do 9º dia (Silva, 2009).

Entretanto, em um terceiro trabalho realizado pelo nosso grupo, também utilizando modelo de implante de esponja, evidenciou uma ambigüidade nas ações de P1G10.



Em camundongos Swiss, portadores de tumor de Ehrlich sólido, tratados com P1G10 1 mg/kg s.c. por 8 dias, se observou uma redução da quantidade de Hb (68%) em relação aos animais tratados com salina. Nos animais sem tumor, como esperado, a administração de P1G10 promoveu um aumento da vascularização do implante da ordem de 70% em relação ao controle (salina). A quantidade de Hb não foi diferente entre os animais portadores ou não de tumor, mostrando que a presença do tumor não afeta a angiogênese inflamatória. Porém, o tratamento com a fração dos animais com tumor fez com que houvesse uma redução significativa da concentração de Hb na esponja, evidenciando que P1G10 promove a produção de algum mediador pelo tumor que é capaz de afetar a angiogênese inflamatória (Viana et al, 2008). Frente a esses resultados e, uma vez que a angiogênese é de fundamental importância no desenvolvimento tumoral e metastático (Gout & Huot, 2008), optamos por quantificar alguns dos mediadores angiogênicos envolvidos, utilizando técnicas bem estabelecidas para as dosagens de hemoglobina (Hb), da atividade de N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase- (NAG) e de citocinas (VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor; TNF- $\alpha$  - Tumor Necrosis Factor e TGF- $\beta$  - Transforming Growth Factor), sendo essas últimas dosadas tanto em tumor quanto em soro (Belo et al, 2004). Nesse sentido, como primeiro passo, quantificamos os níveis de Hb presentes no tumor de animais tratados com a fração, onde observamos uma redução de aproximadamente 73% (Figura 6) em relação ao grupo controle. Este resultado evidenciou uma ação antiangiogênica tumoral de P1G10 e nos levou à investigação de mecanismos envolvidos nessa ação.

No estudo da angiogênese, um dos parâmetros utilizados é a dosagem da citocina pró angiogênica VEGF. Esta citocina estimula a formação dos vasos sanguíneos e é secretada tanto por células normais quanto tumorais, porém está super expressa nestas últimas (Folkman, 2006). Desta forma, a inibição do VEGF leva à regressão do suprimento sanguíneo tumoral e é uma estratégia racional para o tratamento das neoplasias (Riley et al, 2009). Na literatura, se encontram dados que confirmam o exposto, com no trabalho realizado por Dineen e colaboradores (2008), onde verificaram que o tratamento de camundongos portadores de tumor pancreático, com um antagonista de VEGFR2 (CT-322) reduziu o número de microvasos presentes na massa tumoral.

Nossas análises mostraram que P1G10 (5 mg/kg) foi capaz de reduzir em 54,7% os níveis tumorais de VEGF, em relação ao grupo controle (Figura 8 A). Esta redução significativa corrobora o obtido para os níveis de Hb e sugere um provável mecanismo da ação antiangiogênica de P1G10, na dose e no modelo estudados. Os níveis séricos de VEGF, também, foram mensurados e observamos que o tratamento com a fração não alterou os mesmos (Figura 8 A), sugerindo que sua ação ocorre no local e não sistemicamente.

Além do VEGF, outros mediadores participam da angiogênese. Podemos destacar, o TGF- $\beta$  que induz transcrição do mRNA do VEGF (Akagi et al, 1999) e que atua como promotor da metástase através de seus efeitos no microambiente tumoral, realçando propriedades invasivas e inibindo sistema imune do hospedeiro (Padua e Massagué, 2009). No nosso trabalho, analisando os níveis tumorais de TGF- $\beta$ , não podemos afirmar que este não atua na ação antiangiogênica, visto que a forma ativa deste não foi avaliada (Figura 8C). Em relação aos níveis séricos (ação sistêmica), porém, na literatura, encontramos achados relatando a ação de proteases sobre esta citocina. Desser e colaboradores (2001) demonstraram redução dos níveis séricos de TGF- $\beta$  em humanos portadores de artrite reumatóide, osteomielofibrose e herpes zooster, tratados com combinações enzimáticas contendo bromelina, papaína, tripsina e quimiotripsina. Os autores atribuem esta redução a uma ação das proteases sobre o inibidor  $\alpha$ 2 macroglobulina, resultando em ligação deste último ao TGF- $\beta$  e, conseqüentemente, sua inibição. Trabalho de Paczek e colaboradores (2001) também relatam essa ação das proteases tripsina e bromelina sobre a  $\alpha$ 2-macroglobulina em modelo de diabetes neuropática, com conseqüente redução dos níveis séricos de TGF- $\beta$ . Foi demonstrado que enzimas proteolíticas reduzem os níveis de TGF- $\beta$  no soro pela conversão do inibidor de proteases  $\alpha$ 2 macroglobulina da forma “lenta” para a forma “rápida”, sendo que a forma rápida se liga e inativa TGF- $\beta$  irreversivelmente (Desser et al, 2001). Neste trabalho, a dosagem dos níveis séricos de TGF- $\beta$  não foi realizada.

Outro mediador angiogênico importante, o TNF- $\alpha$ , também foi analisado em nosso estudo. Seu papel na angiogênese é paradoxal e dose dependente. Quando administrado em altas doses e localmente, esta citocina gera uma destruição seletiva dos vasos sanguíneos tumorais e, portanto, uma ação antitumoral. Porém,

quando produzido cronicamente pelo organismo, atua como potente agente tumoral contribuindo para o remodelamento tecidual e desenvolvimento do estroma necessários para o crescimento tumoral, além de atuar, assim como o TGF- $\beta$ , induzindo transcrição do mRNA do VEGF (Balkwill, 2002). Contudo, nossa análise para os níveis de TNF- $\alpha$ , tanto tumoral quanto séricos (Figuras 8B e 9B), não evidenciou diferença entre os grupos tratados e controle. Podemos inferir, portanto, que, possivelmente, a ação antiangiogênica de P1G10 não advém da ação sobre TNF- $\alpha$ .

Além dos mediadores angiogênicos mencionados anteriormente, a resposta inflamatória produzida frente à presença de células tumorais também merece atenção no processo de angiogênese. Dentre as células infiltradas no estroma tumoral, os macrófagos apresentam particular importância (Balkwill e Mantovanni, 2001). Analisando o papel destas células na progressão tumoral, há divergência entre os achados da literatura. Lu et al (2006) afirmaram que macrófagos ativados são recrutados para a eliminação das células transformadas. Da mesma forma, Elgert e colaboradores (1998) mostraram a mediação da resposta antitumoral de macrófagos que acontece via secreção de fatores como a interleucina 10 (IL-10) e prostaglandina E2 (PGE2). Em contraposição a essa idéia, outros autores descreveram que macrófagos podem ser induzidos pelas células tumorais a secretarem citocinas pró-angiogênicas e fatores de crescimento, como o VEGF e a endotelina 2, e, desta forma, contribuir com o crescimento tumoral (Grimshaw et al, 2002; Pollard et al, 2004). A idéia mais corrente, porém, é a que em tumores já estabelecidos os macrófagos atuam favorecendo a progressão tumoral (Schafer & Werner, 2008). No nosso trabalho, utilizamos a metodologia de dosagem da atividade de NAG ( $\alpha$  N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase), que é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativados, para quantificar a infiltração dessas células no tumor (Belo et al, 2004). Em relação a essas medidas, observamos um aumento significativo (31,9%) da atividade de NAG para o grupo tratado com P1G10 (Figura 7). Trabalhos publicados para outras proteases mostraram que estas podem atuar como fatores modulatórios da resposta imune. Biópsias de cólon humanos tratadas *in vitro* com bromelina apresentaram aumento de vários mediadores inflamatórios, entre eles citocinas como as interleucinas 5, 12, 13 e o TNF- $\alpha$  (Onken et al, 2008). Ergwerda e colaboradores (2001) também mostraram *in vitro* que a bromelina pode

atuar sob a imunidade inata, ativando macrófagos que por sua vez aumentam a produção de  $\text{INF-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  e  $\text{IL-6}$ , gerando, nesse contexto, atividade pró inflamatória. Contrariando a idéia relatada anteriormente de que a resposta inflamatória pode auxiliar na progressão tumoral, estes autores relataram o potencial da bromelina na ativação da resposta inflamatória em situações onde ela pode estar deficiente, como em indivíduos imunocomprometidos. Entretanto, nossos resultados sugerem que o saldo final dentre os processos angiogênicos e inflamatórios estudados neste trabalho é um efeito antiangiogênico, evidenciado pela redução dos níveis de VEGF e dando como resultado direto a redução da quantidade de vasos expressa pela redução da quantidade de Hb.

Dando continuidade ao estudo do mecanismo de ação antitumoral de P1G10, utilizamos metodologia de marcação de P1G10 padronizada no Laboratório de Radioisótopos na Faculdade de Farmácia da UFMG. O objetivo foi avaliar a possível variação na biodistribuição de P1G10 em animais portadores de melanoma B16F1. Assim, administramos P1G10 marcada com o isótopo radioativo  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  e, com o auxílio de contador gama e da gama câmara, medimos a captação da radioatividade no tumor e em diferentes órgãos. Mostramos que para o tumor, a captação é maior no 5º dia, sendo o valor de  $K_p$  (coeficiente de partição tumor/sangue, ou seja, a relação entre a quantidade de fração distribuída no tumor e a presente na corrente sanguínea) de  $0,86 \pm 0,25\%$ , que é semelhante ao valor encontrado no sangue. Esse nível diminui ao longo do tratamento, sendo de  $0,44 \pm 0,12$  no 10º dia e  $0,39 \pm 0,08$  no 16º dia (Figura 11). Este resultado corrobora a idéia de que P1G10 apresenta atividade antiangiogênica, visto que, uma menor vascularização no tumor pode explicar a redução da concentração de P1G10 marcado no tumor ao longo do tratamento. A biodistribuição de P1G10 apresenta perfil semelhante para animais saudáveis e para aqueles portadores de melanoma e esteve aumentada nos órgãos relacionados à excreção e metabolismo, como rins e bexiga, em todos os intervalos de tempo avaliados. Como nossas imagens foram feitas em 1 hora após a administração, nesta fase, provavelmente P1G10 já está em processo de eliminação pelo organismo (Lemos et al, 2008).

Todas as ações de P1G10 relatadas acima resultam em um aumento de sobrevivência nos animais com melanoma B16F1 (Figura 4). O tratamento com a

fração (5 mg/kg) foi capaz de inibir quase totalmente a letalidade durante os primeiros 8 dias, porém, a partir do 9º dia observamos uma mortalidade semelhante à do grupo controle (sem tratamento - 51,4%). O antimetabólito citotóxico – 5-FU, utilizado com controle positivo, por sua vez, promoveu 29% de mortalidade até o 8º dia e estabilização da sobrevivência para o período restante. O 5-FU possui alta toxicidade *in vivo* apresentando efeitos colaterais severos como leucopenia, neutrocitopenia e trombocitopenia descrita para humanos em poucas semanas após o início da quimioterapia (Shibuya et al, 2004). Os efeitos tóxicos de 5-FU poderiam explicar as mortalidades observadas até o 8º dia após o término do tratamento.

Estudo semelhante realizado com a bromelina demonstrou um aumento de sobrevivência significativo em modelos de leucemia P-388, sarcoma (S-37), tumor ascítico de Ehrlich, carcinoma pulmonar de Lewis, neste último, com redução de cerca de 6 vezes do número de colônias metastáticas pulmonares, mas, com menos eficácia que o 5-FU, utilizado como controle. Não houve aumento de sobrevivência para o modelo de melanoma B16F10 (Baez et al, 2007). No nosso trabalho, além de considerar o número percentual de animais mortos ao longo do tempo, avaliamos a massa tumoral nos animais no *pos mortem*. Observamos que estas massas estiveram significativamente menores em relação ao grupo controle para o grupo P1G10 durante todo o ensaio. Tanto no ensaio realizado pelo nosso grupo quanto para o estudo da sobrevivência com a bromelina, a utilização das proteases se deu por um tempo pré determinado (15 dias). Trabalhos realizados pelo nosso grupo com camundongos Swiss portadores de carcinoma de Ehrlich ascítico tratados por 10 dias com P1G10 nas doses de 1,3 e 5 mg/kg, mostraram a redução da massa tumoral para a dose de 5 mg/kg. Contudo, em animais implantados com tumor de Ehrlich sólido tratados por 29 dias com P1G10, se observou uma redução significativa do volume tumoral na dose de 3 mg/kg (Viana et al, 2008). Desta forma, temos indicações de que a sobrevivência poderia ser maior caso o tratamento fosse feito durante um período mais prolongado, utilizando doses mais baixas, visto que o efeito antitumoral de P1G10 não se dá por atividade citotóxica. Acreditamos, também, que o aumento da sobrevivência se dê pela melhora da condição geral do indivíduo. Esta afirmação tem base em resultados de cicatrização de úlcera gástrica em ratos Wistar, onde o grupo tratado com a fração obteve além da aceleração da cicatrização, um ganho efetivo de massa corpórea em relação ao grupo controle

(Araújo e Silva, 2009). Este efeito é desejável em situações, como o câncer, onde a caquexia é uma das principais conseqüências deletérias. A caquexia neoplásica é uma síndrome que se caracteriza por anorexia, disfunção imune, diminuição da massa muscular e uma variedade de alterações, resultante, primeiramente de alterações na ingestão e da má absorção de nutrientes (Guimarães, 2002). Portanto, uma substância que minimize essa situação pode aumentar e melhorar a qualidade da sobrevivência de pacientes portadores de neoplasias.

Através destes resultados, podemos concluir que a capacidade antitumoral não advém da atividade citotóxica da fração, assim como de sua atividade proteolítica. Por outro lado, ações como a atividade antiangiogênica e a melhora da condição geral do indivíduo podem estar relacionadas a esta propriedade.

## **5.2) Atividade antimetastática:**

O estudo da atividade antimetastática foi iniciado com a padronização do modelo B16F10. O tempo de extirpação das orelhas foi estabelecido em 15 dias após o inóculo inicial, visto que, nesta etapa o tumor se encontra em um tamanho de fácil remoção cirúrgica. Foi possível observar que as metástases pulmonares já ocorriam, à partir do 14º dia (Figura 13), em um percentual superior a 75% porém, com características diferentes para cada tempo de sacrifício. Enquanto as metástases obtidas no 21º dia eram maiores e mais numerosas, aquelas do 14º, tinham aspecto de pequenos pontos. No 28º dia, os animais se apresentavam caquéticos e as perdas por mortes se iniciaram. Desta forma, se optou pelo tempo de administração de P1G10 por 21 dias, após a remoção do tumor.

Obtivemos uma redução de cerca 83% do percentual de animais acometidos com metástase pulmonar para o grupo tratado com a dose de 5 mg/kg e, mesmo com a dose de 1 mg/kg, houve uma redução de cerca 63%. Ao correlacionarmos este resultado ao obtido para o modelo B16F1, verificamos uma atividade antimetastática importante, uma vez que, já na menor dose, houve um expressivo percentual de redução do número de animais com metástase em relação ao controle. Com relação ao número de pontos metastáticos, houve redução de cerca de 50% nos animais tratados com P1G10 5 mg/kg em relação ao controle, sugerindo que os efeitos antimetastáticos são mais pronunciados que os antitumorais. Dados da literatura,

como o trabalho de Guimarães - Ferreira e colaboradores (2007), relatam a atividade antimetastática para a cisteína protease fastuosaina, advinda de *Bromelia fastuosa* (2mg/kg), onde se observa uma redução de aproximadamente 94% no número de colônias metastáticas para modelo B16F10 com inóculo endovenoso. Outras substâncias também demonstraram reduções de colônias como podemos comprovar por dados da literatura. Szende e colaboradores (2003) relataram uma redução de cerca de 77% do número de colônias metastáticas para animais tratados com a dacarbazina (60 mg/kg) combinada com o TT-232 (1 mg/kg), que é um análogo da somatostatina. Outro trabalho utilizando extrato lipídico advindo do basidiomiceto *Agaricus blazei* Murill, que é rico em ergosterol, para tratar camundongos portadores de carcinoma pulmonar de Lewis, evidenciou uma redução de cerca de 70% no número de colônias metastáticas na melhor dose de 900 mg/kg (Takaku et al, 2001). Em relação a esses achados, podemos destacar que P1G10 reduziu o número de pontos metastáticos em doses bem inferiores aos outros exemplos citados.

Uma possível explicação para a atividade antimetastática vista para a fração P1G10 pode ser através da redução da adesão e invasão das células tumorais, como visto para outras proteases como a bromelina e a fastuosaina. Trabalhos *in vitro* realizados sobre células de glioma humanas tratadas com a bromelina mostraram que as células formaram agregados, e foi verificada uma redução na expressão de moléculas de adesão CD44, integrinas  $\beta 1$  e  $\alpha 3$ . Os autores sugerem que esta ação seja dependente da atividade proteolítica que pode atuar clivando essas proteínas de superfície (Tysnes et al, 2001). Guimarães-Ferreira e colaboradores (2007) estudaram *in vitro* os mecanismos envolvidos na ação antimetastática da fastuosaina. Essa protease foi capaz de alterar a morfologia celular, além de promover o destacamento das células e a formação de agregados, sendo, contudo, esta ação, reversível com a remoção da fastuosaina. Posteriormente, no estudo do efeito dessa protease sobre a expressão de receptores CD44, verificou-se uma redução nesta de forma dose dependente, a exemplo do descrito para a bromelina (Hale & Haynes, 1992). Este efeito é dependente da atividade proteolítica, visto que, não se manifestou quando se utilizou a fastuosaina inibida por E-64 (inibidor de cisteína proteases). Em 5 h, após a remoção da enzima, 40% dos receptores foram expressos novamente, portanto, sendo o efeito reversível. Contudo, vale ressaltar que a atividade antitumoral de P1G10 independe de sua atividade proteolítica.

Os receptores de superfície, como CD44, integrinas  $\beta 1$  e  $\alpha 3$ , tem sua expressão aumentada em vários tipos de tumor como o gástrico, pancreático e pulmonar. Estas moléculas estão relacionadas ao processo de migração, na medida em que controlam a ligação das células à matriz extracelular e à sobrevivência celular, regulando processos apoptóticos, portanto tem fundamental importância no processo de metástase (Stetler-Stevenson, 1993; Harada et al,2000). Entretanto, estudos para a avaliação da expressão dessas moléculas, quando do tratamento das células com P1G10 se fazem necessários, para compreensão desses mecanismos.

Outro mecanismo que pode estar envolvido na ação antimetastática de P1G10 é uma ação pró-inflamatória, como a vista para a fastuosaina. Essa protease, quando administrada a camundongos, por 21 dias, *i.p.*, tanto na forma ativa ou inibida com E-64, promoveu um aumento no recrutamento e ativação de macrófagos, evidenciado através da expressão de marcadores de superfície (*p.e.* CD3, CD-86 e CD-1), sugerindo que a protease ativa a resposta pró-inflamatória. Em um trabalho recente de nosso grupo, foi demonstrado que a fração P1G10 é capaz de promover a ativação de macrófagos, que foi medida através da dosagem de NAG em implantes de esponja no dorso de camundongos Swiss (Christiano et al, 2007). Este efeito nos permite inferir que uma possível ação de P1G10 sobre as células do sistema imune, sobretudo macrófagos, pode contribuir para a sua ação antimetastática. Entretanto, o papel do macrófago na metástase é controverso, pois, apesar de trabalhos relatarem sua atividade antimetastática (Elgert et al, 1998; Lu et al; 2006), outros evidenciam sua atividade metastática através de ações como a degradação proteolítica da matriz extracelular e liberação de fatores como o VEGF e o TNF- $\alpha$ .

Batkin e colaboradores (1988) sugeriram que a ação anticoagulante da bromelina pode estar implicada em seus efeitos antimetastáticos. Na presença de plaquetas, há um aumento na secreção de fatores de crescimento, como o TGF- $\alpha$ , o PDGF ou a trombina, pelas células tumorais. Além disso, as plaquetas podem formar um agregado com as células do tumor e, desta forma, aderirem mais facilmente ao endotélio, favorecendo a metástase (Maurer, 2001). Em relação à P1G10, estudos recentes do nosso grupo relataram que em baixas concentrações (0,01 a 1,0  $\mu\text{g}$  em 2  $\mu\text{L}$  de água MiliQ), a fração exibe atividade anticoagulante. Mostrou – se também



que uma protease purificada da fração, CMS2MS2, não é inibida na presença de  $\alpha$ 2-macroglobulina (Bilheiro et al – dados não publicados). Esses resultados sugerem, a exemplo da bromelina, que uma possível ação anticoagulante de P1G10 possa estar envolvida na sua ação antimetastática.

Quanto à sobrevivência, no grupo tratado com P1G10 não houve mortes até o 8º dia e, mesmo até o 12º, quando ocorreu um óbito, a *causa mortis* não pareceu estar relacionada à doença, visto que o animal não apresentou pontos metastáticos em qualquer órgão. Wald e colaboradores (2001) demonstraram o aumento do tempo de sobrevivência para camundongos C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> portadores de melanoma B16F10 tratados com a mistura enzimática (tripsina, quimiotripsina e papaína). Observou-se que o tempo de sobrevivência (em dias) quase dobrou para o grupo que teve o tratamento iniciado logo após a cirurgia de remoção do tumor em relação ao grupo controle. O grupo tratado com a mistura enzimática 24 h antes do inóculo celular teve seu tempo de sobrevivência aumentado mais de 2,5 vezes e, além disto, se observou que 36% dos animais não apresentaram qualquer sinal de crescimento tumoral. Nos resultados aqui obtidos, verificamos que P1G10 apresenta além da redução de ocorrência de metástases, aumento da sobrevida de camundongos com melanoma metastático. Esse achado é de grande valia, uma vez que o tratamento atual do câncer envolve a utilização de medicamentos que atuam reduzindo a massa tumoral e possibilitando a remoção cirúrgica, mas que carecem de uma ação num estágio mais avançado da doença, na qual pode ocorrer metástases.

Com o objetivo de avaliar a possível variação na biodistribuição de P1G10 em pulmões de camundongos portadores de melanoma B16F10, realizamos ensaios utilizando P1G10 5 mg/kg marcada com o isótopo radioativo <sup>99m</sup>Tc e, com o auxílio de contador gama, medimos a captação da radioatividade no pulmão e em diferentes órgãos. O tratamento foi executado por 16 dias, sendo que os animais receberam P1G10-<sup>99m</sup>Tc apenas no dia de sacrifício. Apesar de não termos dados do percentual de ocorrência ou do número de pontos de metástase pulmonar para este ensaio, resultados anteriores (Figuras 14) nos mostraram que o valor percentual de ocorrência de metástases foi de cerca de 17% no grupo tratado com a dose de 5 mg/kg. Desta forma, se pode inferir que, provavelmente, mesmo que haja afinidade de P1G10 para metástase, talvez dificilmente esta seja percebida, visto

que tanto o percentual de metástases como o número de pontos são reduzidos em animais tratados com a fração. Esses achados, contudo, mostraram valores de  $K_p$  (coeficiente de partição pulmão/sangue, ou seja, a relação entre a quantidade de fração distribuída no pulmão e a presente na corrente sanguínea) semelhantes para os pulmões dos grupos sadio e portadores de melanoma B16F10 ao longo de todo o tempo, não apresentando uma maior afinidade pelos pulmões que possuísem as metástases (Figura 20). Em relação às imagens cintilográficas tomadas em 1 h após a administração, assim como ocorreu para o modelo B16F1, observamos que a distribuição de P1G10 esteve aumentada em órgãos relacionados à excreção em todos os intervalos de tempo avaliados, logo, nesta fase, provavelmente P1G10 já está em processo de eliminação pelo organismo. Esse estudo não mostrou uma maior captação pulmonar de P1G10 em qualquer tempo de tratamento, logo, corrobora com a hipótese, já citada, do não envolvimento de ação citotóxica, também, na atividade antimetastática.

Com base no exposto, podemos concluir que P1G10 possui um expressivo efeito antimetastático em dose menor que as encontradas para outras proteases, conforme descrito na literatura, e que a necessária para evidenciar sua atividade antitumoral. Como mecanismo de ação, não podemos fazer afirmações com base nos resultados aqui apresentados. Acreditamos que um dos possíveis mecanismos envolvidos na atividade antimetastática pode estar vinculado a atividade anticoagulante de proteases contidas em P1G10, conforme já discutido. Além disso, a melhora das condições gerais do indivíduo, observada em diferentes modelos animais, também pode estar relacionada a essa atividade.

## **6) CONCLUSÃO:**

A fração proteolítica do látex de *C. candamarcensis* P1G10 possui atividades antitumoral e antimetastática significativas, gerando redução da massa tumoral em modelo B16F1 e redução do percentual de ocorrência e do número de pontos de metástase em modelo B16F10, com aumento do tempo de sobrevivência em ambos os casos.

Com os resultados obtidos, podemos concluir que a capacidade antitumoral não advem da atividade citotóxica da fração, assim como de sua atividade proteolítica. Por outro lado, a atividade antiangiogênica tumoral pode estar relacionada a essa propriedade.

## 7) Referências bibliográficas:

1. Akagi et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by interleukin-1beta. **Brit. J. Canc.** 80, 1506-1511, 1999.
2. Alonso et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profile: a tissue microarray-based study. **Am. J. Pathol.** 164: 193-203, 2004.
3. Araújo et al. Percepções sobre a Vida e a Doença por Mulheres Submetidas à Quimioterapia Antineoplásica. **Rev. Min. Enferm.** 10(3): 247-252, 2006.
4. Ashour et al. Flt3 ligand delivered in a pluronic formulation prolongs the survival of mice with orthotopic pancreatic adenocarcinoma. **Cancer Biother Radiopharm.** 22(2):235-238, 2007
5. Baez et al. *In vivo* antitumoral activity of stem pineapple (Ananas comosus) bromelain. **Planta Med.**73:1-7, 2007.
6. Baeza et al. Proteolytic Enzymes in *Carica candamarcensis*. **J. Sci. Food Agri.** 51: 1-9, 1990.
7. Bailey, P. Sponge Implants as Models. **Meth.Enzym.** 162, 327-334, 1988.
8. Balkwill et al. Inflammation and cancer: back to Virchow. **Lancet.** 357, 539-545, 2001
9. Belo et al. Differential effects of antiangiogenic compounds in neovascularization, leukocyte recruitment, VEGF production, and tumor growth in mice. **Cancer Invest.** 22 (5): 723-729, 2004.
10. Batkin et al. Antimetastatic effect of bromelain with or without its proteolytic and anticoagulant activity. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** 114: 507–508, 1988
11. Beuth et al. Impact of Complementary Oral Enzyme Application on the Postoperative Treatment Results of Breast Cancer Patients – Results of an Epidemiological Multicentre Retrolective Cohort Study. **Cancer Chem. Pharm.** 47, S45-54, 2001
12. Beuth, J. Proteolytic Enzyme Therapy in Evidence-Based Complementary Oncology: Fact or Fiction? **Integr Cancer Ther.** 7(4):311-316, 2008.
13. Bian et al. Angiogenesis as an Immunopharmacologic Target in Inflammation and Cancer. **Int. Immunop.** 4: 1537-1547, 2004.
14. Bidard et al. A “class action” against the microenvironment: do cancer cells cooperate in metastasis? **Cancer Met.Rev.** 27(1): 5-10, 2008.

15. Brahimí & Pouysségur. The role of the Hypoxia Inducible Factor in tumor metabolism growth and invasion. **J. Bull. Cancer**. 93(8): 73-80, 2006.
16. Bravo et al. A biochemical Comparison Between Latex from *Carica candamarcensis* and *C. papaya*. **Braz. J. Med. Biol.** 27(12): 2831-2842, 1994.
17. Bromme et al. Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. **Methods**. 32(2): 199-206, 2004.
18. Carmeliet & Jain. Angiogenesis in Cancer and Other Diseases. **Nature**. 407: 249-257, 2000.
19. Castro, I.R. Studies on papain production. **Natural Sci. Depart. Bureau Tech. J.**, 233: 81-88, 1981
20. Chiarugi & Giannoni. Anoikis: A necessary death program for anchorage-dependent cells. **Biochem Pharmacol**. 76(11): 1352-1364, 2008.
21. Christiano et al. Avaliação de parâmetros inflamatórios promovidos por fração com atividade cicatrizante obtida do látex de *Carica candamarcensis*. **39º Cong Bras Farm Ter Exp**. 09.021, 2007.
22. Dai et al. Molecular Correlates of Site Specific Metastasis. **Sem. Rad. Oncol**. 16: 102-110, 2006.
23. De La Taille et al. Hormone-refractory prostate cancer: a multi-step and multi-event process. **Prostate Cancer Prostatic Dis**. 4(4):204-212, 2001.
24. Deryugina & Quigley. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. **Cancer Met Rev**. 25: 9–34, 2006.
25. Dessler et al. Oral therapy with proteolytic enzymes decreases excessive TGF-beta levels in human blood. **Cancer Chemother Pharmacol**. 47: S10-S15, 2001.
26. Dineen et al. The Adnectin CT-322 is a novel VEGF receptor 2 inhibitor that decreases tumor burden in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer. **BMC Cancer** 8: 352, 2008.
27. Eccles & Welch. Metastasis: Recent Discoveries and Novel Treatment Strategies. **Lancet**. 369(9574): 1742-1757, 2007.
28. Elgert et al. tumor induced immune dysfunction: the macrophage connection **J. Leukoc Biol**. 64: 275-290, 1998.
29. Engwerda et al. Bromelain Activates Murine Macrophages and Natural Killer Cells *in Vitro*. **Cell Immun**. 210: 5-10, 2001.

30. Ergwerda et al. Bromelain modulates T cell and B cell immune responses *in vitro* and *in vivo*. **Cel Immun.** 210,: 66–75, 2001
31. Esser, R. Surgical Treatment of Malignant Melanoma. **Surg. Clin. North Am.** 83(1): 109-56, 2003.
32. Ferrara & Kerbel. Angiogenesis as a Therapeutic Target. **Nature.** 438: 967-974, 2005.
33. Ferreira et al. Tumor Growth, Angiogenesis and Inflammation in Mice Lacking Receptors for Platelet Activating Factor (PAF). **Life Sci.** 81: 210-217, 2007.
34. Fidler, J. Tumor Heterogeneity and the Biology of Cancer Invasion and Metastasis. **Cancer Res.** 38(9): 2651-2650, 1978.
35. Fiers, W. Tumor necrosis factor: characterization at the molecular, celular and *in vivo* level. **FEBS Lett.** 285, 199-212, 1991.
36. Folkman. Angiogenesis. **Annu Rev Med.** 57: 1-18, 2006.
37. Formenti & Demaria. Local control by radiotherapy: is that all there is? **Breast Cancer Res.** 10:215-219, 2008.
38. Frisch & Screaton. Anoikis mechanisms. **Curr Opin Cell Biol.** 13:555–562, 2001.
39. Gadeliya et al. Strategies for early melanoma detection: Approaches to the patient with nevi. **J Am Acad Derm.**60 (5): 719-735, 2009.
40. Gerard, G. Anticancer treatment and bromelain. **Agressologie.** 4: 261-274, 1974.
41. Gomes et al. Isolation of Two Plant Proteinases in Latex from *Carica candamarcensis* Acting as Mitogens Mammalian Cells. **Planta Med.** 71(3):244-248, 2005.
42. Gout & Huot. Role of Cancer Microenvironment in Metastasis: Focus on Colon Cancer. **Cancer Microenviron.** 1(1): 69–83., 2008
43. Grimshaw et al. Endothelin-2 is a macrophage chemoattractant: implications for macrophage distribution in tumors. **Eur J Immunol.** 32(9): 2393-2400, 2002
44. Guimarães & Linden. Programmed cell deaths. **Eur J Bioc.** 271(9): 1638-1650, 2004.
45. Guimarães, G. Nutrição e câncer. **Acta oncol. bras.** 22(1):227-232, 2002.

46. Gupta et al. Antitumor activity status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich ascites carcinoma in swiss albino mice. **J Pharmacol Sci.** 94(2):177-184, 2004.
47. Hale et al. Bromelain treatment alters leukocyte expression of cell molecules involved in cellular adhesion and activation. **Clin Immun.** 104 (2):183–190, 2002
48. Hanahan & Weinberg. The hallmarks of cancer. **Cell.**, 100 (1):57-70, 2000
49. Haq et al. Addition of Matrix Metalloproteinase Inhibition to Conventional Cytotoxic Therapy Reduces Tumor Implantation and Prolongs Survival in a Murine Model of Human Pancreatic Cancer. **Cancer Res.** 60: 3207-3211, 2000.
50. Harada et al. Introduction of antisense CD44 cDNA downregulates expression of overall CD44 isoforms and inhibits tumor growth and metastasis in highly metastatic colon carcinoma cells. **Int J Cancer.** 91(1):67-75, 2000.
51. Harper & Bates. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? **Nat Rev.** 8(11): 880–88, 2008.
52. Hayle & Haynes. Bromelain treatment of human T cells removes CD44, CD45RA, E2/MIC2, CD6, CD7, CD8, and Leu 8/LAM surface molecules and markedly enhances CD2-mediated T cell activation. **J. Immunol.** 149, 3809–3816, 1992.
53. Heo et al. Evaluation of Tetrazolium-Based Semiautomatic Colorimetric Assay for Measurement of Human Antitumor Cytotoxicity. **Cancer Res.** 50: 3681-3690, 1990.
54. Holmgren et al. Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. **Nat Med.** 1:149-153, 1995.
55. Jamieson & Lippard. Structure, Recognition and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. **Chem. Rev.** 99(9), 2467-2498, 1999.
56. Jiménez-Medina et al. A new extract of the plant *calendula officinalis* produces a dual *in vitro* effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. **BMC Cancer.** 6: 119., 133, 2006;
57. Jin & Varner. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. **Brit J Cancer,** 90, 561–565.

58. Katz et al. Patient Involvement in Surgery Treatment Decisions for Breast. **Cancer J Clin Onc**, 23(24): 5526-5533, 2005.
59. Kitano et al. A multicenter study on laparoscopic surgery for colorectal cancer in Japan. **Surg Endosc**. 20(9):1348-1352, 2006.
60. Krüger et al. Immune Based Therapies in Cancer. **Histol. Histopathol**. 22(6): 687-696, 2007.
61. Kuboyama et al. Stereocontrolled Total Synthesis of (+) Vincristine. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 17, 11966-11970, 2004.
62. Lavhale et al. A Novel Triterpenoid Isolated from the Root Bark of *Ailanthus excelsa* Roxb (Tree of Heaven), AECHL-1 as a Potential Anti-Cancer Agent. **PLoS ONE**.; 4(4): 1-11, 2009.
63. Lee et al. The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. **J Cell Biol**. 172(7): 973–981, 2006.
64. Leipner & Saller. Systemic enzyme therapy in oncology: effect and mode of action. **Drugs**. 59(4): 769-780, 2000.
65. Lemos et al. Parâmetros farmacocinéticos da fração cromatográfica proteolítica P1G10 do látex de *Carica candamarcensis*. **40º Cong Bras Farm Ter Exp**. 09.093, 2008.
66. Linden, K. Screening and early detection of skin cancer. **Curr Oncol Rep**. 6:491-496, 2004.
67. Lu et al. Inflammation: a key event in cancer development **Mol Cancer Res**, 4(4):221-33, 2006.
68. Maurer,H. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. **Cell Mol Life Sci**. 58: 1234-1245, 2001.
69. Mazzone & Comoglio. The Met Pathway: Master Switch and Drug Target in Cancer Progression. **The FASEB Journal**. 20: 1611-1621, 2006.
70. Mello et al. Plant Proteinases: Their Potential as Therapeutic Drugs. **Rec. Prog.Med. Plants**. 11(12): 211- 224, 2006.
71. Meneguelo et al. Efeitos antitumorais da fosfoetanolamina sintética no melanoma murino B16F10. **Cad Res 5º EncoBio**. 26, 2005
72. Meresse et al. Etoposide: Discovery and Medicinal Chemistry. **Curr. Med. Chem**. 11(18), 2443-2466, 2004.
73. Minarowska et al. Human Cathepsin D. **Folia Hist. Cytob**. 46(1): 23-38, 2008.



74. Mocellin & Nitti. TNF and cancer: the two sides of the coin. **Front Biosci.** 13: 2774-2783, 2008.
75. Moses et al. TGF beta regulation of cell proliferation. **Princ Takamat Symp.** 24: 250-263, 1994.
76. Müller, B. Cytokine imbalance in non-immunological disease. **Cytokine.** 18, 334-339, 2002.
77. Munzig et al. Bromelain protease F9 reduces the CD44 mediated adhesion of human peripheral blood lymphocytes to human umbilical vein endothelial cells **FEBS Letters** 351:215-218, 1994.
78. Nagase & Woesser. Matrix Metalloproteinases. **J. Biol. Chem.** 274: 1491-1494, 1999.
79. Nagle et al. Expression of hemidesmosomal and extracellular matrix proteins by normal and malignant human prostate tissue. **Am J Pathol** 146:1498–1507, 1995.
80. Nunan et al. Technetium-99m Labeling of Tityustoxin and Venom from the Scorpion *Tityus serrulatus*. **Appl. Radiat. Isot.** 57(6):849-852, 2002.
81. Nurse et al. Understanding the cell cycle. **Nat Med.** 4: 1103-1106, 1998.
82. Onken et al. Bromelain treatment decreases secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines by colon biopsies *in vitro*. **Clin Immunol.** 126(3):345-352, 2008.
83. Paczek et al. Protease administration decreases enhanced transforming factor beta 1 content in isolated glomeruli of diabetic rat. **Drugs Exp Clin Res.** 27(4):141-149, 2001.
84. Padua & Massagué. Roles of TGF beta in metastasis. **Cell Res.** 19(1):89-102, 2009.
85. Perlis & Herlyn. Recent advances in melanoma biology. **Oncologist.** 9(2):182-187, 2004.
86. Plunkett, M. & Hailey, J. An *In Vivo* Quantitative Angiogenesis Model Using Tumor Cells Entrapped in Alginate. **Lab. Invest.** 62, 510-517, 1990.
87. Pollard JW. Tumor educated macrophages promote tumor progression and metastasis **Nat Rev Cancer** 4(1):71-78, 2004.

88. Pyke et al. () The gamma 2 chain of kalinin/laminin 5 is preferentially expressed in invading malignant cells in human cancers. **Am J Pathol** 145:782–791, 1994.
89. Ravi & Chari. Targeted Cancer Therapy: Confering Specificity to Cytotoxic Drugs. **Immuno. Gen.** 41(1): 98-107, 2007.
90. Rieser et al. Five novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from the seeds of *Annona muricata*. **J Nat Prod.** 59(2):100-108, 1996.
91. Riley & Desai. The Molecular Basis of Cancer and the Development of Targeted Therapy. **Surg Clin North Am** 89(1): 1-15, 2009.
92. Salvesen, G. and Nagase, H. Inhibition of proteolytic enzymes. **Proteolytic enzymes: a practical approach**. Eds. Oxford: IRL Press, 83-104, 1990.
93. Schäfer & Werner. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. **Nat. Rev.**9:1-11, 2008.
94. Schroth et al, Breast Cancer Treatment Outcome With Adjuvant Tamoxifen Relative to Patient CYP2D6 and CYP2C19 Genotypes. *J Clin Onc* .25(33): 5187-5193, 2007.
95. Sessa et al. Biomarkers of Angiogenesis for the Development of Antiangiogenic Therapies in Oncology: Tools or Decorations? **Nat. Clin. Pract. Oncol.** 5(7): 378-391, 2008.
96. Shalajja et al. Discovery and Mechanism of Action of a Novel Series of Apoptosis Inducers with Potential Vascular Targeting Activity. **Mol. Cancer Ther.** 3: 1365-1374, 2004.
97. Shibuya et al. Induction chemotherapy with docetaxel, cisplatin and 5-fluorouracil for tongue cancer. **Kobe J. Med Sci.** 50, 1–7, 2004.
98. Silva et al. A Mitogenic Protein Fraction in Latex from *Carica candamarcensis*. **Planta Med.** 69: 926-932, 2003.
99. Silva et al. Papel do óxido nítrico e de grupos sulfidrílicos não protéicos na ação gastroprotetora de fração obtida do látex de *Carica candamarcensis*. 40<sup>o</sup> Cong Bras Farm Ter Exp. 09.106, 2008.
100. Siqueira et al. Evaluation of the antitumoral effect of didydrocucurbitacin B in both in vitro and in vivo models. **Cancer Chemother Pharmacol.** 64(3):529-538, 2009.
101. Sloane et al. Cathepsin B and its Endogenous Inhibitors: The Role in Tumor Malignancy. **Cancer Met. Rev.** 9(4): 333-352, 1990.

102. Stefanini et al. A compartment model of VEGF distribution in blood, healthy and diseased tissues. **BMC Syst Biol.** 77: 1-25, 2008.
103. Stetler-Stevenson et al. Tumor Cell Interactions with the Extracellular Matrix During Invasion and Metastasis. **Ann Rev Cell Biol.** 9: 541-573, 1993.
104. Strell & Entschladen. Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. **Cell Comm Sign.** 1-10, 2008.
105. Stupack, D. Integrins as a distinct subtype of dependence receptors. **Cell Death Diff.**12:1021-1030, 2005.
106. Szende et al. Effect of a novel somatostatin analogue combined with cytotoxic drugs on human tumour xenografts and metastasis of B16 melanoma **Brit J Cancer.** 88 :132–136, 2003
107. Takaku et al. Isolation of an Antitumor Compound from *Agaricus blazei* Murill and Its Mechanism of Action. **J Nut.** 131:1409-1413, 2001.
108. Talmadge et al. Murine Models to Evaluate Novel and Conventional Therapeutic Strategies for Cancer. **Am. J. Pathol.**170 (3):793-804, 2007.
109. Talmadge et al. Macrophage content of metastatic and non-metastatic rodent neoplasms. **J. Immunol.** 126, 2245-2248, 1981.
110. Teixeira et al. Angiogenesis and Inflammation in Skeletal Muscle in Response to Ascites Tumor in Mice. **Life Sci.** 78: 1637-1645, 2006.
111. Teixeira et al. The Proteolytic Activities in Latex from *Carica candamarcensis*. **Plant Physiol. Bioch.** 46, 956-961, 2008.
112. Thomas & Zalcborg, 5-fluorouracil: a pharmacological paradigm in the use of cytotoxics **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 25(11):887-895, 1998.
113. Tysnes et al. Bromelain reversibly inhibits invasive properties of glioma cells. **Neoplasia.** 3(6): 469-479, 2001.
114. Viana et al. Estudo da atividade e possível mecanismo de ação antitumoral da fração proteolítica do látex de *Carica candamarcensis* Hook F. 1875 sobre o modelo de carcinoma de Ehrlich. **40º Cong Bras Farm Ter Exp.**09.024, 2008.
115. Vieira et al. *Indigofera suffruticosa*: An Alternative Anticancer Therapy. **Ann Oncol** 4 (3):355-359, 2007.
116. Wainstein & Belfort. Management of Cutaneous Melanoma. **Rev. Col. Bras. Cir.** 31(3): 204-214, 2004.

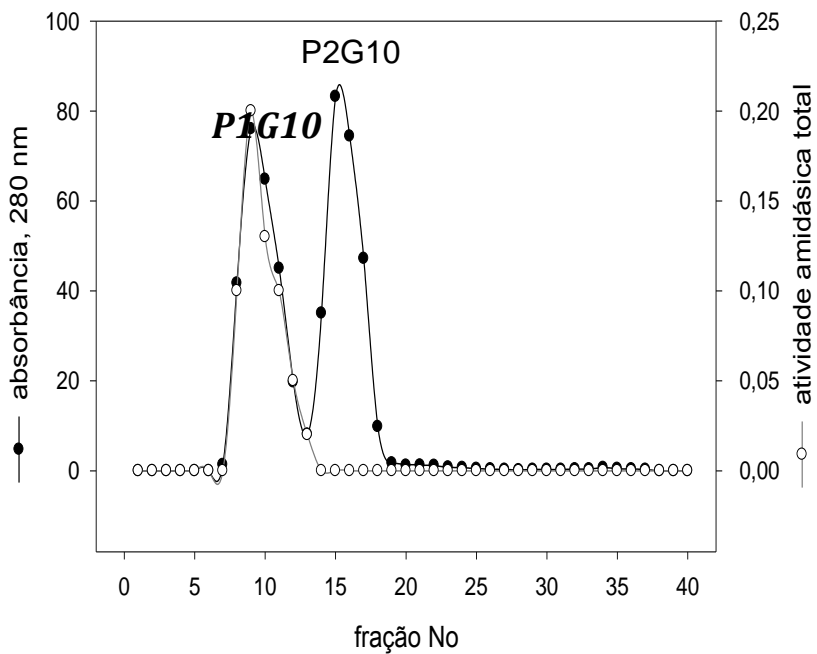
117. Wald et al. Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends survival time of C57Bl6 mice with syngeneic melanoma B16. **Cancer Chemother Pharmacol.** 47: S16-22, 2001.
118. Wald et al. Proteinases Reduces Metastatic Dissemination and Increase Survival Time in C57Bl6 Mice with the Lewis Lung Carcinoma. **Pharm. Let.** 63(17), 237-243, 1998.
119. Waters, W.F. Globalization, socioeconomic restructuring, and community health. **J Com Health.** 26 (2):79-92, 2001.
120. Wetzels et al. Basal cell-specific and hyperproliferation-related keratins in human breast cancer. **Am J Pathol** 138:751–763, 1991
121. Wogan et al. Environmental and chemical carcinogenesis. **Sem Can Biol.** 14 (6): 473- 486, 2004.
122. Zetter,B. Angiogenesis and tumor metastasis. **Annu Rev Med.** 49: 407-424,1998.
123. Zieho et al. Hypoxia- Inducible Factor (HIF)-1 Regulatory Pathway and its Potential for Therapeutic Intervention in Malignancy and Ischemia. **Yale J. Biol. Med.** 80: 51-60, 2007
124. Zuberek et al. Comparable In Vivo of Efficacy of CD28/B7, ICOS/GL50 and ICOS/GL50B Coestimulatory pathways in Murine Tumor Models: IFN gamma-dependent enhancement of CTL Priming, Effector Functions and Tumor Specific Memory CTL. **Cell Immunol.** 225(1):53-63, 2003.

**ANEXO 1:**



**Carica candamarcensis (A) Inflourescências; (B) Folhas (C) Fruto maduro (D) Frutos imaturos** *In: Ecocrop e Flickr*

## ANEXO 2:



Nota: Perfil cromatográfico do látex na coluna “Sephadex G-10”. “P1G10” e “P2G10” marcam os picos eluídos desta cromatografia. *In*: Gomes et al, 2005.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- CETEA -

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 103/2007**, relativo ao projeto intitulado "**Caracterização de atividades antiinflamatória e antitumoral/antimetastática de proteases de caricaceae**", que tem como responsável **Carlos Edmundo Salas Bravo**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **22/ 08/2007**.

Este certificado expira-se em **22/ 08 / 2012**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol nº 103/2007**, related to the project entitled "**Antiinflammatory and antitumoral/antimetastatic activities of caricaceae proteinases**", under the supervision of **Carlos Edmundo Salas Bravo**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 22, 2007**.

This certificate expires in **August 22, 2012**.

Belo Horizonte, 26 de Setembro de 2007.

**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
**Coordenador do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)





# 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](#)