

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA**



**EFEITO ANTITUMORAL DO IXOLARIS,  
UM POTENTE INIBIDOR DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA,  
SOBRE O MELANOMA MURINO B16F10**

**Andreia da Silva de Oliveira**

**Rio de Janeiro**

**2010**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA**

**EFEITO ANTITUMORAL DO IXOLARIS, UM POTENTE INIBIDOR  
DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA, EM MELANOMA MURINO**

Andreia da Silva de Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica (IBqM), Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Química Biológica).

Orientador: Robson de Queiroz Monteiro

Rio de Janeiro

Abril, 2010

## FICHA CATALOGRÁFICA

Da Silva de Oliveira, A.

Efeito antitumoral do ixolaris, um potente inibidor da coagulação sanguínea, em melanoma murino B16F10. / Andreia da Silva de Oliveira – 2010.  
xv, 71p.: il.

Dissertação (Mestrado em Química Biológica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, 2010.

Orientador: Robson de Queiroz Monteiro

1. Melanoma. 2. Fator Tecidual. 3. Coagulação I. Monteiro, RQ. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica. III. Efeito antitumoral do ixolaris, um potente inibidor da coagulação sanguínea, em melanoma murino B16F10.

**Andreia da Silva de Oliveira**

**EFEITO ANTITUMORAL DO IXOLARIS, UM POTENTE INIBIDOR DA  
COAGULAÇÃO SANGUÍNEA, EM MELANOMA MURINO B16F10.**

Rio de Janeiro, 16 de Abril de 2010.

---

Prof. Dr. Robson Queiroz Monteiro, UFRJ

---

Prof. Dr. Roger Chammas, USP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Farias Benjamim, UFRJ

---

Prof. Dr. Marcos Sorgine, UFRJ

---

Prof. Dr. Mauro Sérgio Gonçalves Pavão, UFRJ

---

Dr. Ernesto de Méis, INCA

Rio de Janeiro  
2010

*Quando a gente acha que tem todas  
as respostas, vem a vida e muda  
todas as perguntas...*

*Luis Fernando Verissimo*

*A minha mãe, pelo apoio irrestrito, mas, sobretudo, o seu amor, e ao meu ESPOSO e AMIGO pelo amor incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho deve muito a algumas pessoas, por diferentes razões, e eu gostaria de aproveitar este espaço para agradecer especialmente a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação profissional, assim como para o meu crescimento pessoal.

Agradeço a princípio a Deus, que me permitiu a inteligência e que me usou como instrumento para o desenvolvimento da ciência. Todos os dias, eu sinto Ele presente em minha vida, me iluminando e me fortalecendo. Acredito que Ele direciona os esforçados e por isso torce pelas minhas vitórias. Não poderia deixar de lembrar a Santíssima Virgem Maria, exemplo de vida e humildade.

Agradeço enormemente à minha mãe, por sempre me incentivar e estar sempre por perto quando preciso de apoio. Se eu cheguei até aqui, certamente devo essa conquista a ela. Obrigada mãe por me amar tanto. Palavras não faltam para dizer à importância que você tem na minha vida. E como laço fraterno, agradeço ao meu irmão Antonio Rafael, que timidamente torce por mim. Vocês são a minha pedra fundamental!

Ao meu amado esposo, Robson, o maior colaborador em todos os sentidos. Agradeço aos momentos compartilhados e por hoje ser o amor da minha vida. Por toda a ansiedade e estresse suportados, por sempre entender as minhas dúvidas, me ajudar e me apoiar nos momentos difíceis. Obrigada por me fazer feliz!

Aos meus queridos tios e primos e a minha vovó Francisca que mesmo de longe, sempre torceram e acreditaram em mim.



Ao meu orientador, Robson, por todo o suporte nos momentos solicitados. Por acreditar em mim, sempre me dizendo que eu iria conseguir, mesmo quando as coisas davam erradas, e pelo incentivo em não desistir e continuar.

Ao grupo do Laboratório de Hemostase e Venenos. Pela ajuda constante e troca de idéias. O meu enorme agradecimento, em especial à Andréa e à Luize - eu tenho total admiração pela dedicação e generosidade de vocês... Agradeço ainda à Angélica, Daniela, Camilla e Fabiana pelos ótimos momentos de amizade. Todas vocês foram fundamentais para o término deste trabalho.

A Professora Sandra Konig, colaboradora constante em nosso laboratório, cheia de idéias motivadoras e não é só francesa, mas uma torcedora incansável do tricolor fluminense.

Não poderia deixar de lembrar dessas jóias....amigas não só de laboratório...mas da vida toda. Jú e do tão esperado Davi, Fê, Nath, Cla e Alê. Agradeço pelas idéias notáveis e paciência em me ensinar; pelas caronas divertidíssimas e emocionantes e por ser um ser uma pessoa iluminada e agora cheia de pensamentos filosóficos; pelas várias dicas Rio Show e divertidas histórias; pelas conversas que me ajudaram a tomar decisões importantes durante a minha vida e por todos os momentos felizes registrados em foto e pelas dicas da maquiagem *nude*, muito bem utilizadas. Pelas nossas saidinhas... que agora andam meio escassas...mas mesmo assim...Amo vocês!

A Analurdes e Paradinha, Fernanda e Walter, Fabiana e Pedro, Camila e Chico, Roberta, Roban e Billy, Aurélia e Reginaldo, por me proporcionarem momentos descontraídos e inesquecíveis, quando eu estava tensa e cheia de artigo pra ler. Seja em Laranjeiras, Niterói, Petrópolis, Tijuca, Campo Grande, Itaguaí, estaremos juntos pra sempre.

A minha amiga Alyni, que sempre me apoiou e tem sempre algo bom pra dizer, mesmo nos momentos difíceis...e é claro a sua família linda...Jullyo, a dinda Te Ama!!!

Às várias colaborações que fiz, e que hoje se tornaram amizades sólidas. A futura Doutora, Nívea Amoedo, que me ajuda a entender a Biologia Molecular com um olhar mais crítico e atencioso, mas principalmente me ensinou que não faz mal nenhum, às vezes dizer “Não!”. E claro, não poderia esquecer da tímida Mariana...que me faz lembrar dos tempos que eu era aluna da Nívea.

Ao Doutorando Daniel Escorssim e as alunas Jorgeane e Renatado Laboratório do Prof. Luiz Eurico que pacientemente me ajudaram na elaboração dos ensaios de imunohistoquímica.

Ao Sr. Emílio e ao André que sempre estavam disponíveis em me ajudar nos experimentos com animais.

Aproveito para citar alguns amigos que conquistei nesta jornada, Roberta, que, quando não perde o ônibus, me faz uma belíssima companhia. Pelos momentos vividos na sala de cultura com a Angelita, com seu jeitinho desligado, hoje faz parte da minha convivência. A Paula Pezzuto que me diverte com seus vários amuletos da sorte.

Quero agradecer ainda ao Instituto de Bioquímica Médica, pelas oportunidades e principalmente à Prof<sup>a</sup>. Vivian Rumjanek, pelo conhecimento transmitido e por me encaminhar na vida científica.

A todos agradeço profundamente, e dedico o resultado deste trabalho.

## RESUMO

Melanoma é um tipo de câncer altamente metastático e evidências indicam que seu comportamento pró-coagulante contribua para essa característica. Neste contexto, espera-se que anticoagulantes possam atenuar a progressão tumoral. Neste estudo, avaliamos o efeito do Ixolaris, um inibidor exógeno da coagulação sanguínea, em um modelo de melanoma murino, utilizando células B16F10. A expressão de Fator Tecidual (TF), proteína que inicia a coagulação sanguínea, nas células B16F10 foi demonstrada por citometria de fluxo e RT-PCR. A atividade do TF nas células tumorais foi avaliada pela ativação do fator X em presença do fator VIIa. Além disso, ensaio de recalcificação do plasma foi realizado para verificar o efeito do Ixolaris sobre as células B16F10. O efeito antitumoral do Ixolaris no crescimento primário ou metástase foi avaliada por injeção das células B16F10 em camundongos C57/BL6 por via subcutânea ou intravenosa, respectivamente. A expressão de VEGF e CD105 nos tumores primários foram avaliadas por imunohistoquímica. Como resultado, análises utilizando citometria e RT-PCR mostraram a expressão constitutiva de TF nas células de B16F10. Os ensaios *in vitro*, mostram que o Ixolaris bloqueia atividade de TF derivada das células murinas. A co-administração intravenosa das células B16F10 e Ixolaris (250 microgramas/kg) reduziu, dramaticamente, o número de nódulos pulmonares ( $4 \pm 1,1$  e  $47,3 \pm 10,1$  para o grupo controle), indicando uma potente ação antimetastática. No ensaio de crescimento primário, os animais foram tratados diariamente com Ixolaris (50 ou 250 microgramas/kg, i.p.) do dia 3 ao dia 18, após a inoculação das células tumorais. Uma diminuição significativa no tamanho e peso do tumor foram observadas para ambas doses de Ixolaris (28% e 58%, respectivamente), quando comparados com o controle. Análises de imunohistoquímica mostraram que a inibição do crescimento do melanoma pelo Ixolaris foi acompanhada por uma redução significativa da expressão de VEGF e da formação de novos vasos na massa tumoral. Em conjunto, nossos dados indicam que Ixolaris é um potente agente antitumoral *in vivo*, atuando nas propriedades pró-coagulantes de B16F10, resultando, dessa forma, na redução do potencial metastático e na inibição do crescimento tumoral primário e angiogênese.

## ABSTRACT

Melanoma is a highly metastatic cancer and there is strong evidence that tissue factor (TF) activity contributes to its aggressive pattern. In this context, it has been suggested that TF inhibitors may attenuate primary tumor growth and metastasis. In this study we evaluated the effect of Ixolaris, an exogenous TF inhibitor, in a murine model of melanoma employing B16F10 cells. TF expression on B16F10 cells was evaluated by flow-cytometry and RT-PCR. TF activity on tumor cells was evaluated by measuring factor X activation by FVIIa. In addition, we performed a test recalcification of plasma to determine the effect of ixolaris on B16F10 cells. The effects of Ixolaris on primary melanoma growth or metastasis were evaluated by subcutaneous or intravenous injection of B16F10 cells in C57/BL6 mice, respectively. VEGF e CD105 expression on primary tumors was evaluated by immunohistochemistry. Flow-cytometric analyses showed constitutive TF expression by B16F10 cells. In vitro, murine cell-derived TF activity was blocked equally well by Ixolaris. Intravenous co-inoculation of B16F10 cells and Ixolaris (250 micrograms/kg) dramatically decreased the number of pulmonary tumor nodules ( $4 \pm 1.12$  vs  $47.38 \pm 10.08$  in the control group). Further primary growth assays were performed and animals were treated daily with Ixolaris (50 or 250 micrograms/kg, i.p.) from day 3 to 18 after s.c. inoculation of tumor cells. A significant decrease in tumor size and weight was observed for both Ixolaris doses (28% and 58% respectively) as compared to non-treated animals. In this regard, immunohistochemistry analyses showed that inhibition of melanoma growth by Ixolaris is accompanied by a significant down regulation of VEGF and angiogenesis in the tumor mass. Our data demonstrate that Ixolaris targets B16F10-derived TF resulting in decreased metastatic potential and reduced primary tumor growth and angiogenesis.

## Lista de figuras

<b>Figura nº</b>		<b>Página</b>
1	Progressão do melanoma maligno	03
2	O Fator Tecidual é o iniciador da cascata de coagulação	08
3	Sinalização de TF-FVIIa-PAR2 em célula tumoral	14
4	Fator Tecidual (TF) contribui para o crescimento tumoral, angiogênese, metástase e trombose em pacientes com câncer	15
5	Estrutura do TFPI	18
6	Estrutura do Ixolaris e seu mecanismo	20
7	Mecanismo de ação do Ixolaris	21
8	Ensaio experimental do modelo metastático	29
9	Ensaio experimental do modelo primário	30
10a	Citometria. Expressão de TF em células B16F10	34
10b	Citometria. Expressão de TF em células Melan-A	34
11	RT-PCR. Células B16F10 e Melan-A expressam TF	35
12	Células B16F10 aceleram a coagulação do plasma murino e o Ixolaris reverte este efeito	36
13a	Efeito Inibitório do Ixolaris na ativação do FX pelas células B16F10	37
13b	Esquema da formação do complexo tenase extrínseco	36
14a	Ensaio metástase	37
14b	Gráfico do Ensaio de metástase	37
15a	Crescimento tumoral primário (cm)	38
15b	Peso dos tumores no dia 18	38
16a	Tratamento com Ixolaris regula expressão de VEGF	40
16b	Quantificação gráfica da figura 16a	40
17a	Tratamento com Ixolaris regula formação de vasos	41
17b	Quantificação gráfica da figura 17a	42
18	Contribuição do fator tecidual, proteases da coagulação e PARs na angiogênese tumoral	49

## Lista de abreviaturas

AcAP:	Peptídeo anticoagulante do <i>Ancylostoma caninum</i>
CD105:	Receptor de TGF $\beta$
CDNA:	DNA complementar
DMEM:	Meio modificado Dulbecco's
Erk1:	Proteína quinase regulada por estímulo extracelular 1
Erk2:	Proteína quinase regulada por estímulo extracelular 2
FIIa:	Fator II ativado ou trombina
FVa:	Fator V ativado
FVII:	Fator VII
FVIIa:	Fator VII ativado
FVIII:	Fator VIII
FVIIIa:	Fator VIII ativado
FIXa:	Fator IX ativado
FX:	Fator X
FXa:	Fator X ativado
FL1:	Sinal de fluorescência na cor verde
FL2:	Sinal de fluorescência na cor laranja
GPCR:	Receptor acoplado a proteína G
Hank's-EDTA:	Solução em Hank's com ácido etileno-dióxido-dietileno-tetracíclico
HCl:	Ácido clorídrico
HEPES:	Ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-etanosulfônico
i.v.	Via intravenosa
kg:	Kilograma
MEC:	Matriz extracelular
mL:	Mililitros
NaCl:	Cloreto de sódio
NAP5:	Proteína anticoagulante do <i>Ancylostoma caninum</i>
NAPc2:	Peptídeo anticoagulante de <i>Nematodeo</i>
PAR1:	Receptor ativado por protease 1
PAR2:	Receptor ativado por protease 2
PAR3:	Receptor ativado por protease 3
PAR4:	Receptor ativado por protease 4

PBS:	Solução salina tamponada
PKC	Proteína cinase C
PMA:	Éster de Forbol
PS:	Fosfatidilserina
RNA:	Ácido ribonucléico
RNAm:	Ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase seguida da transcriptase reversa
s.c.	Via subcutânea
SFB:	Soro fetal bovino
siRNA	RNA de interferência
TF:	Fator tecidual
TFPI:	Inibidor da via do fator tecidual
Tris-EDTA	Tampão Tris com ácido etileno-dióxido-dietileno-tetracíclico
Tris-HCl:	Tampão Tris com ácido clorídrico
VEGF:	Fator de crescimento endotelial vascular
µg:	Micrograma

## Sumário

1. Introdução	01
1.1. Melanoma	02
1.2. Coagulação Sanguínea e Câncer	05
1.3. O Fator Tecidual	07
1.4. Receptores Ativados por Proteases (Pars)	12
1.5 Fator Tecidual e estratégias antitumorais	16
2. Objetivos	22
2.1. Objetivo Geral	23
2.2. Objetivos Específicos	23
3. Metodologia	24
3.1. Cultura de Células	25
3.2. Expressão de Fator Tecidual	25
3.2.1. Citometria de Fluxo	25
3.2.2. Extração de RNA e reação da cadeia de polimerase	26
3.3. Expressão e Purificação do Ixolaris	27
3.4. Tempo de Recalcificação do plasma	27
3.5. Atividade de TF nas células B16F10 por Ixolaris	28
3.6. Modelo Tumoral <i>in vivo</i>	29
3.6.1. Modelo metastático	29
3.6.2. Modelo primário	29
3.6. Imunohistoquímica	31
4. Resultados	33
4.1. Células de melanoma murino expressam TF	34
4.2. Ixolaris inibe a coagulação sanguínea induzido por B16F10	35
4.3. Atividade de TF nas células B16F10 e reversão pelo Ixolaris	36
4.4. Efeito anitumoral do Ixolaris	37



4.4.1. Modelo metastático	38
4.4.2. Modelo primário	39
4.5. Ixolaris inibe a angiogênese tumoral	41
5. Discussão	43
6. Conclusão	50
7. Referências Bibliográficas	52
8. Anexo 1: Simultaneous tissue factor expression and phosphatidylserine exposure account for the highly procoagulant pattern of melanoma cell lines	62

## *1. Introdução*

## 1.1. Melanoma

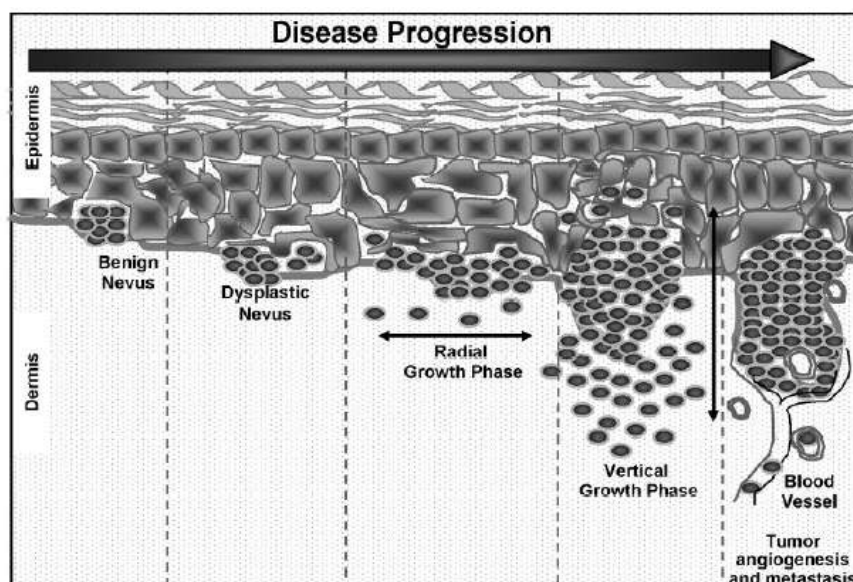
---

O melanoma é um tumor maligno originado dos melanócitos que se manifesta, principalmente, na pele. Raramente, o melanoma pode ocorrer nas conjuntivas, meninges e mucosas, sendo, normalmente, pigmentado, Entretanto, formas amelanóticas têm sido observadas. Em relação à massa tumoral, o melanoma pode, inicialmente, tender a realizar metástase e, como consequência, o prognóstico é ruim. Sabe-se que o melanoma maligno é responsável por cerca de 90% das mortes por câncer de pele (De Vries e col., 2003).

Os fatores de risco para o melanoma podem ser provenientes de histórico familiar, tumores benignos e melanoma anterior. Imunossupressão, sensibilidade ao sol, e exposição à radiação ultravioleta são fatores de risco adicionais. Cada um desses fatores de risco corresponde a uma predisposição genética ou a um estresse ambiental que contribui para a gênese do melanoma (Miller & Mihm, 2006).

O modelo proposto por Clark e colaboradores, em 1984, descreve mudanças histológicas que acompanham a progressão de melanócitos normais para melanoma maligno. Os melanócitos podem progredir através de uma série de passos em direção à transformação maligna. O modelo enfatiza as alterações histopatológicas que ocorrem na progressão do melanoma (figura 1). Os melanócitos normais desenvolvem progressivamente um fenótipo maligno através da aquisição de várias características fenotípicas, sendo que algumas características histológicas especiais caracterizam cada etapa de progressão (Miller & Mihm, 2006).

A invasão local e metástase são grandes responsáveis pela morbidade e mortalidade em pacientes com melanoma. No modelo de Clark, características invasivas aparecem na fase de crescimento vertical, quando as células de melanoma não só penetram na membrana basal, mas também crescem por via intradérmica, expandindo o nódulo. O melanoma metastático se desenvolve quando as células tumorais se dissociam da lesão primária, migram através do estroma circundante, e invadem os vasos sanguíneos e linfáticos para formar um tumor em um sítio distante. Clinicamente, a profundidade absoluta da invasão local, medida diretamente por análise histopatológica (índice de Breslow), é o critério principal do fator de prognóstico. A invasão e disseminação do melanoma estão relacionadas a alterações na adesão celular. Normalmente, a adesão celular controla a migração, organização de tecidos e organogênese celular, porém perturbações na adesão celular contribuem para invasão tumoral, interações entre o tumor e o estroma e a sinalização de células tumorais (Miller & Mihm, 2006).



**Figura 1. Progressão do melanoma maligno.** Proliferação normal dos melanócitos levando a um tumor benigno. As células adquirem a habilidade de proliferação intra-epidérmica, ganhando a habilidade de invadir a derme e formar um nódulo expansivo. A etapa final do modelo é a disseminação bem sucedida de células para outras áreas da pele e outros órgãos,

onde podem proliferar e estabelecer com êxito um foco metastático. *Adaptado de Mahabeleshwar & Byzova, 2007.*

B16-F10 é uma linhagem celular de melanoma murino que, quando injetado subcutaneamente (s.c) em camundongos C57BL6, formam, progressivamente, tumores sólidos agressivos. Este modelo tumoral tem sido usado no estudo da biologia do câncer, incluindo oncogenes e genes de supressão de tumor, interações proteína-proteína e processos complexos, como angiogênese e metástase. Adicionalmente, este modelo tem sido usado no estudo terapêutico de tumores sólidos, incluindo compostos farmacológicos (Camerer e col., 2004), imunoterapia e RNAs de interferência (Nalluri e col., 2008; Wang e col., 2004).

A composição de tumores sólidos no microambiente consiste de células tumorais, células não-tumorais, componentes da matriz extracelular (colágenos e elastina) e componentes solúveis (citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento), sendo que durante a progressão do tumor, observam-se alterações na abundância relativa destes componentes (Van Kempen e col., 2003). As células não-tumorais ou células do estroma, incluindo fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imune estão envolvidas na progressão do tumor. Observam-se três formas predominantes de interações estroma-tumor: 1) fatores solúveis extracelulares, 2) comunicação intracelular, via mensageiros secundários e transdução de sinal e, ainda, 3) comunicação intracelular via adesão célula-célula (Agnelli e col., 2006). Atualmente, existem vários alvos terapêuticos de interações estroma-tumor, incluindo moléculas de adesão, proteases, vias de sinalização e componentes da matriz extracelular (MEC) (Prandoni e col., 2002). A descoberta de novos alvos terapêuticos dos constituintes do microambiente tumoral, e não apenas as células do tumor, é uma abordagem atraente para terapêutica de tumores sólidos. No entanto, o

nível de complexidade é dramaticamente aumentado porque diferentes tipos de células estão presentes na massa tumoral, resultando em um aumento no número de proteínas que precisam ser avaliadas. Neste contexto, estudar o progresso do tumor *in vivo*, e o estudo de tecnologias como proteômica podem revelar novos alvos moleculares (Culp e col., 2006).

## 1.2.Coagulação sanguínea e câncer

Já é consenso no meio científico, que desordens sanguíneas envolvendo hiperativação do sistema de coagulação e formação de coágulos de fibrina intravasculares (trombose), podem ser a primeira manifestação de um tumor maligno (Rickles & Falanga, 2001). Em 1865, Trousseau descreveu a relação entre câncer e trombose pela primeira vez. Desde então, diversos aspectos desta interação têm sido revelados. A patogênese das desordens hemostáticas no câncer é complexa e reflete a interação de diferentes mecanismos. Entre eles estão os sistemas de coagulação e fibrinolítico, endotélio vascular, leucócitos e plaquetas. As células tumorais podem produzir fatores pró-coagulantes; portanto ativam, diretamente, a cascata de coagulação (Falanga & Rickles, 1999).

Desta forma, duas questões merecem atenção dos biólogos tumorais:

- 1) qual seria a ligação entre o câncer e a ativação da coagulação sanguínea?
- 2) A atividade pró-coagulante dos tumores é uma mera coincidência ou seria uma consequência do crescimento tumoral? A resposta da última questão foi proposta, no ano de 1800, pelo patologista Theodor Billroth que encontrou células tumorais incorporadas à microtrombos na circulação e, dessa forma,

levantou a hipótese de que estes coágulos pudessem navegar através da circulação sanguínea, favorecendo metástases. Se os tumores utilizam a coagulação sanguínea em seu benefício, a busca de moléculas responsáveis pela trombose, e associadas ao câncer, poderia revelar novos alvos que atingissem tanto a trombose, quanto o câncer. Mas, então, como as células tumorais iniciam a coagulação sanguínea? Até agora, as explicações incluem a expressão inadequada de fatores diretamente envolvidos na coagulação sanguínea, ou moléculas que induzem agregação plaquetária, ou citocinas que podem modular o endotélio e processos inflamatórios (De Cicco, 2004 e Levine e col., 2003). Entre os eventos melhor documentados está a expressão de Fator Tecidual (TF) na superfície de células tumorais. TF é, normalmente, expresso por células endoteliais em resposta a uma injúria severa, iniciando e ativando a cascata de coagulação sanguínea e, por fim, formando um coágulo induzido por trombina. Esta, por sua vez, catalisa a conversão de fibrinogênio circulante em fibrina insolúvel. A fibrina é, ainda, modificada por outras enzimas para formar um gel como matriz provisória que oclui os vasos e as rupturas teciduais, fornecendo suporte para a primeira regeneração tecidual (Mann, 1999).

O TF é uma proteína ligada à membrana, e, assim, sua expressão aumentada em células tumorais pode explicar a ativação da coagulação sanguínea ao redor do tumor, sugerindo que o tumor também exerça um efeito sistêmico pró-coagulante. Interessantemente, o TF também pode ser liberado no sangue, principalmente em associação com micropartículas de membrana, a partir de superfícies de células neoplásicas ou de células do microambiente tumoral (Yu e col., 2004).

### 1.3. O Fator Tecidual

---

O Fator Tecidual (TF), também conhecido como fator III da coagulação, tromboplastina ou CD142, é uma glicoproteína transmembranar de 47 kDa, que atua como iniciador da coagulação sanguínea. A expressão de TF nos vasos sanguíneos é usualmente restrita às células da camada do subendotélio. As células endoteliais habitualmente não expressam TF, embora outros tipos celulares no interior dos vasos, incluindo os fibroblastos e as células do músculo liso o façam, constitutivamente, em níveis moderados (Milsom & Rak, 2007)

A exposição de TF à corrente sanguínea ocorre em condições específicas, principalmente em circunstâncias patológicas, como em um dano vascular, defeitos estruturais na parede dos vasos, estimulação angiogênica, entrada para corrente sanguínea de células que expressam TF (células inflamatórias, células tumorais) (Fernandez & Rickles, 2002) e micropartículas de membrana que expressam TF (Giesen e col., 1999). Uma vez exposto ao sangue (figura 2), o TF atua como receptor para o Fator



**VIIa (FVIIa) da coagulação, desencadeando uma seqüência de ativações proteolíticas, incluindo a clivagem do Fator X (FX), em FXa, protrombina (FII) em trombina (FIIa) e a conversão de fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel. Além da deposição de fibrina necessária para a coagulação do sangue, a formação de trombina também direciona a ativação plaquetária e a formação de FXIa e FIXa, gerando um 'feedback' positivo que amplifica a produção de trombina (Mann, 1999; Bluff e col, 2008)**

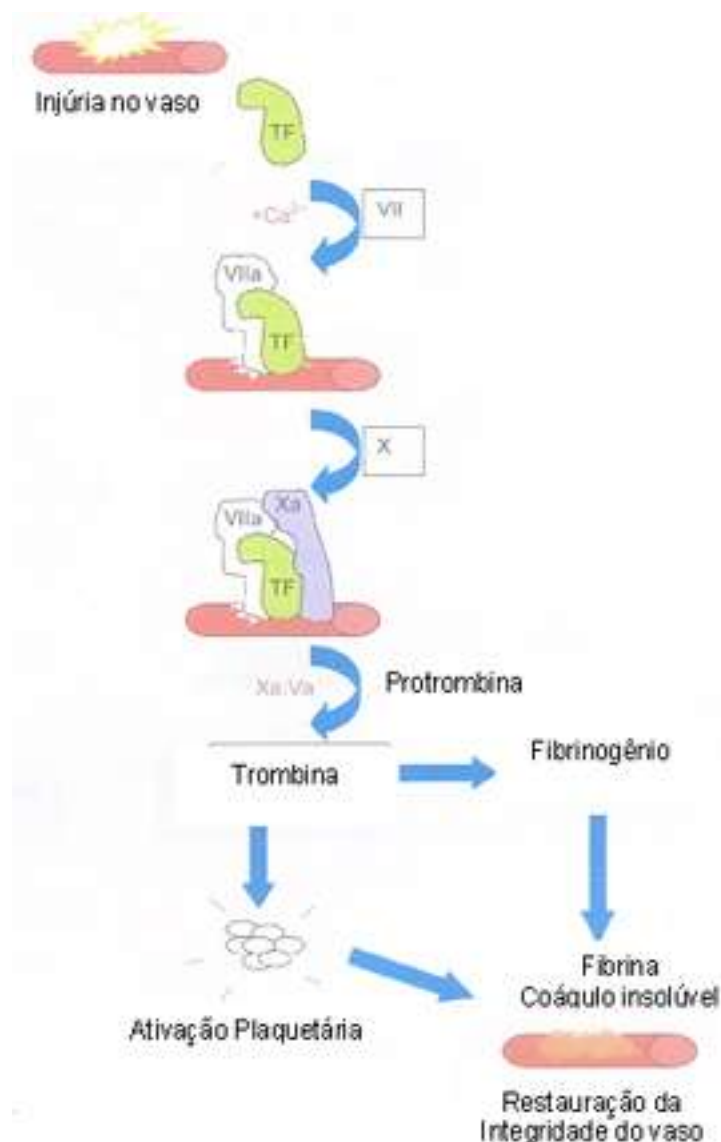


Figura 2. O Fator Tecidual é o iniciador da cascata de coagulação. **Em condições fisiológicas normais, após um dano no vaso, o TF forma um complexo com o FVIIa na presença de íons cálcio em uma membrana fosfolipídica, ativando a atividade enzimática desta protease para catalisar a ativação do FX em FXa. A geração de FXa pelo complexo TF-FVIIa, direciona a conversão proteolítica de protrombina em trombina. Esta etapa chave na cascata de coagulação é efetuada pela atividade catalítica do complexo protrombinase que consiste no FXa e no cofator ativado FVa. Este resultado da atividade da trombina ativa as plaquetas e catalisa a conversão de fibrinogênio circulante em um**

**coágulo de fibrina insolúvel, restaurando a integridade do vaso. Retirado de Bluff e col., 2008.**

Além de seu papel na coagulação, o complexo TF/FVIIa, FXa e trombina são também capazes de modular a sinalização intracelular. Estes eventos celulares são mediados por uma classe de receptores acoplados à proteína G (GPCR) conhecida como PARs, Receptores Ativados por Proteases (do inglês: *Protease Activated Receptors*). Os receptores PARs, com quatro membros até agora descritos, ao contrário de outros GPCRs, são ativados através de clivagem proteolítica do domínio extracelular N-terminal, resultando no surgimento de um novo N-terminal que atua como ligante na mesma molécula de PAR (Coughlin, 2000). A ação direta do complexo TF/FVIIa pode, predominantemente, ativar PAR-2, entretanto a trombina é capaz de ativar PAR-1, assim como PAR-3 e PAR-4, mas não PAR-2 (Ruf, 2003). As células tumorais e as do endotélio podem expressar PAR-1 e PAR-2 e sua exposição à TF/FVIIa, FXa e trombina pode suscitar uma infinidade de respostas mediadas por proteína G (Coughlin, 2000 e Nierodzik e Karpatkin, 2006). Entre estas, as mais relevantes para a sobrevivência das células tumorais são; migração, remodelamento vascular e

angiogênese (Abe e col.,1999 e Bromberg & Cappello, 1999).

Estudos em camundongos deficientes em TF mostram que esta proteína é essencial para o desenvolvimento embrionário normal, visto que embriões deficientes em TF morrem no meio da gestação devido a defeitos complexos em sua vasculatura (Carmeliet e col., 1996). Em adultos, o TF exibe uma distribuição tecidual heterogênea, com altos níveis de expressão no epitélio, coração, cérebro, pulmão e placenta, e baixos níveis no baço, timo, músculo esquelético e fígado (Mackman, e col.,1993). Assim, o TF está não somente envolvido no processo normal da hemostasia, manutenção da integridade vascular e desenvolvimento vascular, mas também em diversas condições patológicas como trombose, inflamação, angiogênese e câncer (Francischetti e col., 2008; Rickles, 2006).

O TF é expresso em muitos tipos de cânceres e níveis plasmáticos aumentados de TF são comumente detectados em pacientes com câncer avançado (Rauch e col., 2005). Realmente, células tumorais podem expressar níveis de TF

mais de 1000 vezes acima do detectado em uma célula normal correspondente. Desde o trabalho de Judah Folkman, é amplamente aceito que a angiogênese é essencial para o crescimento tumoral e tumores não podem crescer mais de 2 mm<sup>3</sup> sem que se desenvolva uma nova vasculatura (Folkman, 1990). Estudos recentes sugerem que o TF exerce um importante papel na angiogênese tumoral (Rak e col., 2006). Por exemplo, no câncer colo-retal humano, os níveis de expressão de TF estão correlacionados com uma menor sobrevida dos pacientes, ocorrência de metástases no fígado e nos órgãos linfáticos, alta densidade microvascular e/ou expressão elevada de fatores de crescimento angiogênicos, como VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) (Nakasaki e col., 2002; Seto e col., 2000). Essa associação é reforçada por Zhang e colaboradores em 1994, onde experimentalmente observaram que o TF é importante para o crescimento primário tumoral e que esta proteína controla o balanço angiogênico. No entanto a correlação entre expressão de TF e agressividade tumoral não é reconhecidamente

observada em todos os tipos de tumores experimentais. Palumbo e colaboradores em 2007 não observaram mudança no perfil de crescimento primário ou angiogênese em linhagens de fibrosarcoma murino com expressão constitutiva ou ausência de TF.

Acredita-se que a indução da angiogênese tumoral dependente da coagulação sanguínea é, primeiramente, mediada pela geração de trombina, induzida por TF, e, subseqüentemente, pela deposição de fibrina que provê uma matriz pró-angiogênica provisória, facilitando a formação de vasos sanguíneos (Rak e col., 2006). A angiogênese também parece depender de uma via independente da coagulação sanguínea, na qual o complexo TF-FVIIa atuam em receptores presentes nas células tumorais (Schaffner & Ruf, 2009).

Vários estudos têm demonstrado que o TF presente na célula tumoral possui um papel importante na metástase. Amirkhosravi e col., em 2002, utilizaram um modelo de metástase pulmonar em camundongos, onde a inibição de TF por uma variedade de agentes, como anticorpos anti-TF e Inibidores da Via do Fator Tecidual

**(TFPI), reduziram a metástase tumoral. Postula-se que o TF expresso pelas células tumorais pode levar à metástase induzindo o revestimento de células tumorais com fibrina, auxiliando estas na evasão ao ataque das células imunes, principalmente do tipo natural-killer (Palumbo e col., 2007). A trombina gerada pela ação pró-coagulante das células tumorais também pode ativar as plaquetas, promovendo a formação de trombos na microvasculatura (Camerer e col. 2004; Palumbo e col., 2000). Adicionalmente, acredita-se que a formação de trombos na microvasculatura facilita a ativação do endotélio, induzindo a expressão de moléculas de adesão que facilitam a migração das células tumorais para o espaço extravascular (Kasthuri e col., 2009).**



#### 1.4. Receptores ativados por proteases (PARs)

---

Os PARs são receptores do tipo transmembrana que pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), a maior família de receptores presentes no genoma dos mamíferos. Quatro diferentes tipos de PARs já foram descritos até o momento: PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4. A trombina é capaz de ativar PAR-1, -3 e -4. FXa ativa PAR-1 e -2, e o FVIIa é capaz de ativar somente PAR-2 (Coughlin, 2000). A ativação transmembrana de PAR é única e requer a quebra proteolítica ao invés de interação com um ligante. A remoção da região N-terminal extracelular expõe um novo N-terminal que interage com uma alça extracelular do receptor, induzindo a sinalização via proteína G. Por sua vez, a ativação da proteína G contribui com uma rede de vias de sinalização, disparando uma série de eventos celulares, como reorganização do citoesqueleto, migração celular, modulação de sobrevivência celular, entre outros efeitos (Macfarlane e col., 2001).

Respostas celulares induzidas pela ativação de PAR sugerem que estes receptores desempenhem um papel importante na proliferação, sobrevivência e/ou transformação maligna das células tumorais. Além disso, a expressão de PAR no microambiente tumoral (células endoteliais, fibroblastos e plaquetas) pode auxiliar a angiogênese e metástase (Borensztajn & Spek, 2008).

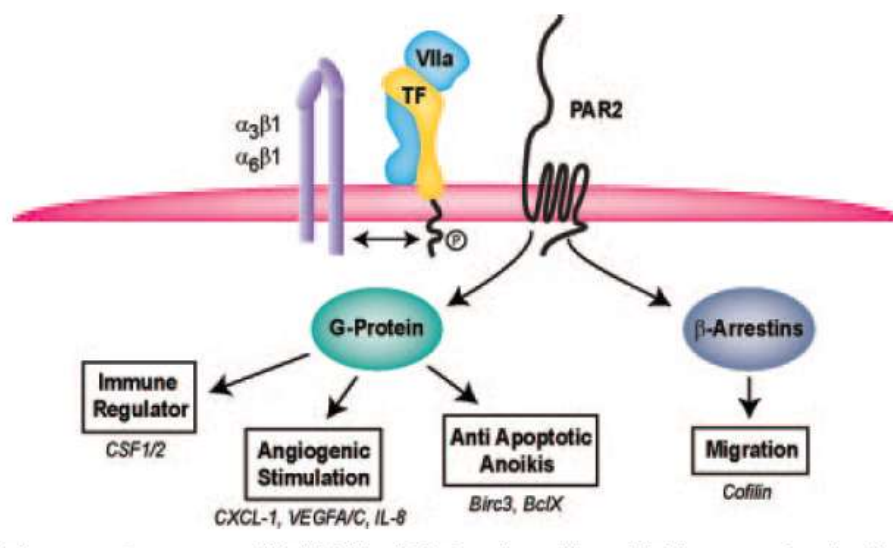
A associação entre a expressão de PAR-1 e a malignidade é demonstrada em diversos tipos de cânceres. A superexpressão de PAR-1 é observada em pacientes com melanoma (Tellez e Bar-Eli, 2003), câncer de mama (Even-Ram e col., 1998), câncer de próstata (Cooper e col., 2003), carcinoma endometrial (Granovsky-Grisaru e col., 2006), câncer de pâncreas (Rudroff e col., 2002) e câncer de ovário (Grisaru-Granovsky e col., 2005). A

expressão de PAR-1 não é a única correlacionada com a malignidade. Recentemente, PAR-2 foi reconhecido como fator de prognóstico, sendo os níveis de PAR-2 associados com a baixa sobrevivência em pacientes com câncer gástrico (Fujimoto e col., 2006). Em conformidade, PAR-2 é expresso em câncer de próstata (Shibata e col., 2004), melanoma (Massi e col., 2005) e câncer de ovário (Jahan e col., 2007). A expressão de PAR-3 tem sido descrito em cultura de células primárias de carcinoma (Kaufmann e col., 2002). Finalmente, PAR-4 é superexpresso, juntamente com PAR-1 e PAR-2, em câncer de próstata (Black e col., 2007). No entanto, o papel de PAR-3 e PAR-4 na biologia tumoral ainda é muito pouco entendido.

Diversos estudos mostram que o receptor PAR-1 possui um papel pró-angiogênico. A sinalização de PAR-1 estimula o crescimento tumoral, angiogênese e a produção de VEGF em vários modelos tumorais, incluindo melanoma e câncer de próstata (Huang e col., 2001; Yin e col., 2003). Além disso, agonistas sintéticos de PAR-1 mimetizam a angiogênese induzida por trombina (Sarker e col., 2005), enquanto antagonistas deste receptor bloqueiam o crescimento tumoral (Boire e col., 2005) e a angiogênese (Zania e col., 2006). Em conjunto, estes estudos indicam que a trombina exerce um efeito angiogênico através da ativação de PAR-1. Finalmente, o silenciamento da expressão de PAR-1 leva à regressão dos vasos em um modelo murino de câncer de próstata (Salah e col., 2007).

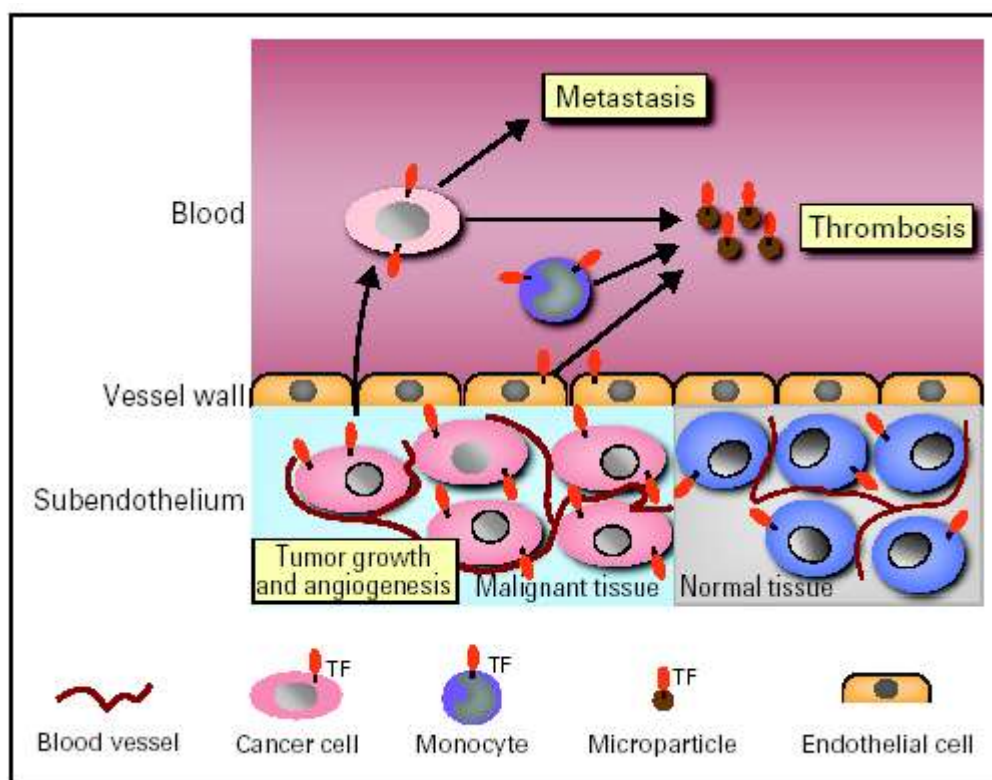
A importância do PAR-2 para o crescimento tumoral e metástase tem sido apontada como tão importante quanto o PAR-1 (figura 3). Em células de melanoma, PAR-1 e PAR-2, possuem um efeito cooperativo importante na promoção da progressão tumoral (Schaffner & Ruf, 2009). Além disso, a ativação de PAR-2 dependente de TF também contribui para metástase

experimental em modelo murino (Shi e col., 2004) e o bloqueio de PAR-2 atenua o crescimento tumoral de câncer de mama (Versteeg e col., 2008). A ativação de PAR-2 também parece ser importante para a angiogênese tumoral. A expressão de PAR2 está correlacionada com a progressão tumoral em câncer endometrial (Jahan e col., 2007) e com células tumorais que produzem VEGF depois da ativação de PAR-2 (Liu & Mueller, 2006). Estudos recentes mostram que agonistas de PAR-2 induzem a proliferação de diferentes linhagens de câncer de pâncreas, enquanto o bloqueio de PAR-2 por anticorpos específicos ou por tratamento com RNA de interferência (siRNA) suprime a proliferação (Iwaki e col., 2008). Assim como mostrado para PAR-1, as vias de sinalização que promovem os efeitos pró-tumorais dependentes de PAR-2 não estão completamente elucidadas, mas parecem envolver a via da ERK1/2.



**Figura 3. Sinalização de TF-FVIIa-PAR2 em célula tumoral.** TF-FVIIa-PAR2 através da proteína G regulam eventos celulares, como migração celular e metástase. Adaptado de Schaffner & Ruf, 2009.

Como revisado por Kasthuri em 2009 (figura 4), a ativação da coagulação dependente de TF tem sido associada à metástase e à trombose. Além de sua atividade pró-coagulante, TF possui propriedades de sinalização celular. A formação do complexo TF-FVIIa na superfície de células tumorais leva à clivagem e ativação do receptor PAR-2. A via de sinalização de TF-FVIIa-PAR-2 aparece por promover o crescimento tumoral e a angiogênese tumoral. Assim, existem provas crescentes de que o mecanismo de coagulação do sangue pode fornecer um alvo terapêutico efetivo contra o câncer.



**Figura 4: Fator Tecidual (TF) contribui para o crescimento tumoral, angiogênese, metástase e trombose em pacientes com câncer.** A expressão de TF pelas células tumorais pode aumentar o tamanho dos tumores, aumentando a sobrevivência das células e promovendo a angiogênese. A expressão de TF pelas células tumorais na corrente sanguínea pode proporcionar metástases pela ativação da coagulação e plaquetas. A liberação de micropartículas positivas para TF pelas células tumorais e normais na corrente sanguínea podem levar ao tromboembolismo venoso. Retirado de *Kasthuri e col., 2009*.

### 1.5. Fator Tecidual e estratégias antitumorais \_\_\_\_\_

O envolvimento de proteínas da coagulação sanguínea na biologia tumoral tem servido como base para propor a utilização de moléculas anti-hemostáticas, em particular os anticoagulantes, como possíveis agentes terapêuticos para auxiliar o tratamento do câncer, reduzindo o seu potencial agressivo e metastático (Ornstein & Zacharski, 2001).

O acesso dos tumores à vasculatura do hospedeiro não é somente essencial para a progressão tumoral, mas também é importante para a distribuição sistêmica de agentes anticâncer (Folkman, 2003). Uma classe de medicamentos vasculares, como heparina de baixo peso molecular e outros anticoagulantes, tem, recentemente, demonstrado exercer um efeito anticâncer além de seu papel na trombofilaxia (Kakkar e col., 2004). Esses estudos ilustram a importância da interface tumor-vasculatura na patogênese, progressão e tratamento de malignidade humana.

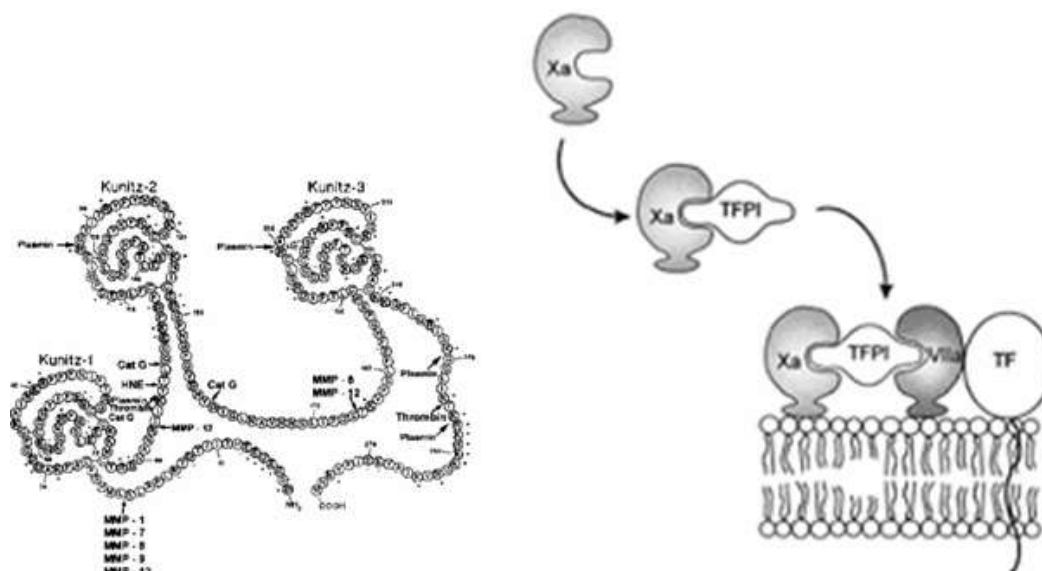
O primeiro relato na literatura sobre o efeito de um anticoagulante de origem exógena na biologia tumoral foi feito por Esumi e colaboradores, em 1991. Neste estudo demonstrou-se que a hirudina, um inibidor específico de trombina isolado da sanguessuga *Hirudo medicinalis*, reduz significativamente a ocorrência de metástases em modelo animal experimental. Inibidores do Fator Xa, entre eles o NAP5 (*Nemantode anticoagulant protein 5*), e o AcAP (*Ancylostoma Caninum anticoagulant peptide*) (Donnelly e col., 1998; Hembrough e col., 2003; Rossi e col., 2006), também inibem, eficazmente, a metástase *in vivo* (Rossi e col., 2006). Outros estudos, utilizando heparinas de baixo peso molecular também demonstraram, em modelo animal, redução significativa no número de metástases (Amirkhosravi e col., 2002; Bobek e

Kovarik, 2004). De fato, a relação entre a ativação da coagulação sanguínea e a disseminação tumoral na corrente circulatória é bem estabelecida (Mueller e col., 1992; Im e col., 2004).

Estudos mais recentes demonstraram que a inibição do TF em células neoplásicas reduz, não somente a disseminação dos tumores, mas também o crescimento primário em modelos experimentais *in vivo*. Tais estudos foram conduzidos utilizando-se o Inibidor da via do Fator Tecidual (TFPI) (Amirkhosravi e col., 2002) e o seu análogo exógeno, o NAPc2 (*Nematode Anticoagulant Peptide C2*) (Hembrough e col., 2003).

O TFPI é um inibidor fisiológico da coagulação sanguínea que apresenta a capacidade de se ligar ao Fator Xa e ao complexo TF/Fator VIIa (figura 5), formando um complexo quaternário e inibindo, assim, a atividade proteolítica desse complexo e, conseqüentemente, o início da cascata de coagulação. Estudos recentes demonstraram que o TFPI apresenta uma potente atividade antitumoral, promovendo a diminuição do crescimento primário do tumor, quando células de melanoma são inoculadas em camundongos (Hembrough e col., 2003). Além disso, o TFPI promove a redução da metástase, quando as células de melanoma são injetadas, por via intravenosa, em camundongos (Amirkhosravi e col., 2002; Hembrough e col., 2003).

O NAPc2 também apresenta a capacidade de inibir o crescimento tumoral, o desenvolvimento de metástases e a angiogênese promovida por células de melanoma (Hembrough e col., 2003).



**Figura 5: Estrutura do TFPI e sua estrutura.** Retirado de Broze, 1995.

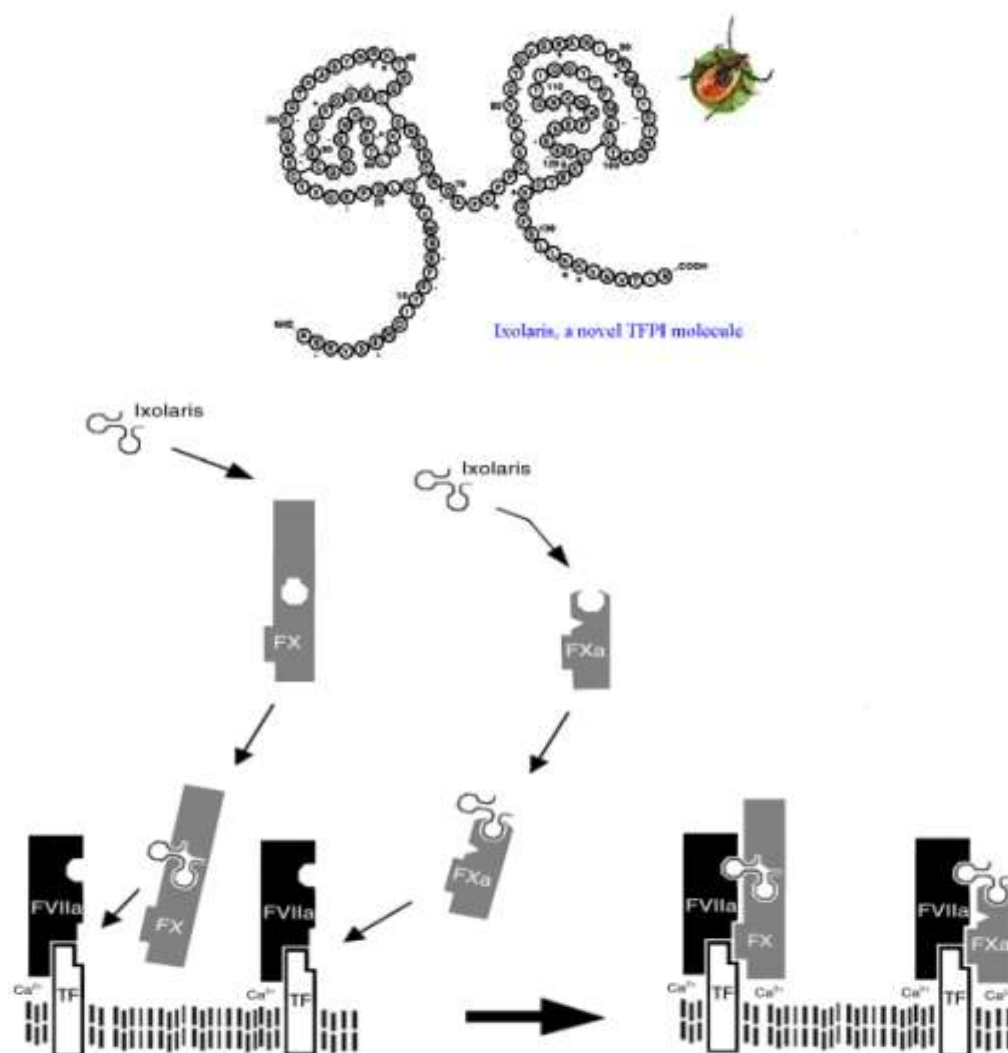
De fato, o efeito antitumoral destas moléculas parece ocorrer através de dois mecanismos: um mecanismo no qual a atividade anticoagulante inibiria a formação e/ou atividade de enzimas da coagulação sanguínea e, conseqüentemente, a formação de fibrina e uma via indireta na qual a inibição formação e/ou atividade de enzimas da coagulação sanguínea reduziria a ativação de receptores do tipo PAR.

Em 2002, Francischetti e colaboradores descreveram a expressão e a caracterização, por técnicas de biologia molecular, de um novo análogo do TFPI, denominado Ixolaris, obtido do carrapato *Ixodes scapularis*. Ensaio funcionais revelaram que o seu mecanismo de ação é muito similar ao do TFPI: o Ixolaris se liga ao FXa e, posteriormente, forma um complexo quaternário com o TF e FVIIa, resultando na inativação do complexo tenase extrínseco (Francischetti e col., 2002), como mostra a figura 6. Porém, diferentemente do TFPI, o Ixolaris não inibe o sítio catalítico do FXa. De fato, estudos posteriores

demonstraram que o Ixolaris interage com uma região do FXa denominada “exosítio de ligação à heparina” (Monteiro e col., 2005). O exosítio de ligação à heparina do FXa é uma região formada por sete resíduos carregados positivamente (Rezaie, 2000).

Outra diferença marcante entre o Ixolaris e o TFPI é a capacidade do primeiro interagir com o FX, com alta afinidade (Francischetti e col., 2002). De fato, o complexo binário Ixolaris-FX também é capaz de interagir com o complexo TF-FVIIa, inativando este último. Interessantemente, a formação do complexo FX-Ixolaris inibe a conversão do zimogênio em FXa pelo complexo tenase intrínseco (Monteiro e col., 2008), indicando que, na realidade, o Ixolaris apresenta um terceiro mecanismo de ação anticoagulante. Estes mecanismos estão sumarizados na figura 7.





**Figura 6: Estrutura do Ixolaris e seu mecanismo.** Inicialmente, o domínio kunitz se liga ao exossítio do FXa ou FX, levando a formação do complexo estável Ixolaris/FXa. Este interage com o FVIIa e TF, formando o complexo quaternário FVIIa-TF-Ixolaris-FXa. Retirado de Francischetti, 2002.

Dados obtidos por nosso grupo demonstram que o Ixolaris é um agente antitrombótico efetivo *in vivo*, quando testado em um modelo de trombose venosa em ratos (Nazareth e col., 2006). De fato, esta droga apresentou uma atividade antitrombótica com  $IC_{50}$  na faixa de 7,5-15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e com meia-vida prolongada, sendo o efeito antitrombótico mantido até 24h após a administração de uma única dose subcutânea.

Por esta razão, o Ixolaris seria um excelente candidato para avaliar sua atividade antitumoral, mediada por ação inibitória das propriedades pró-coagulantes dos tumores.

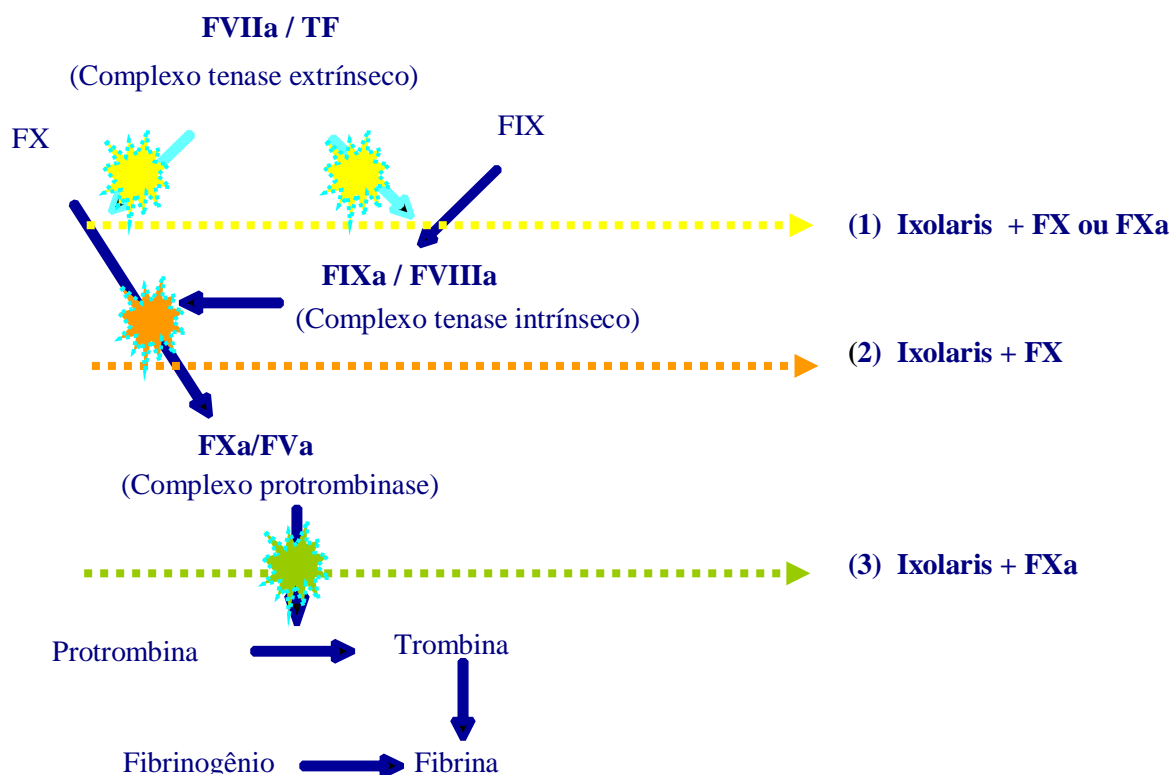


Figura 7. Mecanismo de ação do Ixolaris. **A molécula ao se ligar ao FX ou FXa forma um complexo binário que inativa o complexo tenase extrínseco (1), reduzindo a ativação dos FX e FIX. A ligação do Ixolaris ao FX também reduz a ativação do zimogênio pelo complexo tenase intrínseco (2) e por fim, a interação do Ixolaris com o FXa reduz a atividade do complexo protrombinase, reduzindo a formação de trombina (3).**



## 2. *Objetivos*

### 2.1. **Objetivo geral**

O objetivo do nosso trabalho é avaliar o efeito do Ixolaris, um potente inibidor exógeno da coagulação sanguínea, sobre as propriedades pró-coagulantes *in vitro* e o crescimento primário e metástase *in vivo* da linhagem de melanoma murino B16F10.

### 2.2. **Objetivos específicos**

- Analisar a expressão de fator tecidual, na linhagem de melanoma murino B16F10;
- Analisar o efeito do Ixolaris sobre a atividade pró-coagulante *in vitro* da linhagem B16F10;
- Avaliar o efeito do Ixolaris em modelo *in vivo* de metástase tumoral;
- Analisar a capacidade do Ixolaris em inibir o crescimento primário *in vivo* de B16F10; Analisar o efeito do Ixolaris na angiogênese tumoral *in vivo*.



## 3. Metodologia

### 3.1. Cultura de Células:

A linhagem de melanócito murino não tumorigênica, Melan-A (Bennet e col, 1987) foi gentilmente cedida pelo Dr. Roger Chammas (Faculdade de Medicina, USP, São Paulo), foi mantida em meio DMEM (GibcoBRL), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), suplementado com 2,4 g/L de HEPES; 3,7g/L de bicarbonato de sódio, 125 mg/L de fosfato de sódio; 110 mg/L de piruvato de sódio, 100 U/L de penicilina; 100 mg/L de streptomina; 2 mmol/L de L-glutamina; 55  $\mu$ mol/L de  $\beta$ -mercapto-etanol e 200nM/L de PMA, inibidor de PKC (Sigma Chemical Co.). A linhagem de melanoma murino, B16F10 (linhagem tumoral) foi mantida nas mesmas condições da Melan-A, porém não recebe PMA como suplemento.

Estas linhagens celulares crescem aderidas, de forma que as garrafas contendo cada tipo de linhagem são lavadas duas vezes com tampão PBS, e para desaderi-las foi usado o tampão Hank's-EDTA. Após centrifugação por 7 minutos a 200g, as células foram ressuspendidas em seus respectivos meios suplementados e mantidas em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### 3.2. Expressão de Fator Tecidual:

### **3.2.1. Citometria de Fluxo**

As análises foram feitas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, EUA), utilizando os seguintes parâmetros: desvio frontal (ou forward scatter), desvio lateral (ou side scatter) e sinais de fluorescência na cor verde (FL1), cujo comprimento de onda é de 525 nm ou, na cor laranja (FL2), cujo comprimento de onda é de 575 nm. A excitação das amostras foi realizada por laser de argônio, ajustado para emitir 15 mW a 488 nm. Um total de 10.000 eventos foi adquirido e os dados obtidos foram analisados utilizando o programa WinMDI 2.8. ou BD CellQuest Pro™ (Becton, Dickinson & Company).

Células B16F10 ou Melan-A foram lavadas com PBS contendo 2% de soro normal de camundongo (bloqueio para ligações inespecíficas utilizado durante as incubações), e incubadas por 30 min a 4°C com 200 µg/mL de anticorpo policlonal anti-TF murino (nº. 4515, American Diagnostica, Stanford, CT, EUA) ou controle isotipo IgG de coelho (nº. 2027, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA). As amostras foram então fixadas com paraformaldeído 1%, incubadas com 15 µg/mL de anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a biotina (nº. 81640, Invitrogen, San Diego, CA, EUA) por 30 min a 4°C, e finalmente incubadas com 2,5 µg/mL de estreptavidina conjugada à ficoeritrina (nº. 554061, BD Pharmingen, CA, USA), por 30 min a 4°C. Após serem lavadas duas vezes com PBS (o que foi realizado também entre as incubações), as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo.

### **3.2.2. Extração de RNA e Reação da cadeia de polimerase**

O RNA foi isolado das células B16F10 e Melan-A ( $2.5 \times 10^5$ ) usando trizol como reagente (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. RNA total (1  $\mu$ g) foi transcrito reversamente para cDNA usando o kit de cDNA, número no catálogo 4368814, da Applied Biosystems, de acordo com o protocolo do fabricante. Uma alíquota da mistura de reação foi usada para a amplificação por reação da cadeia de polimerase (PCR). Os primers usados foram: TF (F: 5'-CCTCGGACAGCCAGTAATTC-3' and R: 5'-GTGTGAGCGTTAGCGGCTTC-3') e  $\beta$ -actin (F: 5'-ACACCCGCCACCAGTTCGCC-3' e R: 5'-GCACAGTGTGGGTGACCCCGTCTC-3'). As condições no termociclador da Applied foram: 35 ciclos de 95°C para 30s (desnaturação), 55°C para 45s (anelamento), e 72°C por 45s (extensão). Os produtos de foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% marcado com brometo de etídio.

### **3.3. Expressão e purificação do Ixolaris:**

O Ixolaris recombinante foi expresso em células High Five, utilizando o sistema de expressão em Baculovirus (Invitrogen, San Diego, CA, EUA), conforme descrito por Monteiro e colaboradores (2005). O meio de cultura contendo a proteína recombinante foi aplicado em uma coluna de afinidade - Fator X acoplado à resina Sepharose 4B (Calbiochem, EUA). A coluna foi montada conforme instruções do fabricante e previamente equilibrada em Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5. Após a incubação do meio de cultura com a coluna, esta foi extensivamente lavada com o mesmo tampão e, em seguida,



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

### **3.4. Tempo de Recalcificação do plasma**

Para este ensaio, o sangue de camundongos C57BL6 foi coletado através de pulsão cardíaca para que pudesse se obter por centrifugação o plasma desses animais. O tempo de recalcificação do plasma foi avaliado no coagulômetro KC4 Amelung (Amelung, Alemanha). O plasma murino (50  $\mu$ L) foi incubado com as células B16F10 ( $2,5 \times 10^5$  em 50  $\mu$ L) na ausência ou presença de concentrações crescentes de Ixolaris (40, 80, 160, 200 nM) por 2 minutos e a reação foi iniciada pela adição de 100  $\mu$ L de 25 mM  $\text{CaCl}_2$ .

### **3.5. Atividade de TF nas células B16F10 por Ixolaris**

Ativação de FX murino por FVIIa na presença de células B16F10 foi realizado da seguinte forma: FVIIa (1 nM) e células B16F10 ( $5 \times 10^3$ /mL) foram incubadas com concentrações crescentes de Ixolaris (0-2.5 nM) por 10 minutos a 37°C em tampão HEPES-BSA. A reação foi iniciada pela adição de FX (135 nM) e alíquotas foram retiradas depois de 30 minutos e colocadas em uma micro placa contendo tampão Tris-EDTA. Depois da adição de 200  $\mu$ M do substrato cromogênico, S-2765, a absorbância de 405 nm foi feita a 37°C por 30 minutos usando um leitor de micro placa Thermomax. As velocidades (mOD/min) obtidas durante a reação foi usada para calcular a quantidade de FXa formado, em comparação com uma curva padrão com concentrações conhecidas da enzima.



### 3.6. Modelo Tumoral *in vivo*:

#### 3.6.1. Modelo metastático

Para realizar o modelo metastático, os camundongos C57BL6 de 8 semanas (pesando de 20-24g) receberam uma única dose de células ( $2,5 \times 10^5$ ) + Ixolaris (250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) por via intravenosa (i.v.). Após 15 dias, os camundongos foram sacrificados e os pulmões foram retirados para contagem dos nódulos metastáticos. Abaixo, segue o esquema utilizado para o modelo metastático.



**Figura 8. Ensaio experimental do modelo metastático.** Os camundongos C57BL6 receberam injeção intravenosa de células de melanoma murino juntamente com Ixolaris. Após 15 dias, os camundongos foram sacrificados para quantificação dos nódulos pulmonares.

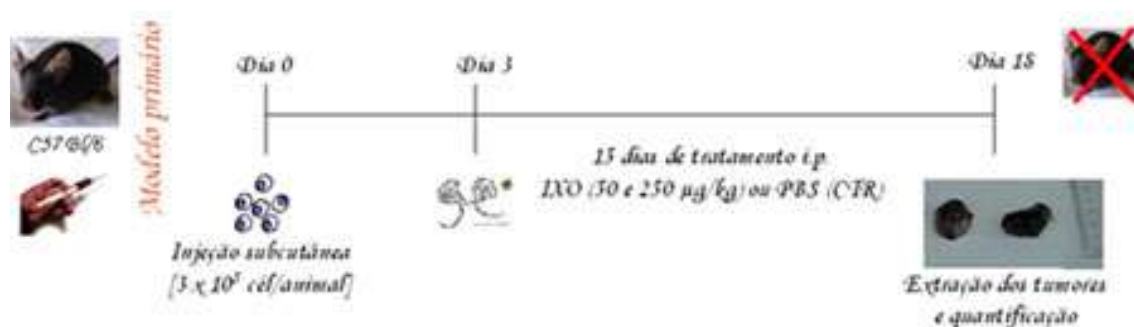
#### 3.6.2. Modelo Primário

Para a realização do ensaio de crescimento tumoral primário, as células B16F10 em crescimento exponencial foram lavadas, centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura DMEM sem soro. Cada animal recebeu a inoculação na pata traseira de 0,1 mL de uma suspensão contendo  $3,5 \times 10^5$  células, após assepsia do local com etanol 70%. O tratamento com Ixolaris

iniciou-se três dias após a inoculação das células. Os animais foram tratados diariamente, durante 15 dias, com diferentes concentrações de Ixolaris (50 e 250 µg/kg). Realizamos controles onde os animais receberam as células B16F10, e foram tratados com PBS. O crescimento do tumor foi acompanhado durante os 15 dias de tratamento e ao final os animais foram sacrificados com éter e os tumores formados foram extraídos cirurgicamente e pesados para posterior análise. As medidas diárias foram calculadas a partir da fórmula:

$$V = \frac{A^2 \times B}{2}$$

onde, A = eixo menor; B = eixo maior.



**Figura 9. Ensaio experimental do modelo primário.** Os camundongos C57BL6 receberam por via s.c. as células B16F10. No terceiro dia após inoculação, o tratamento foi iniciado por via i.p até o dia 18, onde os tumores foram mensurados.

Os procedimentos em questão foram submetidos e aprovados pela Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa (CCS-UFRJ), sob Protocolo CAUAP: IBQM 002, intitulado: “Estudo do efeito de moléculas com atividade anticoagulante no crescimento tumoral”.

### **3.7. Imunohistoquímica:**

Para realizar a imunohistoquímica, os tumores retirados dos camundongos foram mergulhados em formol 4% por 24 horas e em seguida foram mergulhados em banhos de álcool por 30 min, seguidos de banhos de xilol por mais 30 min e emblocados em parafina por 20 min. Os blocos contendo os tecidos foram cortados em micrótomo, esses cortes foram fixados em lâminas e deixados em estufa overnight a 60°C.

As lâminas foram posteriormente submetidas a desparafinização, onde foram mergulhadas em 3 banhos de xilol (15 min. cada), 3 banhos de álcool (5 minutos cada) e 1 banho em água destilada. Em seguida, as lâminas foram imersas em tampão citrato (3,84 g/L) em alta temperatura e pressão, até o ponto de ebulição. Lavou-se 3 vezes em banhos de PBS por 5 min. cada. As lâminas passaram por um processo de inativação utilizando peróxido, com o intuito de bloquear os epítomos não-específicos. Após 3 lavagens em PBS por 5 min., as lâminas foram incubadas por 30 min. em câmara úmida com 1 mL de PBS/BSA (soro fetal bovino/albumina bovina) 5%, SFB 10% e 0,02g de leite em pó molico, para bloqueio dos sítios inespecíficos.

As lâminas foram incubadas overnight com os anticorpos primários: anticorpo monoclonal contra VEGF (SC-7269, Santa Cruz Biotechnology), diluído 1:100 ou anticorpo monoclonal anti-mouse (CD105), (MAB-1320, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), diluído 1:10. As lâminas foram lavadas em PBS por 5 minutos cada. Os cortes foram revelados usando um Kit LSAB2, HRP (Dako-Cytomation, Carpinteria, CA, USA) com diaminobenzidina (3, 3'-diaminobenzidine tablets; Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) como cromógeno e foram contracolorados com hematoxilina. Os controles negativos consistiram em realizar todo o processo somente com o anticorpo secundário.

Para análise, 10 campos dos cortes imunomarcados (VEGF ou CD105) foram escolhidos aleatoriamente para captura da imagem em microscópio. A quantificação foi avaliada capturando imagens de alta qualidade (2048x1546 pixels) usando o IMAGEPRO PLUS 4.5.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Os dados foram transferidos para o Adobe Photoshop, versão 3.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA), para permitir a mesma iluminação e cor das imagens. A marcação da imunohistoquímica de VEGF ou CD105 foram semi-quantificadas. A Análise estatística usada para comparar as lâminas dos grupos controle e tratado foi TWO-WAY ANOVA.



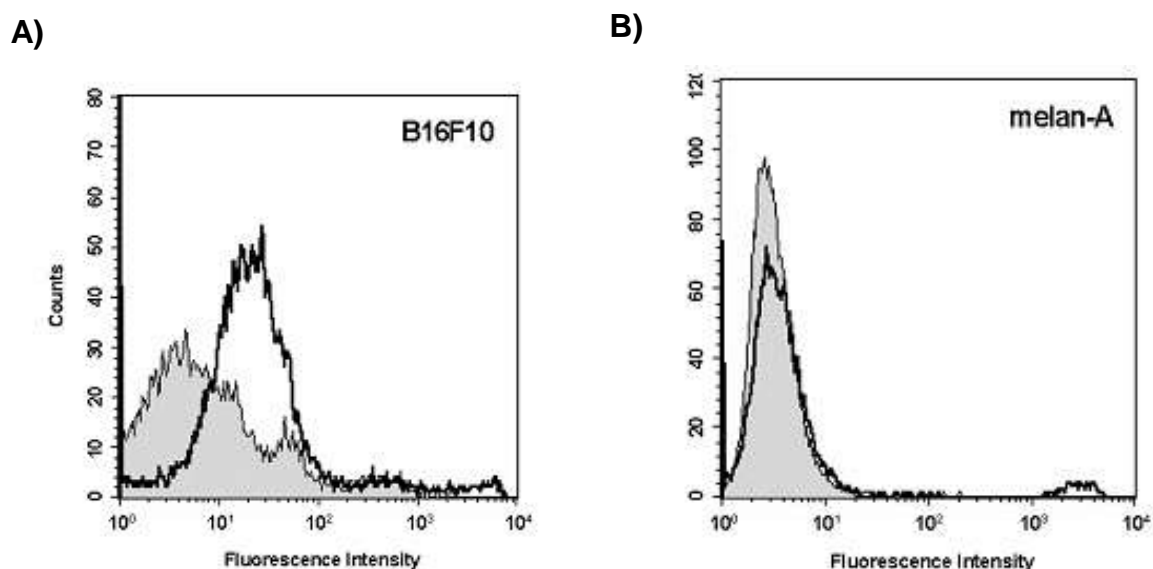
## 4. Resultados



#### 4.1. Células de melanoma murino B16F10 expressam Fator Tecidual.

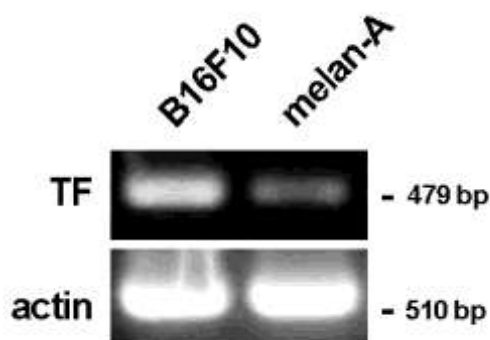
Estudos prévios demonstram que a atividade pró-coagulante de diversas linhagens tumorais deve-se, pelo menos em parte, à expressão de TF (Fernandes e col., 2006; Kirszberg, 2009). O melanoma é um câncer altamente metastático e há evidências de que o TF contribua para esse padrão (Mueller e col., 1992). De fato, sabe-se que a linhagem B16F10 expressa TF constitutivamente (Amirkhosravi e col., 2002). Dessa forma, através da análise por citometria de fluxo e RT-PCR (reação da cadeia de polimerase por transcriptase reversa), verificamos se a linhagem manipulada neste estudo apresentava esta característica.

Como pode ser observado na figura 10, o ensaio de citometria de fluxo, mostra que as células B16F10 expressam TF em sua superfície celular. Ao contrário, usando as mesmas condições, não foi observada marcação na linhagem não tumorigênica, Melan-A.



**Figura 10. Citometria. Expressão de TF em células B16F10 e Melan-A.** Análise da expressão de TF por citometria de fluxo nas linhagens B16F10 (A) e Melan-A (B). As linhas mais escuras representam a marcação com anticorpo policlonal de TF, seguido por anticorpo secundário conjugado a biotina e estreptavidina conjugada com ficoeritina. A região cinza representa a marcação com controle isotipo IgG (n=3).

Diferenças na expressão de TF foram corroboradas através de análises por RT-PCR. Como mostrado na figura 11, a expressão de RNAm na linhagem B16F10 é mais evidente do que na linhagem Melan-A.

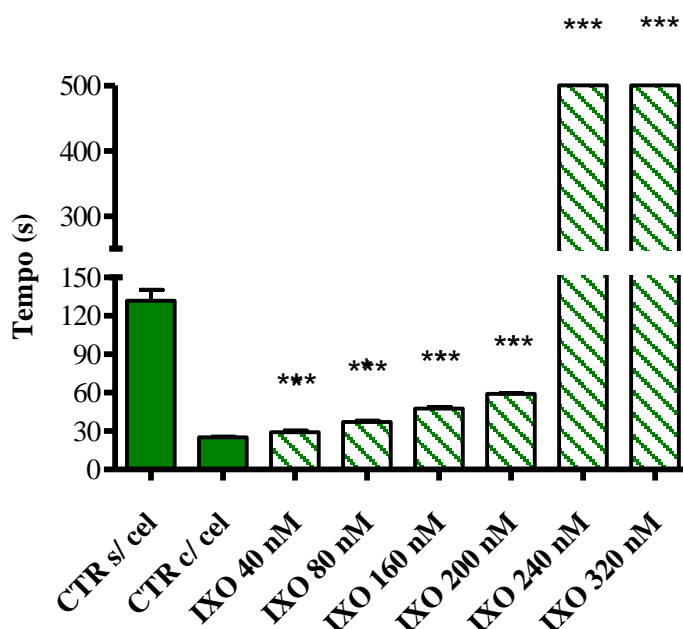


**Figura 11. RT-PCR. Células B16F10 e Melan-A expressam TF.** Análise por RT-PCR do gene de expressão TF nas linhagens B16F10 e Melan-A.  $\beta$ -actin foi usado como controle para o gene constitutivo (n=3).

#### **4.2. Ixolaris inibe a coagulação sanguínea induzida pelas células B16F10.**

Alguns estudos têm demonstrado que a cascata de coagulação apresenta um importante papel na progressão do tumor (Francis e col, 1998; Zacharscki, 2003; Banke e col, 2005). Dessa forma, vários inibidores específicos da cascata de coagulação têm sido testados com o objetivo de inibir o crescimento ou a disseminação do tumor (Francis & Amirkhosravi, 2002; Banke e col, 2005). Com isso, a próxima etapa desse trabalho, foi verificar a capacidade do Ixolaris em inibir a ativação da coagulação do plasma murino promovida pelas células B16F10. Foi observado que as células incubadas na ausência de Ixolaris formaram coágulo em um tempo menor do que na presença de Ixolaris. Dessa forma, o Ixolaris foi capaz de reverter o tempo de coagulação, sendo, essa inibição, dependente da concentração do

anticoagulante. Concentrações iguais ou superiores a 240 nM tornaram o plasma incoagulável, possivelmente devido à ação em múltiplas etapas da coagulação sanguínea.

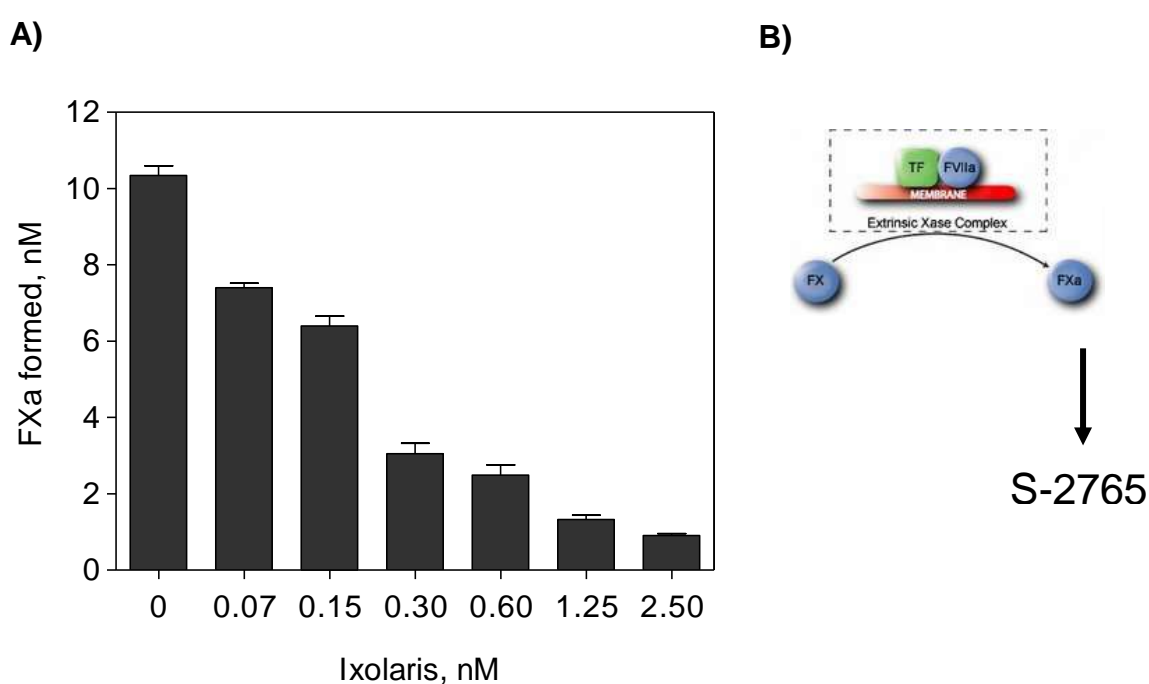


**Figura 12. Células B16F10 aceleram a coagulação do plasma murino e o Ixolaris minimiza este efeito.** O plasma murino (50  $\mu$ L) foi incubado com B16F10 ( $2,5 \times 10^5$ /poço) na presença ou ausência de IXO por 5 minutos. A reação foi iniciada com a adição de 100  $\mu$ L de 25 mM CaCL<sub>2</sub>. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,0001$ , quando comparado ao controle. As barras em verde indicam os controles ( $n=3$ ).

#### 4.3. Atividade de TF nas células B16F10 e reversão por Ixolaris.

Uma vez que os dados de citometria e RT-PCR demonstraram que existe uma marcação positiva de TF na linhagem B16F10, realizamos, em seguida um ensaio enzimático para comprovar sua funcionalidade. Os ensaios enzimáticos mostram que o TF expresso nas células murinas B16F10 é funcional, pois a formação de FXa foi dependente tanto da presença de células que expressam TF, quanto da presença de FVIIa, indicando a formação do complexo tenase extrínseco (TF-FVIIa). Estudos prévios mostram que Ixolaris é

um potente inibidor do complexo TF-FVIIa humanos, bloqueando a formação de FXa. Isto se deve a formação de um complexo quaternário TF-FVIIa-FX/Ixolaris, no qual o sítio catalítico do FVIIa é inativado (Francischetti, 2002). Portanto, nós fomos determinar se o Ixolaris inibiria o complexo tenase extrínseco formado pelas células B16F10 e por fatores murinos da coagulação. Como mostrado na figura, Ixolaris diminui drasticamente a formação de FXa no sistema montado em B16F10.



**Figura 13 . Efeito Inibitório do Ixolaris na ativação do FX pelas células B16F10. A)** Células e FVIIa foram incubados com Ixolaris por 10 minutos, antes da incubação com FX, a quantidade de FXa formado foi mensurado depois de 30 minutos de reação. **B)** Esquema da formação do complexo tenase extrínseco.

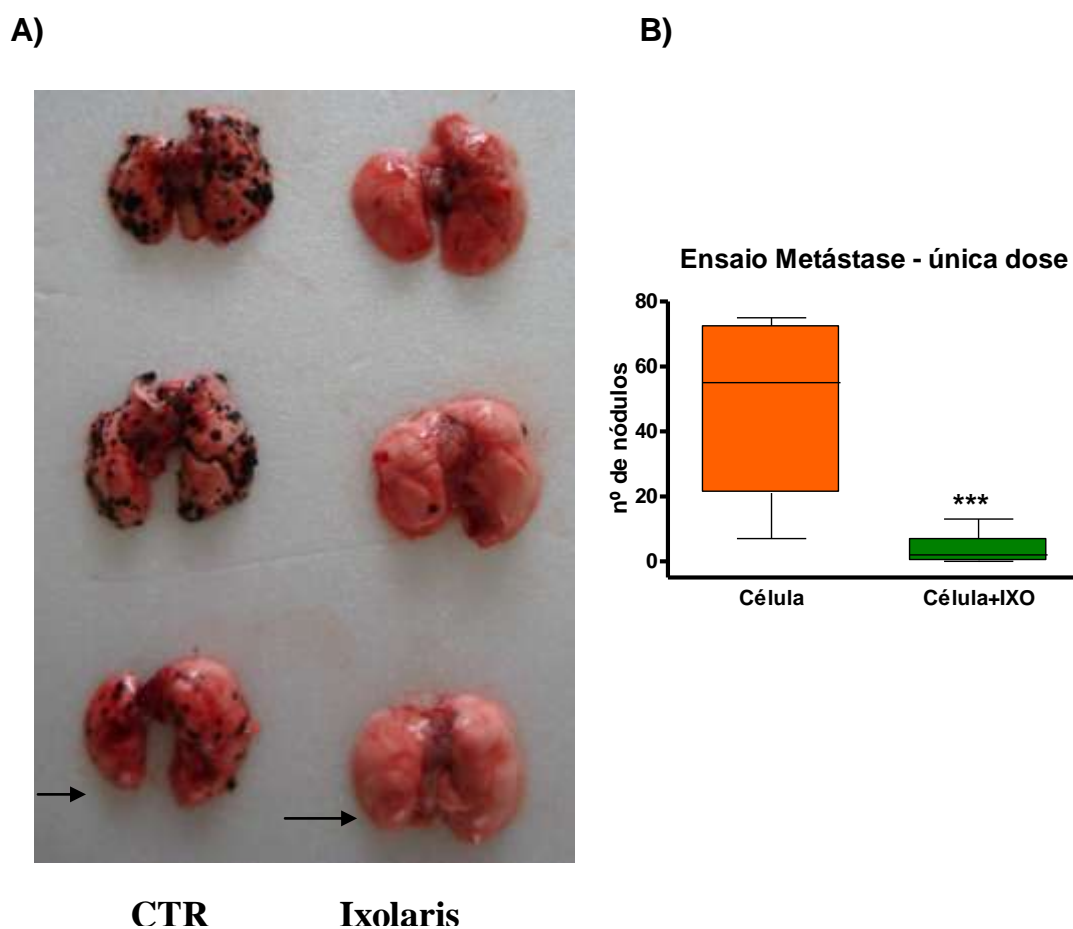
#### 4.4. Efeito antitumoral do Ixolaris

Uma vez que o Ixolaris inibe a atividade do TF nas células B16F10 e sabendo que estas características apresentam um importante papel no desenvolvimento do tumor, nós realizamos ensaios de tumorigênese *in vivo*,

com o intuito de verificar o efeito no Ixolaris na metástase e no crescimento primário.

#### 4.4.1. Modelo metastático

Neste modelo, camundongos C57BL6, receberam uma co-inoculação intravenosa de células B16F10 ( $2,5 \times 10^5$ ), juntamente com uma única dose de Ixolaris ( $250 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). Após 15 dias, os animais foram sacrificados e os pulmões visualizados para contagem dos nódulos. Como observado na figura 14 e na quantificação gráfica, o grupo tratado com Ixolaris apresentou uma diminuição dramática no número de nódulos pulmonares ( $4,0 \pm 1,1$  e  $47,4 \pm 10,1$  para o grupo controle), indicando uma potente ação antimetastática.



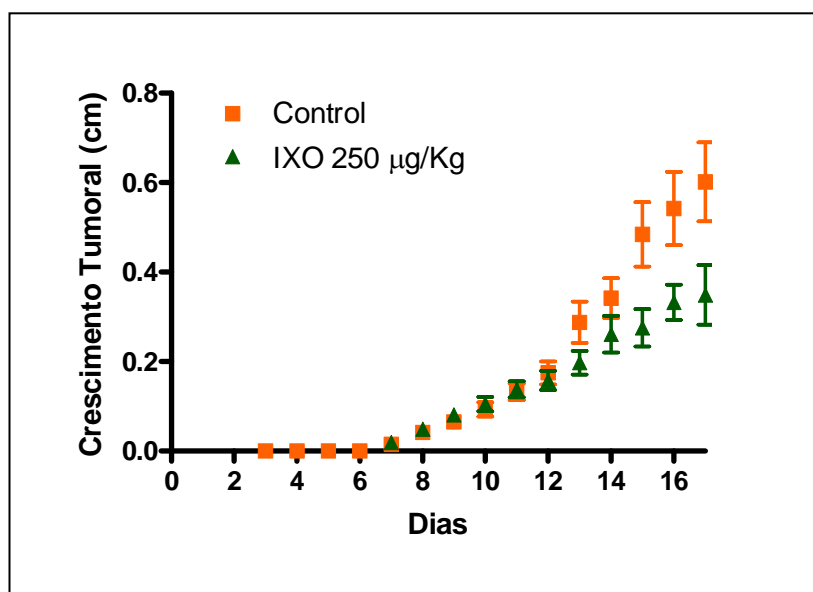
**Figura 14. Ensaio Metástase. A)** Camundongos C57Bl6 receberam via intravenosa, células B16F10 ( $2,5 \times 10^5$  células) com ou sem Ixolaris ( $250 \mu\text{g}/\text{Kg}$ ) uma única vez. Após 15 dias, os

camundongos foram sacrificados e os pulmões retirados para contagem dos nódulos. **B).** Quantificação. Foi considerado estatisticamente significativo  $P < 0,0001$  (\*\*\*) , quando comparado ao controle.

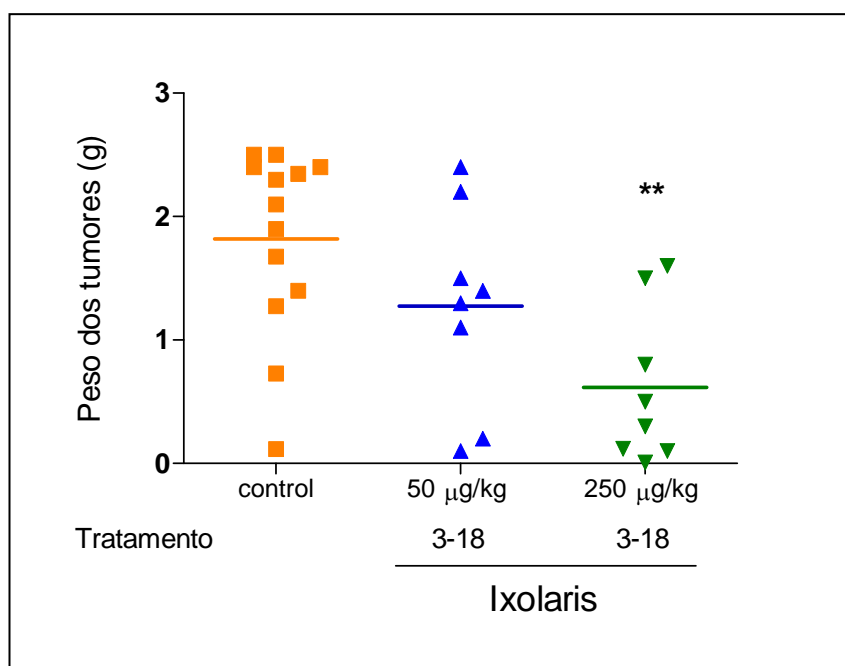
#### 4.4.2. Modelo primário:

As células ( $3.0 \times 10^5$ ) B16F10 foram inoculadas subcutaneamente em camundongos C57BL6. Após 3 dias do inóculo de células, iniciou-se o tratamento com Ixolaris. A figura 15a mostra que a partir do dia 14, pós-inoculação, os animais tratados com 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de Ixolaris passaram a apresentar tumores significativamente menores que os tumores controle. Ao longo do tratamento os tumores foram medidos com o auxílio de um paquímetro. Após 15 dias de tratamento, os animais foram sacrificados e os tumores foram dissecados e pesados. Foi observado que o peso médio dos tumores dos animais tratados com as concentrações de 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  foi, respectivamente, de  $1,2 \pm 0,2$  g e  $0,6 \pm 0,2$  g, enquanto que o peso médio dos tumores dos animais controles, ou seja, tratados apenas com PBS, foi de  $1,8 \pm 0,2$  g, como representado na figura 15b. Dessa forma, como mostrado nas figuras 15a e b, concluímos que os animais tratados com as duas concentrações de Ixolaris tiveram uma inibição significativa do crescimento do tumor, quando comparados com os animais controles.

### A) Crescimento tumoral (cm)



### B) Peso dos tumores no dia 18



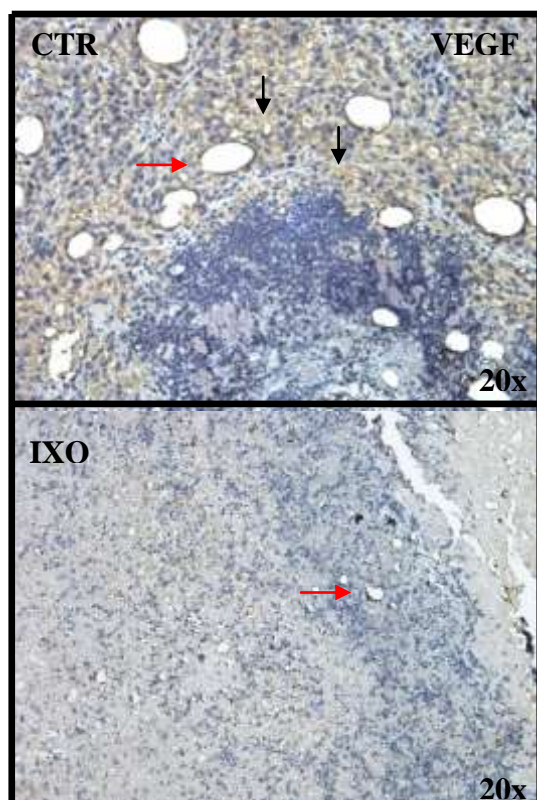
**Figura 15. Ixolaris inibe o crescimento *in vivo* das células B16F10.** Ensaio de tumorigênese *in vivo*. **A)** Crescimento tumoral (cm). Medida diária do tumor. **B)** Peso dos tumores no dia 18. Após a inoculação s.c. das células B16F10, os animais foram tratados com PBS ou IXO (50 e 250 µg/kg). Após 15 dias de tratamento, os animais foram sacrificados e os tumores dissecados e pesados. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$  (\*\*), quando comparado ao controle.



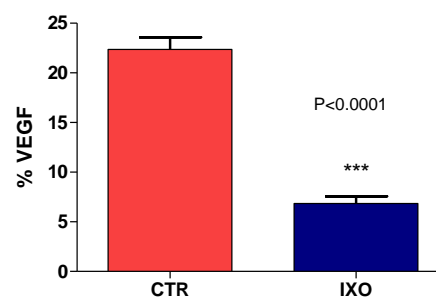
#### 4.5. Ixolaris inibe a angiogênese tumoral

Buscando melhor entendimento para explicar a diminuição do crescimento primário nos camundongos tratados com Ixolaris, o passo seguinte foi, através de ensaios de imunohistoquímica, verificar se houve uma diminuição nos níveis de VEGF e da densidade dos vasos na massa tumoral, a qual pode ser avaliada por CD105. As análises de imunohistoquímica confirmaram que o tratamento com Ixolaris regulou negativamente a expressão de VEGF, como pode ser visto na quantificação do gráfico abaixo, podendo então explicar a diminuição do crescimento tumoral durante o tratamento com Ixolaris ( $6,8 \pm 3,3$  e  $22,3 \pm 5,3$  para os tumores controles).

A)



B)

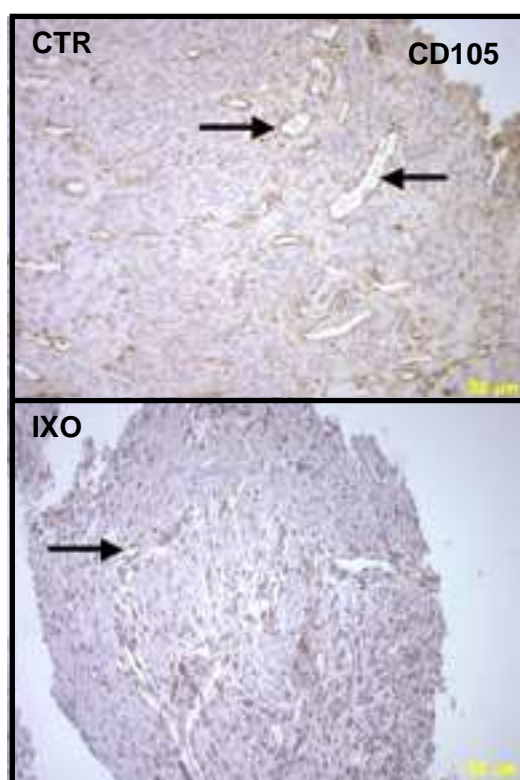


**Figura 16 . Tratamento com Ixolaris reduz a expressão de VEGF nos tumores primários.**

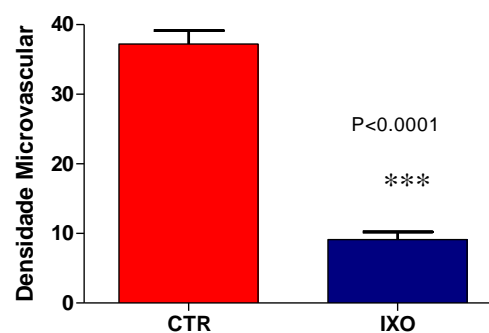
**A)** A Marcação para VEGF e a quantificação foram realizadas como descrito em materiais e métodos. As setas pretas indicam a marcação para VEGF e as setas vermelhas mostram o contorno dos vasos. **B).** O gráfico de barra mostra a diminuição da expressão de VEGF dos tumores tratados com Ixolaris ( $n=5$ ;  $6,8 \pm 3,3$ ) em relação ao controle ( $n=5$ ;  $22,4 \pm 5,4$ ).

Finalmente utilizamos a marcação de CD105 avaliada por imunohistoquímica para avaliar a densidade vascular nos tumores. De forma similar ao VEGF, foi observada uma redução significativa da densidade dos vasos nos tumores tratados em relação ao controle ( $9,1 \pm 3,5$  e  $37,2 \pm 6,1$ , respectivamente). O mesmo pode ser visto abaixo, juntamente com sua quantificação.

A)



B)



**Figura 17. Tratamento com Ixolaris regula formação de vasos nos tumores primários. A)**

A densidade dos vasos foi avaliada nos cortes dos tumores com marcação de CD-105, como descrito em materiais e métodos. As setas pretas indicam os vasos presentes na lâmina do tumor controle e no tratado com Ixolaris. **B)** O gráfico de barra mostra a diminuição da expressão de CD105 dos tumores tratados com Ixolaris controles ( $n=5$ ;  $9,1 \pm 3,5$ ) em relação ao controle ( $n=5$ ;  $37,2 \pm 6,1$ ).

## *5. Discussão*

A ativação da coagulação sanguínea no câncer tem sido amplamente demonstrada e a ocorrência de trombose é frequentemente observada (Rickles & Edwards, 1983), particularmente no pâncreas, cérebro, estômago, esôfago, rim e tumores de ovário (White e col., 2007). De fato, Sorensen e colaboradores relataram que pacientes com câncer que desenvolveram tromboembolismo venoso em uma época próxima ao diagnóstico de câncer, apresentaram menor sobrevida em comparação com um grupo de pacientes que não desenvolveram trombose. A frequência de trombose em pacientes com melanoma é relativamente baixa (0,5% em White e col., 2007). No entanto, é relatado que os marcadores de ativação da coagulação são encontrados em um número elevado de pacientes com câncer, apesar da ausência de complicações trombóticas (Lip e col., 2002).

Várias linhas de evidência indicam que as propriedades pró-coagulantes de células de melanoma desempenham um papel importante na biologia do tumor (Mueller e col., 1992; Im e col., 2004). Nosso grupo já demonstrou tanto por citometria quanto por RT-PCR que a linhagem murina B16F10 expressa TF constitutivamente (Kirsztberg e col., 2009), anexo I. Porém, o papel do TF na progressão do tumor não está completamente compreendido (Chen e col., 2001). Níveis de expressão TF têm sido correlacionados com a produção de VEGF em melanoma (Abe e col., 1999) e com o crescimento *in vivo* de células de tumor colo-retal (Yu e col., 2005). Por outro lado, a deficiência de TF teve pouco impacto no crescimento do tumor e angiogênese *in vivo* de células de fibrosarcoma (Palumbo e col., 2007).

Embora não se preconize um tratamento específico com anticoagulantes para a prevenção de trombose em pacientes com câncer, alguns estudos relatam os benefícios deste tratamento. De fato, estudos recentes incluindo

alguns realizados por nosso grupo, indicam que os anticoagulantes interferem no papel das proteínas da coagulação, na angiogênese e crescimento tumoral.

Nos últimos anos nosso grupo tem estudado um potente inibidor exógeno da coagulação sanguínea, denominado Ixolaris, obtido do carrapato *Ixodes scapularis* por técnicas de biologia molecular (Francischetti e col., 2002). O Ixolaris se liga ao fator Xa e posteriormente forma um complexo quaternário com o TF e FVIIa. Nossos dados mostram que o Ixolaris é altamente eficiente na inibição do complexo tenase extrínseco gerado pelas células B16F10 (figura 13). Portanto, o efeito antitumoral do Ixolaris pode ser atribuído à supressão da atividade do complexo TF-FVIIa associado ao tumor. Isto tem suporte em outros estudos que mostram: I) o emprego de anticorpos específicos contra TF humano, em modelos murinos, onde a supressão da atividade de TF no tumor, e não a atividade pró-coagulante de TF derivado do hospedeiro, é suficiente para diminuir o crescimento do tumor primário (Milsom e col., 2008); e II) camundongos com baixos níveis de TF que receberam as células B16F10 não apresentaram diferença no crescimento tumoral, quando comparado com o controle (Yu e col., 2008). Notavelmente, a progressão tumoral é também prejudicada por anticorpos monoclonais contra TF que, especificamente, suprimem a sinalização mediada por PAR-2 em células tumorais, sem afetar a coagulação mediada pelo complexo TF/FVIIa (Versteeg e col., 2008). Visto que o Ixolaris bloqueia o sítio catalítico do FVIIa, acreditamos que este possivelmente suprima tanto a atividade pró-coagulante quanto a sinalização mediada pelo complexo TF-FVIIa em células tumorais.

Dados obtidos por nosso grupo demonstram que o Ixolaris é um agente antitrombótico efetivo *in vivo*, quando testado em um modelo de trombose venosa em ratos (Nazareth e col., 2006). De fato, esta droga apresenta uma

atividade na faixa de  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e com meia-vida prolongada, sendo o efeito antitrombótico mantido por até 24 horas após administração de um única dose por via subcutânea. Além disso, o Ixolaris é um potente anticoagulante que não produz hemorragia quando injetado intraperitonealmente em diferentes modelos animais (dados não mostrados) (Nazareth e col., 2006).

Mais recentemente, demonstramos que o Ixolaris é capaz de inibir o crescimento primário *in vivo* das linhagens de glioblastoma humano U87-MG (Carneiro-Lobo, 2009) e de melanoma murino B16F10. Este resultado é apresentado nas figuras 15a e 15b; assim como a redução de nódulos metastáticos (figura 14). O Ixolaris foi efetivo nas duas doses utilizadas (50 e 250  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ), que são duas ou três ordens de magnitude menores do que as de outras moléculas que têm como alvo o TF ou a cascata de coagulação, no contexto experimental para tumores.

A proliferação descontrolada dos melanócitos leva a um aumento no consumo de oxigênio e nutrientes, ocorrendo o processo de hipóxia (Michaylira & Nakagawa, 2006 and Culp e col., 2006). Para atender essa demanda, uma vasculatura adicional precisa ser formada, para o fornecimento de sangue, aquele, então inicia a produção de fatores de crescimento, como o VEGF que irá levar ao processo de angiogênese. No modelo de melanoma B16F10, o switch angiogênico pode ser iniciado antes do 3º dia com outros fatores angiogênicos que são expressos, porém Culp e colaboradores não detectaram a expressão de VEGF até o 5º dia nestes tumores. De fato, a intensa angiogênese para muitos tipos de tumores, é um marcador patológico, por exemplo, o glioblastoma, é um dos tumores malignos mais vascularizados, existindo uma forte evidência de que o VEGF tenha um papel crucial neste processo (Plate e col., 1992). Nesse trabalho, verificamos que a inibição do

crescimento primário foi acompanhada de uma regulação negativa significativa de VEGF (figura 16) e angiogênese na massa tumoral (figura 17). Adicionalmente, outros modelos tumorais demonstraram uma diminuição da angiogênese mediante a inibição de TF, incluindo carcinoma (Milsom e col., 2008), câncer de mama (Ngo e col., 2007; Versteeg e col., 2008) e melanoma (Hembrough, 2003).

O envolvimento de TF na angiogênese tumoral poderia estar relacionado com a ativação de receptores ativado por proteases (PARs) por enzimas da coagulação geradas no microambiente tumoral (Belting e col, 2005). A ligação do FVIIa às células tumorais que expressam TF pode elicitar mecanismos de transdução de sinal através da ativação de PAR-2, seguido pela regulação positiva da expressão de VEGF (Liu e Mueller, 2006). De fato, recentemente, foi demonstrado que o PAR-2 contribui para a angiogênese durante o desenvolvimento de tumor de mama espontâneo em camundongos (Versteeg e col., 2008). Por outro lado, Yin e colaboradores demonstraram que em modelos de melanoma e carcinoma, PAR-1 medeia a angiogênese através da produção de VEGF. Além disso, a trombina medeia a ativação de PAR-1, *in vitro*, em células de glioma, aumentando a transcrição e a expressão de VEGF (Yamahata e col., 2002). Esses dados, em conjunto, podem indicar que o Ixolaris pode diminuir a ativação de PAR-1 e/ou PAR-2 nas células de melanoma B16F10, diminuindo a progressão tumoral e a metástase. No entanto, esse mecanismo ainda não está elucidado.

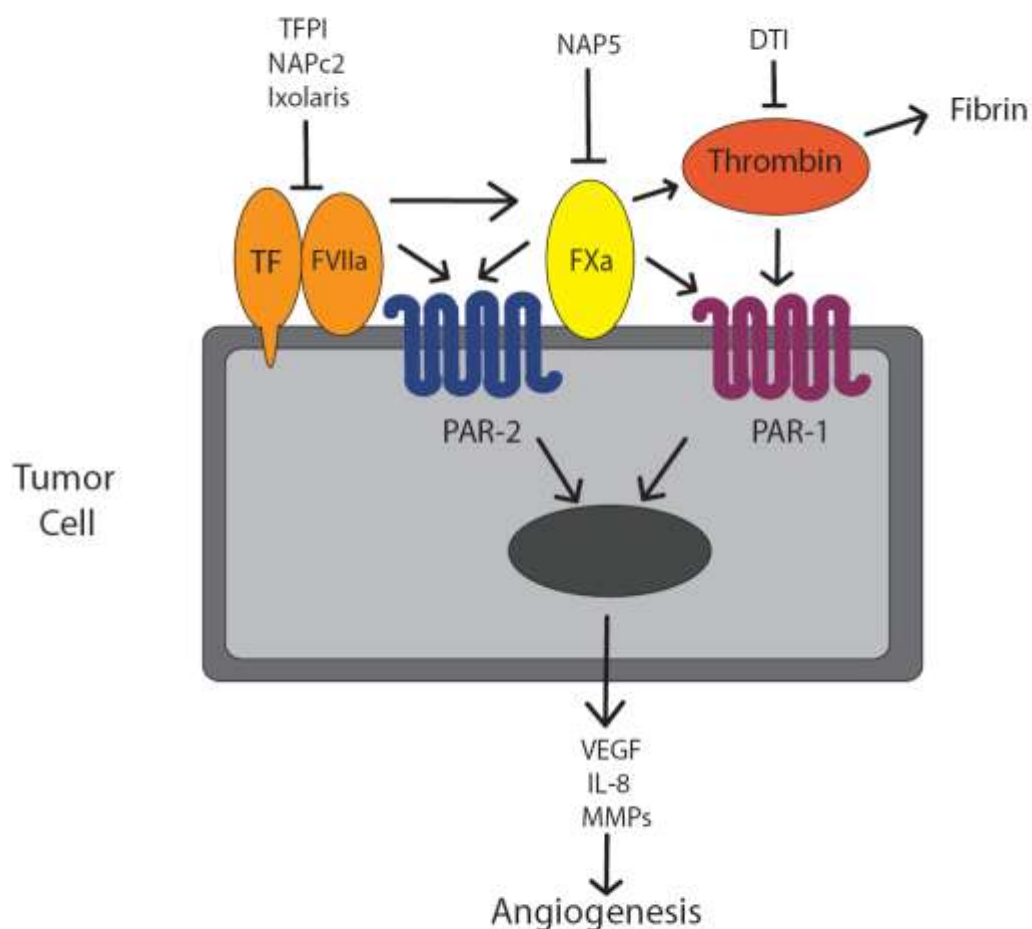
Existem dados pré-clínicos convincentes que sugerem que o TF possa ter um papel importante como regulador de vários processos relacionados ao câncer. Dados experimentais mostram que o TF é diretamente ou indiretamente um alvo por exercer efeitos anticâncer consideráveis e que,

dessa forma, uma estratégia anti TF possa oferecer benefícios terapêuticos substanciais, desde que os estudos validem a segurança e viabilidade de tal abordagem (Yu e col., 2005; Versteeg e col., 2008; Zhang e col., 1994; Yu e col., 2004; Haembrough e col., 2003; Wang e col., 2004; Mueller e col., 1998).

A inibição do complexo TF-FVIIa, seja por anticorpos anti-TF ou por moléculas anticoagulantes como o Ixolaris ou o NAPC-2 reduzem o crescimento tumoral em modelos animais (Carneiro-Lobo e col., 2009 e Hembrough e col., 2003). De fato, acredita-se que a inibição seletiva da sinalização dependente de TF poderia reduzir o crescimento tumoral sem alterar a atividade pró-coagulante do TF. A inibição direta de PAR-2 poderia resultar em uma redução similar do crescimento tumoral. Entretanto, estratégias que seletivamente bloqueiam a sinalização da via TF-FVIIa-PAR-2 podem não ser tão eficazes quanto as que bloqueiam a sinalização e a atividade pró-coagulante do TF, porque ele não irá impactar na trombose e na metástase. Em resumo, é importante considerar que o TF poderia representar um alvo terapêutico contra um conjunto variável de tumores nos quais esta proteína desempenha um papel pró-agressivo (Milsom e Rak 2007).

Portanto, analisar as bases moleculares para estabelecer o processo de coagulação como alvo terapêutico no câncer é de extrema importância. Recentemente, um provável mecanismo foi proposto por McEachron & Mackman (figura 18). Estabelecer estes conceitos permitirá a utilização de fármacos como o Ixolaris. Conseqüentemente, por um lado, o Ixolaris pode atenuar a ocorrência de eventos pró-trombóticos inerentes à doença e por outro, reduzir a angiogênese, interferindo assim com dois componentes importantes que contribuem para o crescimento do tumor e metástase *in vivo*.





**Figura 18. Contribuição do fator tecidual, proteases da coagulação e PARs na angiogênese tumoral.** A formação do complexo TF-FVIIa na superfície de células tumorais ativam o sistema de coagulação. A clivagem de PAR-2 por FVIIa ou FXa induz a expressão de várias proteínas pró-angiogênicas, incluindo VEGF, IL-8 e metaloproteinases (MMPs). A ativação de PAR-1 por trombina ou FXa induz uma série de genes similares. Anticoagulantes que atuam em diferentes alvos das proteases da cascata de coagulação são demonstradas no esquema. *Retirado de McEachron & Mackman, 2009.*

Como perspectiva futura para melhor compreender o mecanismo molecular do câncer pretende-se continuar o estudo com linhagens de melaoma, porém agora focando em linhagens de melanoma humano em diferentes estágios de progressão. Dessa forma, poderíamos tentar avaliar a expressão de receptores do tipo PAR-2, cuja ativação é provocada pelo Fator

VIIa quando associado ao Fator Tecidual na superfície de células tumorais. Além disso, verificar se PAR-2 medeia a produção de VEGF e interleucina-8, importantes produtos pró-tumorais, mediante a ativação destes receptores pelo Fator VIIa ou pelo peptídeo agonista de PAR-2. E por fim, avaliar *in vitro* se o Ixolaris inibe a produção de VEGF e IL-8 em células tumorais, após tratamento com o Fator VIIa.



## **6. Conclusão**

Neste estudo, demonstramos que a expressão de TF é responsável pelo alto padrão pró-coagulante da linhagem de melanoma B16F10. Além disso, o Ixolaris apresenta uma potente atividade contra as propriedades pró-coagulantes *in vitro* e crescimento tumoral *in vivo* das células B16F10. Notavelmente, a inibição do crescimento tumoral foi acompanhada por uma diminuição de VEGF e de densidade dos vasos na massa tumoral.

## *7. Referências Bibliográficas*

ABE K.; SHOJI M.; CHEN J.; BIERHAUS A.; DANAVE I.; MICKO C.; CASPER K.; DILLEHAY D.L.; NAWROTH P.P.; RICKLES F.R. Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor. *Proc Natl Acad Sc.* 1999; 96(15):8663-8668.

AGNELLI G.; BOLIS G.; CAPUSSOTTI L.; SCARPA R.M.; TONELLI F.; BONIZZONI E.; MOIA M.; PARAZZINI F.; ROSSI R.; SONAGLIA F.; VALARANI B.; BIANCHINI C.; BUSSONI G. A clinical outcome-based prospective study on venous thromboembolism after cancer surgery: the @RISTOS project. *Amm Surg.* 2006; 243: 89-95.

AMIRKHOSRAVI A.; MEYER T.; CHANG J.; AMAYA M.; SIDDIQUI F.; DESAI H.; FRANCIS J.L. Tissue Factor Pathway Inhibitor Reduces Experimental Lung Metastasis of B16 Melanoma. *Thromb Haemost.* 2002; 87:930-936.

BANKE I.J., ARLT M.J., MUELLER M.M., SPERL S., STEMBERGER A, STÜRZEBECKER J., AMIRKHOSRAVI A, MORODER L., KRÜGER A. Effective inhibition of experimental metastasis and prolongation of survival in mice by a potent factor Xa-specific synthetic serine protease inhibitor with weak anticoagulant activity. *Thromb Haemost.*, 2005; 94:1084-93

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

BENNETT D.C.; COOPER P.J.; HART I.R. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Int J Cancer.* 1987; 39:414-8.

BLACK PC.; MIZE GJ.; KARLIN P.; GREENBERG DL.; HAWLEY SJ.; TRUE LD.; VESSELLA RL. and TAKAYAMA TK. Overexpression of protease-activated receptors-1,-2, and-4 (PAR-1, -2, and -4) in prostate cancer. *Prostate.* 2007; 67:743-756.

BLUFF J.E.; BROWN N.J.; REED M.W.; STATON C.A. Tissue factor, angiogenesis and tumour progression. *Breast Cancer Res. Review.* 2008;10:204.

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

BOIRE A.; COVIC L.; AGARWAL A.; JACQUES S.; SHERIFI S. and KULIOPULOS A. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell.* 2005; 120:303-13.

BORENSZTAJN K.S., SPEK C.A. Protease-activated receptors, apoptosis and tumor growth. *Pathophysiol Haemost Thromb. Review.* 2008; 36:137-147.

BROMBERG M.E., CAPPELLO M. Cancer and blood coagulation: molecular aspects. *Cancer J Sci Am.* 1999; 5:132-138.

BROZE GJ JR. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost.* 1995; 74:90-3.

CAMERER E.; QAZI A. A.A; DUONG D.N.; CORNELISSEN I.; ADVINCULA R.; COUGHLIN S.R. Platelets, protease-activated receptors and fibrinogen in hematogenous metastasis. *Blood.* 2004; 104:397-401.

CARMELIET P.; MACKMAN N.; MOONS L.; LUTHER T.; GRESSENS P.; VAN VLAENDEREN I.; DEMUNCK H.; KASPER M.; BREIER G.; EVRARD P.; MÜLLER M.; RISAU W.; EDGINGTON T.; COLLEN D. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 1996; 383:73-75.

CARNEIRO-LOBO T.C.; KONIG S.; MACHADO D.E.; NASCIUTTI L.E.; FORNI M.F.; FRANCISCHETTI I.M.; SOGAYAR M.C.; MONTEIRO R.Q. Ixolaris, a tissue factor inhibitor, blocks primary tumor growth and angiogenesis in a glioblastoma model. *J Thromb Haemost.* 2009 7:1855-1864.

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

CLARK WH JR, ELDER DE, GUERRY D IV, EPSTEIN MN, GREENE MH, VAN HORN M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol.* 1984; 15:1147-65.

COOPER CR, CHAY CH, GENDERNALIK JD, LEE HL, BHATIA J, TAICHMAN RS, MCCAULEY LK, KELLER ET, PIANTA KJ. Stromal factors involved in prostate carcinoma metastasis to bone. *Cancer.* Review. 2003; 97:739-47.

COUGHLIN S.R. Thrombin signaling and protease-activated receptors. *Nature.* 2000; 407:258-264.

**CULP, W. D.; NEAL, R.; MASSEY, R.; EGEVAD, L.; PISA, P  
and GARLAND, D. Proteomic analysis of tumor  
establishment and growth in the B16-F10 mouse melanoma  
model. *Journal of Proteome Research.* 2006; 5:1332-1343.**



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

DE VRIES E.; BRAY FI.; COEBERGH JW. et al. Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953-1997: rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in western Europe and decreases in Scandinavia. *Int J Cancer.* 2003;107:119–126.

DONNELLY K.M.; BROMBERG M.E.; MILSTONE A.; MCNIFF J.M.; TERWILLIGER G.; KONIGSBERG W.H.; CAPPELLO M. Ancylostoma caninum Anticoagulant Peptide Blocks Metastasis In Vivo and Inhibits Factor Xa Binding to Melanoma Cells In Vitro. *Thromb Haemost.* 1998; 79: 1041-7.

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

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

FALANGA A.; RICKLES F.R. Pathophysiology of the thrombophilic state in the cancer patient. *Semin Thromb Hemost.* 1999; 25: 173-182.

FERNANDES R.S; KIRSZBERG C.; RUMJANEK V.M.; MONTEIRO R.Q. On the molecular mechanisms for the highly procoagulant pattern of C6 glioma cells. *J Thromb Haemost.* 2006; 4:1546-1552.

FERNANDEZ P.M., RICKLES F.R. Tissue factor and angiogenesis in cancer. *Curr. Opin. Hematol.* 2002; 9:401-406.

FOLKMAN J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82:4-6.

FOLKMAN J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med. Review.* 2003; 3:643-651.

FRANCIS J.L., BIGGERSTAFF J., AMIRKHOSRAVI A. Hemostasis and malignancy. *Semin Thromb Hemost.* 1998; 24(2):93-109.

FRANCIS J.L., AMIRKHOSRAVI A Effect of antihemostatic agents on experimental tumor dissemination. *Semin Thromb Hemost.* 2002; 28:29-38.

FRANCISCHETTI I.M.; VALENZUELA J.G.; ANDERSEN J.F.; Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, Ixodes scapularis: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood* 2002; 99:3602-12.

- FRANCISCHETTI I.M.; SEYDEL K.B.; MONTEIRO R.Q. Blood coagulation, inflammation, and malaria. *Microcirculation*. 2008; 15:81-107.
- FUJIMOTO D.; HIRONO Y.; GOI T.; KATAYAMA K.; HIROSE K. and YAMAGUCHI A. Expression of protease activated receptor-2 (PAR-2) in gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2006; 93:139-144.
- GIESEN P.L., RAUCH U., BOHRMANN B., KLING D., ROQUE M., FALLON J.T., BADIMON J.J., HIMBER J., RIEDERER M.A., NEMERSON T. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1999; 96: 2311-2315.
- GRANOVSKY-GRISARU S.; ZAIDOUN S.; GRISARU D.; YEKEL Y.; PRUS D.; BELLER U.; BAR-SHAVIT R. The pattern of Protease Activated Receptor 1 (PAR1) expression in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2006; 103(3):802-6.
- GRISARU-GRANOVSKY S.; SALAH Z.; MAOZ M.; PRUSS D.; BELLER U. AND BAR-SHAVIT R. Differential expression of protease activated receptor 1 (Par1) and pY397FAK in benign and malignant human ovarian tissue samples. *Int J Cancer*. 2005; 113:372-378.
- HEMBROUGH T.A.; SWARTZ G.M.; PAPATHANASSIU A.; VLASUK G.P.; ROTE W.E.; GREEN S.J.; PRIBLUDA V.S. Tissue Factor/Factor VIIa Inhibitors Block Angiogenesis and Tumor Growth Through a Nonhemostatic Mechanism. *Cancer Research* 2003; 63: 2997-3000.
- HUANG YQ.; LI JJ.; HU L.; LEE M. and KARPATKIN S. Thrombin induces increased expression and secretion of VEGF from human FS4 fibroblasts, DU145 prostate cells and CHRF megakaryocytes. Thromb Haemost. 2001; 86:1094-1098.*
- IM J.H.; FU W.; WANG H.; BHATIA S.K.; HAMMER D.A.; KOWALSKA M.A.; MUSCHEL R.J. Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. Cancer Res. 2004; 64:8613-8619.*
- IWAKI K, SHIBATA K, OHTA M, ENDO Y, UCHIDA H, TOMINAGA M, OKUNAGA R, KAI S, KITANO S. A small interfering RNA targeting proteinase-activated receptor-2 is effective in suppression of tumor growth in a Panc1 xenograft model. *Int J Cancer*. 2008; 122:658-63.
- JAHAN I.; FUJIMOTO J.; ALAM SM.; SATO E.; SAKAGUCHI H. and TAMAYA T. Role of protease activated receptor-2 in tumor advancement of ovarian cancers. *Ann Oncol*. 2007; 18:1506-1512.
- KAKKAR A.K.; LEVINE M.N.; KADZIOLA Z.; LEMOINE N.R.; LOW V.; PATEL H.K.; RUSTIN G.; THOMAS M.; QUIGLEY M.; WILLIAMSON R.C. Low molecular weight heparin, therapy with dalteparin, and survival in advanced cancer: the fragmin advanced malignancy outcome study (FAMOUS). *J Clin Oncol*. 2004; 22:1944-1948.

KASTHURI R.S.; TAUBMAN M.B.; MACKMAN N. Role of tissue factor in cancer. *J Clin Oncol. Review.* 2009; 27:4834-4838.

KAUFMANN R.; JUNKER U.; NUSKE K.; WESTERMANN M.; HENKLEIN P., SCHEELE J. and JUNKER K. PAR-1- and PAR-3-type thrombin receptor expression in primary cultures of human renal cell carcinoma cells. *Int J Oncol.* 2002; 20:177-80.

KIRSZBERG C.; LIMA L.G.; DA SILVA DE OLIVEIRA A.; PICKERING W.; GRAY E.; BARROWCLIFFE T.W.; RUMJANEK V.M.; MONTEIRO R.Q. Simultaneous tissue factor expression and phosphatidylserine exposure account for the highly procoagulant pattern of melanoma cell lines. *Melanoma Res.* 2009; 19:301-308.

LEVINE M.N.; LEE A.Y.; KAKKAR A. K. From Trousseau to targeted therapy: new insights and innovations in thrombosis and cancer. *J. Thromb. Haemost.* 2003; 1: 1456-1463.

**LIU Y., MUELLER B.M. Protease-activated receptor-2 regulates vascular endothelial growth factor expression in MDA-MB-231 cells via MAPK pathways.**

***Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 344:1263-1270.**

LIP G.Y.; CHIN B.S.; BLANN A.D. Cancer and the prothrombotic state. *Lancet Oncol.* 2002; 3:27-34.

MACFARLANE S.R.; SEATTER M.J.; KANKE T.; HUNTER G.D.; PLEVIN R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev. Review.* 2001; 53: 245-282.

MACKMAN N. Tissue-specific hemostasis: role of tissue factor. *J. Thromb. Haemost.* 2008; 6:303-305.

**MACKMAN N., SAWDEY M.S., KEETIN M.R., LOSKUTOFF D.J. Murine tissue factor gene expression in vivo. Tissue and cell specificity and regulation by lipopolysaccharide.**

***Am J Pathol.* 1993; 143: 76-84**

MAHABELESWAR G.H, BYZOVA T.V. Angiogenesis in melanoma. *Semin Oncol. Review.* 2007 34:555-65.

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

**MASSI D.; NALDINI A.; ARDINGHI C.; CARRARO F.;  
FRANCHI A.; PAGLIERANI M.; TARANTINI F.; KETABCHI  
S.; CIRINO G.; HOLLENBERG MD.; GEPETTI P. and  
SANTUCCI M. Expression of protease-activated receptors 1  
and 2 in melanocytic nevi and malignant melanoma. *Hum  
Pathol.* 2005; 36:676-685.**

MCEACHRON T.; MACKMAN N.J. Tumors, ticks and tissue factor. *Thromb Haemost.* 2009; 7:1852-1854.

MICHAYLIRA C.Z., NAGAWA H. Hypoxic microenvironment as a cradle for melanoma development and progression. *Cancer Biol Ther.* 2006; 5:476-479.

MILLER, A.J.; MIHM, M.C. Melanoma: mechanisms of disease. *The New England Journal of Medicine.* 2006; 355:51-65.

MILSOM C.; RAK J. Tissue factor and cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb. Review.* 2007; 36:160-176.

MILSOM C.; YU J.L., MACKMAN N., MICALLEF J., ANDERSON G.M., GUHA A., RAK J.W. Tissue factor regulation by epidermal growth factor receptor and

epithelial-to-mesenchymal transitions: effect on tumor initiation and angiogenesis. *Cancer Res.* 2008; 68:100068-10076.

MONTEIRO R.Q.; REZAIIE A.R.; RIBEIRO J.M. Ixolaris: a factor Xa heparin-binding exosite inhibitor. *Biochem J.* 2005; 387:871-7.

MONTEIRO R.Q.; REZAIIE A.R., BAE J.S.; CALVO E.; ANDERSEN J.F.; FRANCISCHETTI I.M. Ixolaris binding to factor X reveals a precursor state of factor Xa heparin-binding exosite. *Protein Sci.* 2008; 146-53.

*MUELLER B.M.; REISFELD R.A.; EDGINGTON T.S.; RUF W. Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis. Proc Natl Acad Sci. 1992; 89:11832-11836.*

MUELLER B.M.; RUF W. Requirement for binding of catalytically active factor VIIa in tissue factor-dependent experimental metastasis. *J Clin Invest.* 1998; 101:1372-1378.

*NGO C.V., PICHA K., MCCABE F., MILLAR H., TAWADROS R., TAM S.H., NAKADA M.T. ANDERSON G.M. CNTO 859, a humanized anti-tissue factor monoclonal antibody, is a potent inhibitor of breast cancer metastasis and tumor growth in xenograft models. Int J Cancer. 2007; 120: 1261-1267.*

*NALLURI S.R.; CHU D.; KERESZTES R.; ZHU X.; WU S. Risk of venous thromboembolism with the angiogenesis inhibitor bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis. Jama. 2008; 300: 2277-2285.*

NAKASAKI T., WADA H., SHIGEMORI C., MIKI C., GABAZZA E.C., NOBORI T., NAKAMURA S., SHIKU H. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *Am J Hematol.* 2002; 69: 247-254.

*NAZARETH R.A.; TOMAZ L.S.; ORTIZ-COSTA S.; ATELLA G.C.; RIBEIRO J.M.; FRANCISCHETTI I.M.; MONTEIRO R.Q. Antithrombotic properties of Ixolaris, a potent inhibitor of the extrinsic pathway of the coagulation cascade. Thromb Haemost., 2006; 96:7-13.*

NIERODZIK M.L., KARPATKIN S. Thrombin induces tumor growth, metastasis and angiogenesis: evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell.* 2006; 10: 355-362.

ORNSTEIN D.L.; ZACHARSKI L.R. Treatment of cancer with anticoagulants: rationale in the treatment of melanoma. *Int J Hematol.* 2001; 2:157-161.

PALUMBO J.S., KOMBRINCK K.W., DREW A.F., GRIMES T.S., KISER J.H., DEGEN J.L., BUGGE T.H. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. *Blood.* 2000; 96: 3320-3309.

PALUMBO J.S.; TALMAGE K.E.; MASSARI J.V.; LA JEUNESSE C.M.; FLICK M.J.; KOMBRINCK K.W.; HU Z.; BARNEY K.A.; DEGEN J.L. Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms. *Blood.* 2007; 110:133-141.

PLATE K.H., BREIER G., WEICH H.A, RISAU W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour growth angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature.* 1992; 359: 845-848.

PRANDONI P.; LENSING A. W.; PICCIOLI A; BERNARDI E.; SIMONI P.; GIROLAMI B.; MARCHIORI A; SABBION P.; PRINS M.H.; NOVENTA F.; GIROLAMI A. Recurrent venous thromboembolism and bleeding complications during anticoagulant treatment in patients with cancer and venous thrombosis. *Blood.* 2002; 100:3484-3488.

RAUCH U., ANTONIAK S., BOOTS M., SCHULZE K., GOLDIN-LANG P., STEIN H., SCHULTHEISS H.P., COUPLAND S.E. Associations of tissue-factor upregulation in squamous-cell carcinoma of the lung with increased tissue-factor in circulating blood. *Lancet Oncol.* 2005; 6:254.

RAK J.; MILSOM C.; MAY L.; KLEMENT P.; YU J. Tissue factor in cancer and angiogenesis: the molecular link between genetic tumor progression, tumor neovascularization, and cancer coagulopathy. *Semin Thromb Hemost.* 2006; 32:54-70.

REZAIIE A.R. Identification of basic residues in the heparin binding exosite of factor Xa critical for heparin and factor Va binding. *J Biol Chem.* 2000; 275:3320-7.

RICKLES F.R. Mechanisms of cancer-induced thrombosis in cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb. Review.* 2006; 35:103-10.

RICKLES F.R.; EDWARDS R.L. Activation of blood coagulation in cancer: Trousseau's syndrome revisited. *Blood* 1983; 62:14-31.

RICKLES F.R.; FALANGA A. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thromb Res.* 2001; 102(6): 215-224.

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

ROSSI C.; HESS S.; ECKL R.W.; LENA A.D.; BRUNO A.; THOMAS O.; POGGI A. Effect of MCM09, an active site-directed inhibitor of factor Xa, on B16-BL6

melanoma lung colonies in mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006; 4:608-613.

RUDROFF C.; SEIBOLD S.; KAUFMANN R.; ZETINA CC.; REISE K.; SCHÄFER U.; SCHNEIDER A.; BROCKMANN M.; SCHEELE J. and NEUGEBAUER EA. Expression of the thrombin receptor PAR-1 correlates with tumour cell differentiation of pancreatic adenocarcinoma in vitro. *Clin Exp Metastasis*. 2002; 19(2):181-9.

SALAH Z.; MAOZ M.; POKROY E.; LOTEM M.; BAR-SHAVIT R.; UZIELY B. Protease-activated receptor-1 (hPar1), a survival factor eliciting tumor progression. *Mol Cancer Res*. 2007; 5:229-240.

SARKER KP.; BISWAS KK.; YAMAJI K.; YAMAKUCHI M.; HASHIGUCHI T.; LEE KY.; MARUYAMA I. Inhibition of thrombin-induced vascular endothelial growth factor production in human neuroblastoma (NB-1) cells by argatroban. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2005; 34:41-47.

SCHAFFNER F, RUF W. Tissue factor and PAR2 signaling in the tumor microenvironment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol. Review*. 2009; 29:1999-2004.

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

SHI X., GANGADHARAN B., BRASS L.F., RUF W., MUELLER B.M. Protease-activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis. *Mol Cancer Res*. 2004; 2:395-402.

SHIBATA K.; YADA K.; MATSUMOTO T.; SASAKI A.; OHTA M. and KITANO S. Protease-activating-receptor-2 is frequently expressed in papillary adenocarcinoma of the gallbladder. *Oncol Rep*. 2004 12:1013-1016.

SØRENSEN H.T.; JOHNSEN S.P.; NØRGÅRD B.; ZACHARSKI L.R.; BARON J.A. Cancer and venous thromboembolism: a multidisciplinary approach. *Clin Lab*. 2003; 49:615-623.

TELLEZ C.; BAR-ELI M. Role and regulation of the thrombin receptor (PAR-1) in human melanoma. *Oncogene*. 2003; 22:3130-3137.

**VAN KEMPEN, L.C.; RUITER, D.J.; VAN MUIJEN, G.N.;**

**COUSSENS, L.M. The tumour microenvironment: a critical**

**determinant of neoplastic evolution. *Eur. J. Cell. Biol.* 2003;**

**82:539-548.**

**VERSTEEG H.H.; SCHAFFNER F.; KERVER M.; PETERSEN H.H.; AHAMED J.; FELDING-HABERMANN B.; TAKADA Y.; MUELLER B.M.; RUF W.**  
**Inhibition of tissue factor signaling suppresses tumor growth. *Blood*. 2008; 111:190-9.**

WANG X.; WANG M.; AMARZGUIOUI M.; LIU F.; FODSTAD O.; PRYDZ H. Downregulation of tissue factor by RNA interference in human melanoma LOX-L cells reduces pulmonary metastasis in nude mice. *Int J Cancer*, 2004; 112:994-1002.

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

YAMAHATA H., TAKESHIMA H., KURATSU J., SARKER K.P., TANIOKA K., WAKIMARU N., NAKATA M., KITAJIMA I., MARUYAMA I. The role of thrombin in the neo-vascularization of malignant gliomas: an intrinsic modulator for the up-regulation of vascular endothelial growth factor. *Int J Oncol*. 2002; 20:921-928.

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

YU J.L.; MAY L.; KLEMENT P.; WEITZ J.I.; RAK J. Oncogenes as regulators of tissue factor expression in cancer: implications for tumor angiogenesis and anti-cancer therapy. *Semin Thromb Hemost. Review*. 2004; 30:21-30.

YU J.L.; MAY L.; LHOTAK V.; SHAHRZAD S.; SHIRASAWA S.; WEITZ J.I.; COOMBER B.L.; MACKMAN N.; RAK J.W. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood*. 2005;105:1734-1741.

YU J.L.; MAY L.; MILSOM C. ANDERSON G.M., WEITZ J.L., LUYENDYK J.O., BROZE G. MACKMAN N., RAK J. Contribution of host-derived tissue factor to tumor neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28:1975-1981.

ZACHARSKI LR. Malignancy as a solid-phase coagulopathy: implications for the etiology, pathogenesis, and treatment of cancer. *Semin Thromb Hemost*. 2003; 29:239-46.



ZANIA P.; KRITIKOU S.; FLORDELLIS C. S.; MARAGOUDAKIS M. E. and TSOPANOGLU N. E. Blockade of angiogenesis by small molecule antagonists to protease-activated receptor-1: association with endothelial cell growth suppression and induction of apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 318:246-254.

ZHANG Y.; DENG Y.; LUTHER T.; MÜLLER M.; ZIEGLER R.,; WALDHERR R.; STERN D.M.; NAWROTH P.P. Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest.* 1994; 94:1320-1327.

## *8. Anexo 1*

# Simultaneous tissue factor expression and phosphatidylserine exposure account for the highly procoagulant pattern of melanoma cell lines

Clarice Kirszberg<sup>a,b</sup>, Luize G. Lima<sup>a</sup>, Andreia Da Silva de Oliveira<sup>a</sup>, William Pickering<sup>b</sup>, Elaine Gray<sup>b</sup>, Trevor W. Barrowcliffe<sup>b</sup>, Vivian M. Rumjanek<sup>a</sup> and Robson Q. Monteiro<sup>a</sup>

A correlation between cancer and hypercoagulability has been described for more than a century. Patients with cancer are at increased risk for thrombotic complications, and the clotting initiator protein, tissue factor (TF), is possibly involved in this process. In addition to TF, the presence of negatively charged phospholipids, particularly phosphatidylserine (PS), is necessary to support some of the blood-clotting reactions. There are few reports describing PS exposure by tumor cells. In this study, we characterized the procoagulant properties of the murine B16F10 and the human WM-266-4 melanoma cell lines. Flow cytometry analyses showed constitutive TF expression by both cell lines, in contrast to negative staining observed for the nontumorigenic melanocyte lineage, melan-A. In addition, tumor cells accelerate plasma clotting in a number-dependent manner. For WM-266-4, this ability was partially reversed by an anti-TF antibody but not by aprotinin, a nonspecific serine-protease inhibitor. Furthermore, flow-cytometric analyses showed the presence of PS at the outer leaflet of both cell lines. This phenomenon was determinant for the assembly of the intrinsic tenase (FIXa/FVIIIa) and prothrombinase (FXa/FVa) complexes, resulting in the activation of FX to FXa and prothrombin to thrombin, respectively. As a result,

incubation of WM-266-4 with human plasma produces robust thrombin generation. In conclusion, simultaneous TF expression and PS exposure are responsible for the highly procoagulant pattern of the aggressive melanoma cell lines B16F10 and WM-266-4. Therefore, these cell lines might be regarded as useful models for studying the role of blood coagulation proteins in tumor biology. *Melanoma Res* 19:301–308 © 2009 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

*Melanoma Research* 2009, 19:301–308

**Keywords:** blood clotting, melanoma, phosphatidylserine, thrombin, tissue factor procoagulant

<sup>a</sup>Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil and <sup>b</sup>Biotherapeutics Group, National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, Hertfordshire, UK

Correspondence to Professor Robson Q. Monteiro, PhD, Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Avenida Carlos Chagas Filho 373, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro 21941–590, Brazil  
Tel: +55 21 2562 6782; fax: +55 21 2270 8647;  
e-mail: robsonqm@bioqmed.ufrj.br

Received 10 November 2008 Accepted 14 May 2009

## Introduction

A correlation between cancer and hypercoagulability has long been recognized; this association is referred to as Trousseau's syndrome [1,2]. In fact, blood-clotting abnormalities are detected in up to 90% of patients with metastatic disease, and thrombosis represents the second most frequent cause of cancer-related mortality [1,3,4]. A number of studies correlate this prothrombotic state with a poor prognosis [5,6].

Among the mechanisms that have been proposed to explain blood-clotting activation in cancer, expression of the clotting initiator, tissue factor (TF), by tumor cells seems to be of utmost importance [7]. TF is a 47-kDa transmembrane protein that triggers blood clotting by forming a binary complex with plasma factor VIIa (FVIIa) [8]. Under physiological conditions, activated platelets sustain some of the subsequent coagulation reactions through the exposure of negatively charged phospholipids,

in particular phosphatidylserine (PS) [9]. In this context, some earlier studies have shown that unperturbed tumor cells may expose PS, thus supporting membrane-dependent coagulation reactions [10–12].

Several lines of evidence show that blood-clotting activation is intimately related to tumor progression and metastasis [13,14]. In fact, coagulation enzymes allow the activation of G-protein-coupled protease-activated receptors (PARs) in both tumor and host cells, thus eliciting the production of several protumoral factors, including cytokines, angiogenic factors, and metalloproteases among others [15,16].

Melanoma, the most common fatal form of skin cancer, is an aggressive, therapy-resistant malignancy of melanocytes that represents a significant public health burden, as its incidence is rising in all Caucasian populations worldwide [17]. The prognosis of patients diagnosed with

metastatic melanoma is very poor, with a limited number of agents available for its treatment [18]. Several lines of evidence indicate a key role for blood-clotting activation in melanoma growth and metastasis [19–21]. In this context, a perfect understanding of how tumor cells activate blood coagulation has implications that could be extremely useful for the development of new therapeutic approaches [22]. Here, we show that simultaneous TF expression and PS exposure are responsible for the highly procoagulant pattern of the aggressive melanoma cell lines B16F10 and WM-266-4. These data may explain the extravascular activation of blood clotting, an event that might be critical for tumor progression. Therefore, these cell lines might be regarded as tools for studying the role of blood-clotting proteins in melanoma biology.

## Materials and methods

### Reagents

The following reagents were from NIBSC (Potters Bar, Hertfordshire, UK): factors FVIII (human recombinant; 96/598); FIXa (human recombinant; 97/562); and human FX (92/568). Human FVa, Fxa, and prothrombin were from the Hematologic Technologies Inc. (Essex Junction, Vermont, USA). Chromogenic substrates for FXa (S-2765, N- $\alpha$  benzyloxycarbonyl D-Arg-Gly-Arg-p-nitroanilide) and thrombin (S-2238, H-D-phenylalanyl-L-pipecolyl-L-arginine-p-nitroaniline dihydrochloride) were purchased from the Chromogenix AB (Molndal, Sweden). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), human placental annexin-V, and Ancrod were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA).

### Cell culture

The nontumorigenic murine melanocyte lineage, melan-A [23], a kind gift of Dr Roger Chammas (Faculty of Medicine, São Paulo University, São Paulo, Brazil), was cultured in the Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; GibcoBRL, Gaithersburg, Maryland, USA) containing 10% fetal bovine serum (FBS; GibcoBRL) and supplemented with 2.4 g/l 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 3.7 g/l sodium bicarbonate, 125 mg/l sodium dihydrogen phosphate, 110 mg/l sodium pyruvate, 100 000 U/l penicillin, 100 mg/l streptomycin, 2 mmol/l L-glutamine, 55  $\mu$ mol/l  $\beta$ -mercaptoethanol, and 200 nmol/l 12-*O*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (PMA; Sigma Chemical Co.) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Melan-A cells were detached with Hank's solution containing 10 mmol/l HEPES and 0.2 mmol/l EDTA, spun at 350g for 7 min, resuspended in DMEM containing 10% FBS (supplemented as described earlier) and transferred to another culture flask. The murine melanoma cell line, B16F10, was grown at 37°C in a humidified, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in culture flasks by subconfluent passages in the RPMI 1640 medium (GibcoBRL) supplemented with 2 mmol/l L-glutamine and 20 mmol/l HEPES. Subconfluent tumor cells were detached upon a brief exposure to a 0.25%

trypsin solution, resuspended in the RPMI 1640 medium, and transferred to another culture flask with the RPMI 1640 medium containing 10% FBS. The human melanoma cell line, WM-266-4, was grown at 37°C in a humidified, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in culture flasks by subconfluent passages in the MEM medium (Sigma Chemical Co.) supplemented with 2 mmol/l L-glutamine. Subconfluent tumor cells were washed twice with PBS, scraped and resuspended in the MEM medium containing 10% FBS.

### Flow cytometric analyses

WM-266-4 cells were resuspended in phosphate buffer containing 1% BSA and incubated for 30 min at 4°C with a phycoerythrin-conjugated monoclonal antibody against human TF (Becton-Dickinson, BD, Biosciences, San Jose, California, USA). After washing to remove unbound antibody, cells were analyzed using a FACScalibur (BD Biosciences). Data were analyzed by the software BD CellQuest 3.3 (BD Biosciences). Murine cells were resuspended in phosphate buffer containing 2% normal murine serum, incubated for 30 min at 4°C with a rabbit polyclonal anti-murine TF (4515; American Diagnostica, Greenwich, Connecticut, USA) or a control isotype normal rabbit IgG (sc-2027; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA), and fixed in 1% paraformaldehyde. Cells were then incubated with a biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG (81-6140; Zymed, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) for 30 min at 4°C, and finally analyzed using phycoerythrin-conjugated streptavidin (554061; Pharmingen, BD Biosciences). Expression of PS on the tumorigenic cell lines was measured by incubating the cells with a monoclonal anti-PS antibody (05-719; Upstate, Charlottesville, Virginia, USA) for 30 min at 4°C. After washing, cells were incubated with phycoerythrin-conjugated anti-murine IgG antibody (Upstate) and kept in the dark. Cells were resuspended in 300  $\mu$ l of PBS before the analysis. The mean channel fluorescence intensity of 10 000 events was determined for each sample. Control reactions performed in the absence of primary anti-PS or in the presence of a primary control isotype produced similar negative results for cell staining.

### Tissue factor activity assay

TF activity was measured by a clotting assay using human or murine platelet-poor plasma. One hundred microliters of cell suspension were added to 100  $\mu$ l of platelet-poor plasma. After 2-min incubation at 37°C, 100  $\mu$ l CaCl<sub>2</sub> (25 mmol/l) was added and the clotting times were recorded on a KC-4 coagulometer (Amelung Ltd., Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain). In some cases, cells were preincubated for 5 min with 10  $\mu$ g/ml (final concentration) of a neutralizing anti-human TF antibody (4509; American Diagnostica) or 1000 IU (final concentration) of aprotinin (Sigma Chemical Co.).

### RNA isolation and reverse transcriptase polymerase chain reaction

RNA was isolated from B16F10 or melan-A cells ( $2.5 \times 10^5$ ) using the Trizol reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Total RNA (1  $\mu$ g) was reversely transcribed into cDNA using cDNA Archive (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. An aliquot of the reaction mixture was further used for polymerase chain reaction (PCR) amplification. Primers used were: TF (forward: 5'-CCTCGGACAGCCAGTAATTC-3' and reverse: 5'-GTGTGAGCGTTAGCGGCTTC-3') and  $\beta$ -actin (forward: 5'-ACACCCGC CACCAGTTCGCC-3' and reverse: 5'-GCACAGTGTGGGTGACCCCGTCTC-3'). Thermocycling conditions were as follows: 35 cycles of 95°C for 30 s (denaturation), 55°C for 45 s (annealing), and 72°C for 45 s (extension). PCR products were separated by 1% agarose gel electrophoresis and further stained with ethidium bromide.

### FXa generation assay

FXa generation assays were performed at 37°C as follows: cells were mixed to give final concentrations of 1.0 IU/ml FIXa, 1.0 IU/ml FVIII, and 0.5 IU/ml FX, and warmed to 37°C. FXa generation was initiated by addition of 25 mmol/l CaCl<sub>2</sub>. At various times, 25  $\mu$ l of the mixture were sampled and added to 50  $\mu$ l of stop buffer (50 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, 50 mmol/l EDTA, pH 7.4). FXa concentration was then estimated by adding the chromogenic substrate, S-2765 (0.5 mmol/l). The reaction in each well was stopped after 3 min at 37°C by the addition of 50  $\mu$ l 50% acetic acid, and optical densities at 405 nm were converted to FXa concentrations using a standard curve. Control reactions were carried out in the absence of cells. In some cases, cells were preincubated with annexin-V for 5 min before the addition of the coagulation factors.

### Prothrombinase chromogenic assay

Activation of prothrombin was performed at 37°C as follows: the RPMI 1640 medium was removed and cells were incubated for 5 min with 0.1 nmol/l FXa/1 nmol/l FVa (final concentrations) in 50 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, 0.02% NaN<sub>2</sub>, 1% human albumin, and 25 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4. Reaction was started by addition of 1  $\mu$ mol/l prothrombin (final concentration) and aliquots of 10  $\mu$ l were removed every 2 min into microplate wells containing 25  $\mu$ l of 50 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, 50 mmol/l EDTA, pH 7.4. After the addition of 50  $\mu$ l of 1 mmol/l S-2238, the absorbance at 405 nm was recorded at 37°C for 6 min at 6-s intervals using a Thermomax Microplate Reader (Molecular Devices, Menlo Park, California, USA). Velocities (mOD/min) obtained in the first minutes of reaction were used to calculate the amount of thrombin formed. Control reactions were carried out in the absence of cells. In some cases, cells were preincubated with annexin-V for 5 min before addition of the coagulation factors.

### Thrombin generation in plasma

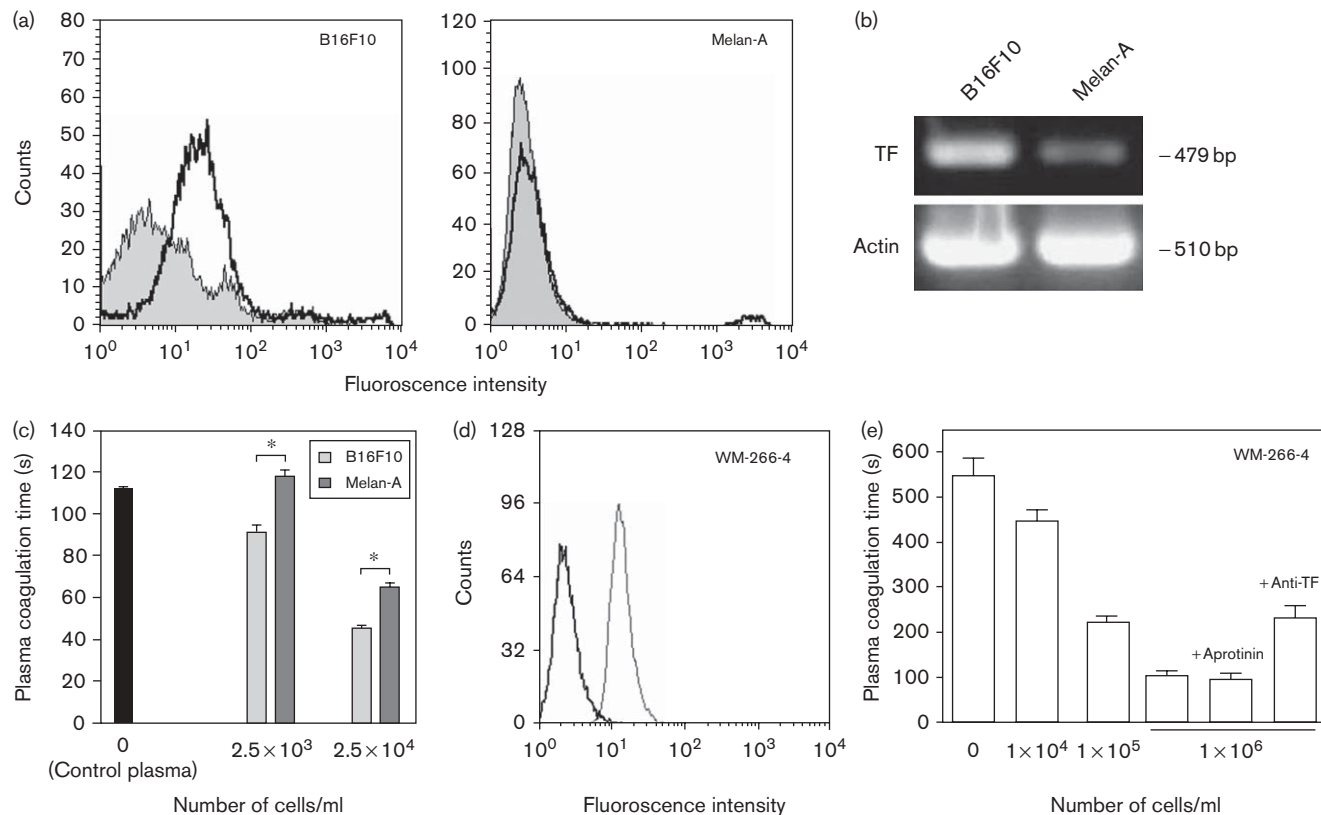
Assays were performed using human plasma defibrinated with Ancrod (0.5 U/ml) for 30 min. Defibrinated plasma was mixed with FIXa (1 IU/ml, final concentration), incubated for 90 s at 37°C, then mixed with tumor cells and incubated for 120 s at 37°C. The reaction was started by the addition of 100 mmol/l CaCl<sub>2</sub>. At various times, 10  $\mu$ l of the mixture were sampled and added to 140  $\mu$ l of stopping buffer. Thrombin levels were then estimated by adding the chromogenic substrate, 1 mmol/l S-2238. The reaction in each well was stopped after 3 min at 37°C by the addition of 50  $\mu$ l 50% acetic acid, and optical densities at 405 nm were converted to thrombin concentrations from a dilution curve of a thrombin preparation.

### Results

Earlier studies showed that a number of melanoma cell lines express the clotting initiator protein, TF [19,20,24]. Remarkably, TF expression seems to correlate with the cell-line aggressiveness [19]. Accordingly, Fig. 1a shows that B16F10 cells express TF, as shown by flow cytometric analysis, whereas under identical assay conditions, no staining was observed for the nontumorigenic melanocyte lineage, melan-A. Differences in TF expression were corroborated by reverse transcriptase-PCR analyses (Fig. 1b) and plasma-clotting assays (Fig. 1c). B16F10 cells shortened the clotting time in a cell-number-dependent manner, this effect being more prominent than that observed for melan-A (Fig. 1c). As observed with the murine tumor cell line, WM-266-4 cells were also positive for TF (Fig. 1d). In addition, human melanoma cells accelerated plasma coagulation in a number-dependent manner (Fig. 1e). This ability was partially reversed by an anti-human TF antibody but not by the nonspecific serine-protease inhibitor aprotinin (Fig. 1e), confirming that the procoagulant activity of WM-266-4 derives, at least in part, from TF expression. Interestingly, the anti-human TF antibody did not influence the procoagulant activity of B16F10 cells (data not shown), which can be explained by structural differences between the murine and the human protein [25].

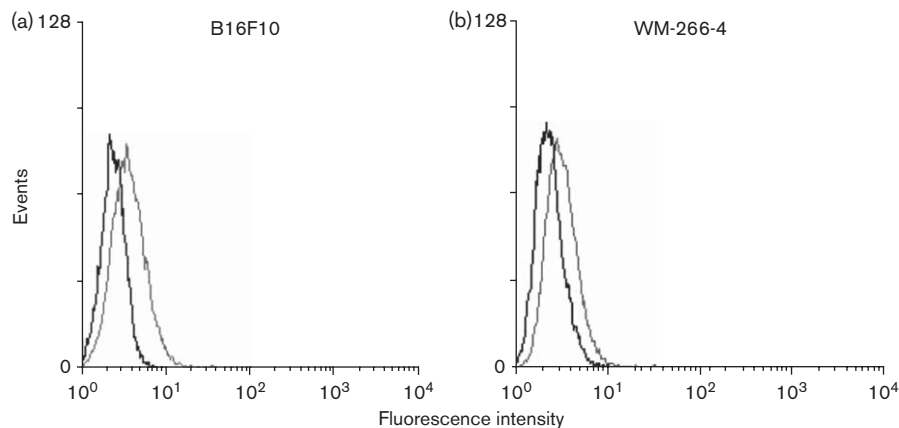
Earlier studies showed that tumor cells may expose negatively charged phospholipids, in particular PS, at the outer leaflet of their membranes [10–12]. Therefore, exposure of PS on B16F10 (Fig. 2a) and WM-266-4 (Fig. 2b) cell surfaces was shown by flow cytometry using an anti-PS antibody. Surface exposure of negatively charged phospholipids is a critical step for the assembly of membrane-dependent coagulant complexes, including the intrinsic tenase (FIXa, FVIIIa, phospholipids). Further examination of intrinsic tenase complex assembly on melanoma cells showed that both B16F10 (Fig. 3a) and WM-266-4 (Fig. 3b) efficiently increased the activation of FX into FXa by FIXa/FVIIIa. Control

**Fig. 1**



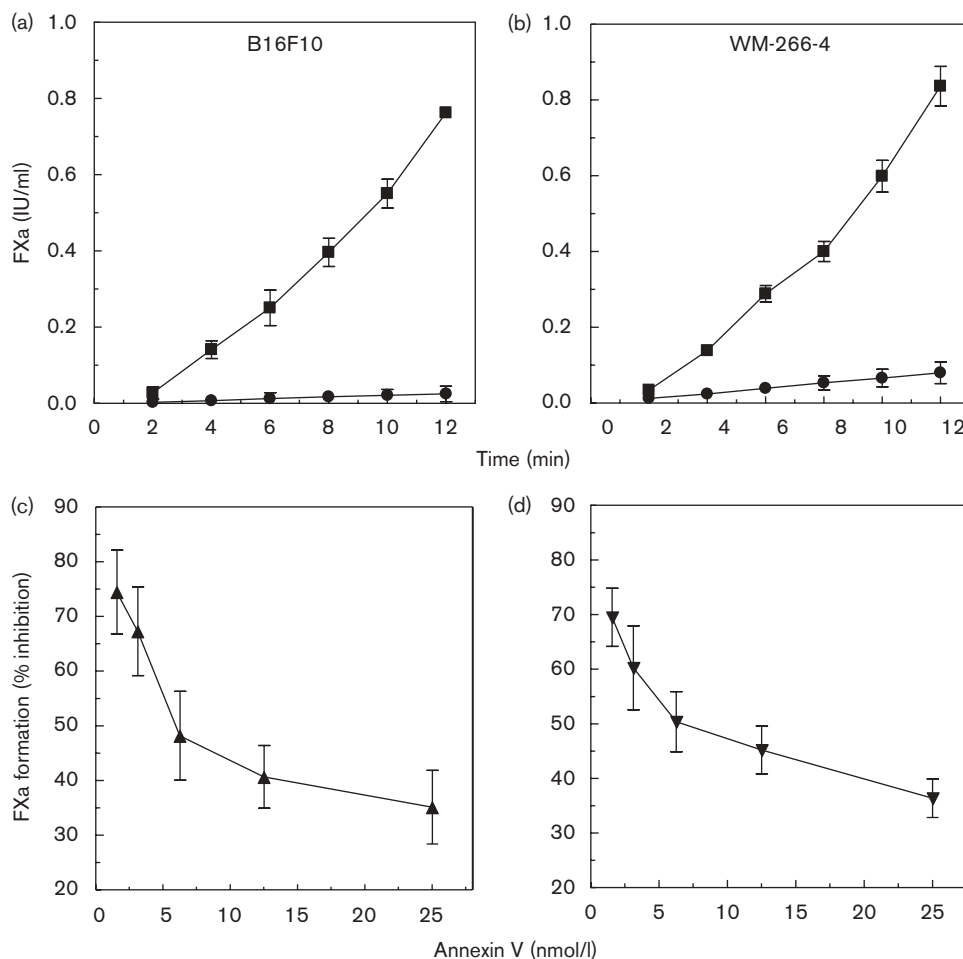
B16F10 and WM-266-4 melanoma cells express functional tissue factor (TF). (a) Flow-cytometric analysis of TF expression in B16F10 or melan-A. Solid lines represent staining with polyclonal anti-murine TF antibody followed by biotin-conjugated secondary antibody and phycoerythrin-conjugated streptavidin. Gray region represents staining with control isotype IgG. (b) Reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR) analysis of TF gene expression in B16F10 and melan-A cells. Assay was performed as described in the Materials and methods. (c) Procoagulant activity of B16F10 and melan-A cells. Assay was performed using murine plasma, as described in the Materials and methods.  $*P < 0.001$ . (d) Flow-cytometric analysis of TF expression in WM-266-4 cells. Gray line represents staining with monoclonal anti-human TF antibody labeled with phycoerythrin. Black line represents control cells with no staining. (e) Procoagulant activity of WM-266-4 cells. Assay was performed using human plasma, as described in the Materials and methods. In some cases, cells were preincubated for 5 min with a neutralizing anti-TF antibody ( $10 \mu\text{g/ml}$ , final concentration) or aprotinin (1000 IU, final concentration). Each point represents mean  $\pm$  SD of three assays.

**Fig. 2**



Detection of phosphatidylserine (PS) exposure on (a) B16F10 and (b) WM-266-4 melanoma cells. Gray line represents staining with monoclonal anti-PS antibody followed by phycoerythrin-labeled secondary antibody. Black line represents staining with phycoerythrin-labeled secondary antibody in the absence of the anti-PS.

Fig. 3



Assembly of intrinsic tenase complex on melanoma cells. Kinetics for the activation of FX (0.5 IU/ml) in the presence of FIXa (1 IU/ml), FVIIIa (1 IU/ml) and (a) B16F10 (■,  $1 \times 10^5$  cells/ml) or (b) WM-266-4 cells (■,  $1 \times 10^5$  cells/ml). Control reactions (●) were performed in the absence of cells. Inhibitory effect of annexin-V on FX activation by (c) WM-266-4 or (d) B16F10 cells. Tumor cells ( $1 \times 10^5$  cells/ml) were incubated with annexin-V (0–25 nmol/l) for 5 min before the addition of FIXa (1 IU/ml)/FVIIIa (1 IU/ml)/FX (0.5 IU/ml). FXa formed was determined after 14 min of reaction. Assay conditions and quantification of Xa are described in the Materials and methods. Each point represents mean  $\pm$  SD of three determinations.

reactions performed in the absence of cells showed no FXa formation. The PS dependence was confirmed by annexin-V, a protein that blocks PS-binding sites. Therefore, increasing annexin-V concentrations decreased the FX activation by FIXa/FVIIIa/B16F10 cells (Fig. 3c) and by FIXa/FVIIIa/WM-266-4 cells as well (Fig. 3d). Thus, PS-containing melanoma cells support the assembly of the intrinsic tenase complex.

We have earlier reported that B16F10 cells support the assembly of prothrombinase complex (FXa/FVa/phospholipids), thus promoting the conversion of prothrombin into thrombin [26]. In this study, we have extended this observation to WM-266-4 cells that strongly potentiated the thrombin formation by FXa/FVa (Fig. 4a). Control reactions performed in the absence of cells or in the absence of FVa showed no enzyme formation. In addition,

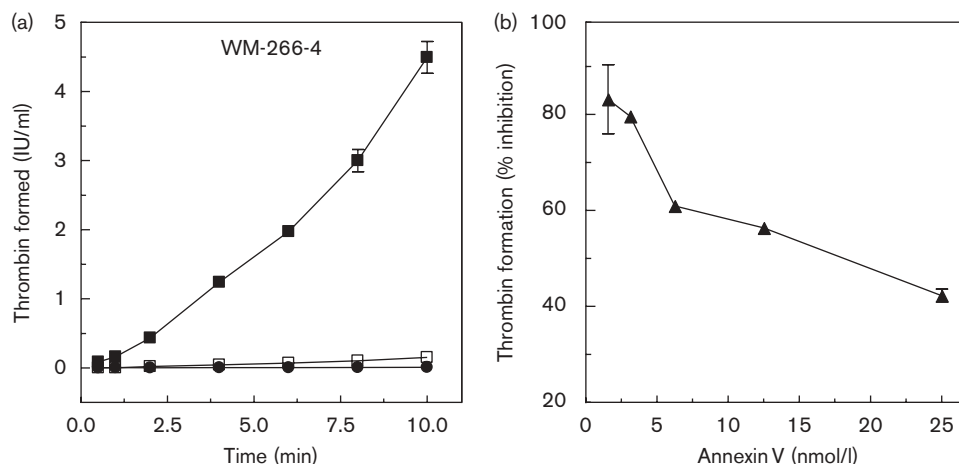
PS-dependence was confirmed by annexin-V, which decreased prothrombin activation in a dose-dependent manner (Fig. 4b).

Finally, we evaluated the effect of WM-266-4 cells on thrombin generation in defibrinated plasma. As shown in Fig. 5, the presence of human melanoma cells increased the thrombin formation substantially compared with control curves.

## Discussion

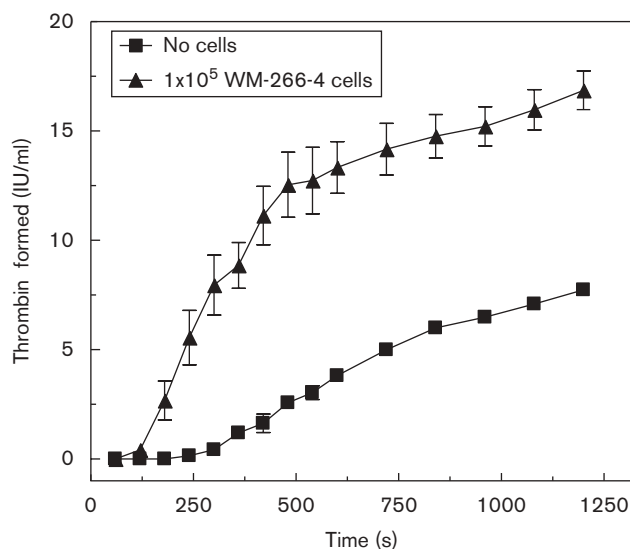
Activation of blood coagulation in cancer has been extensively demonstrated, and associated occurrence of thrombosis is often observed [1,4], particularly in pancreas, brain, stomach, esophagus, kidney, and ovary tumors [6]. In fact, Sørensen *et al.* [5] reported that

Fig. 4



Prothrombin activation by melanoma cells, as detected by S-2238 hydrolysis. (a) WM-266-4 cells ( $1 \times 10^5$  cells/ml) were incubated with FXa (1 nmol/l, final concentration) and prothrombin (1  $\mu$ mol/l, final concentration) in the absence ( $\square$ ) or in the presence ( $\blacksquare$ ) of FVa (1 nmol/l). (b) Inhibitory effect of annexin-V on prothrombin activation. WM-266-4 cells ( $1 \times 10^5$  cells/ml) were incubated with annexin-V (0–25 nmol/l) for 5 min before the addition of FXa (1 nmol/l)/FVa (1 nmol/l)/prothrombin (1  $\mu$ mol/l). Thrombin formed was determined after 10 min of reaction. Assay conditions and quantification of thrombin are described in the Materials and methods. Each point represents mean  $\pm$  SD of three determinations.

Fig. 5



Effect of WM-266-4 cells on thrombin generation in plasma. Human defibrinated plasma was mixed with FIXa (1 IU/ml, final concentration), incubated for 90 s at 37°C, then mixed with tumor cells or PBS and incubated for 120 s at 37°C. Thrombin generation was followed after the addition of  $\text{CaCl}_2$  (10 mmol/l, final concentration) using a discontinuous assay described in the Materials and methods. Curves show thrombin formed in plasma incubated in the absence ( $\blacksquare$ ) or in the presence ( $\blacktriangle$ ) of  $5 \times 10^5$  WM-266-4 cells/ml. Each point represents mean  $\pm$  SD of three determinations.

patients with cancer who developed venous thromboembolism at or around the time of cancer diagnosis had reduced survival compared with a paired group that did

not develop thrombosis. The frequency of thrombosis in melanoma is relatively low (0.5% in Ref. [6]). However, it is reported that coagulation activation markers are found in a large number of cancer patients despite the absence of thrombotic complications [4].

Several lines of evidence indicate that the procoagulant properties of melanoma cells play a significant role in tumor biology [19–21]. In this study, we showed that the murine B16F10 and the human WM-266-4 melanoma cell lines display potent procoagulant activity; in part, as a result of constitutive expression of the clotting initiator protein TF. The role of TF in tumor progression is not completely understood [14]. TF expression levels have been correlated with vascular endothelial growth factor production in melanoma [27] and with in-vivo growth of colorectal tumor cells [28]. In contrast, deficiency of TF had low impact on in-vivo tumor growth and angiogenesis of fibrosarcoma cells [29].

In contrast to its role in primary growth, it seems clear that TF is involved in tumor metastasis. In fact, a number of hemostatic factors, including platelets and coagulation proteins, determine the metastatic potential of tumor cells [29]. In this regard, thrombin seems to be determinant. Thrombin activates tumor cell adhesion to platelets, endothelial cells, and subendothelial matrix proteins; enhances tumor cell growth; increases tumor cell seeding and spontaneous metastasis; and stimulates tumor cell angiogenesis (reviewed in Ref. [30]). In this context, we herein show that B16F10 and WM-266-4 melanoma cells expose



PS on their surfaces. The presence of PS is essential for the assembly of coagulation complexes leading to robust thrombin formation.

Simultaneous TF expression and PS exposure by melanoma, as well as in other tumor types [31], may explain the efficient extravascular activation of coagulation, as evidenced by fibrin deposition in tumor stroma [32,33]. Most importantly, our in-vitro data correlate with earlier immunoaffinity ligand binding studies that have shown the presence of activated factor Xa [34] and thrombin [35] in human melanoma tissues. In fact, generation of clotting enzymes in the tumor micro-environment supports the activation of PARs [15,16]. In this context, expression of thrombin receptor PAR-1 is important for melanoma progression [36] and correlates with tumor aggressiveness in patients [37].

Given the importance of coagulation activation in cancer, it has been proposed that anticoagulant therapies could exert beneficial effects beyond the management of the procoagulant state [22]. Earlier reports confirm the clinical feasibility of this approach, demonstrating both safety and possible efficacy [38–40]. Moreover, experimental molecules targeting FXa or thrombin have been shown to exert potent antimetastatic effects in animal models of melanoma [41,42]. In this context, molecules displaying more complex anticoagulant mechanisms of action, such as bothrojaracin that binds to prothrombin [43] or ixolaris that recognizes FX in plasma [44], might be potential antitumor agents.

## Acknowledgements

This research was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro Carlos Chagas Filho (FAPERJ). The authors declare no competing financial interests.

## References

- Rickles FR, Edwards RL. Activation of blood coagulation in cancer: Trousseau's syndrome revisited. *Blood* 1983; **62**:14–31.
- Varki A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood* 2007; **110**:1723–1729.
- Donati MB. Cancer and thrombosis: from phlegmasia alba dolens to transgenic mice. *Thromb Haemost* 1995; **74**:278–281.
- Lip GY, Chin BS, Blann AD. Cancer and the prothrombotic state. *Lancet Oncol* 2002; **3**:27–34.
- Sørensen HT, Johnsen SP, Nørgård B, Zacharski LR, Baron JA. Cancer and venous thromboembolism: a multidisciplinary approach. *Clin Lab* 2003; **49**:615–623.
- White RH, Chew H, Wun T. Targeting patients for anticoagulant prophylaxis trials in patients with cancer: who is at highest risk? *Thromb Res* 2007; **120** (Suppl 2):S29–S40.
- Rickles FR, Falanga A. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thromb Res* 2001; **102**:V215–V224.
- Gomez K, McVey JH. Tissue factor initiated blood coagulation. *Front Biosci* 2006; **11**:1349–1359.
- Lentz BR. Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog Lipid Res* 2003; **42**:423–438.
- Connor J, Bucana C, Fidler IJ, Schroit AJ. Differentiation-dependent expression of phosphatidylserine in mammalian plasma membranes: quantitative assessment of outer-leaflet lipid by prothrombinase complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**:3184–3188.
- Barrowcliffe TW, Fábregas P, Jardi M, Cancelas J, Rabaneda M, Felez J. Procoagulant activity of T lymphoblastoid cells due to exposure of negatively charged phospholipid. *Thromb Haemost* 2002; **87**:442–449.
- Pickering W, Gray E, Goodall AH, Ran S, Thorpe PE, Barrowcliffe TW. Characterization of the cell-surface procoagulant activity of T-lymphoblastoid cell lines. *J Thromb Haemost* 2004; **2**:459–467.
- Chen J, Bierhaus A, Schiekofler S, Andrassy M, Chen B, Stern DM, Nawroth PP. Tissue factor- $\alpha$  receptor involved in the control of cellular properties, including angiogenesis. *Thromb Haemost* 2001; **86**:334–345.
- Rak J, Milsom C, May L, Klement P, Yu J. Tissue factor in cancer and angiogenesis: the molecular link between genetic tumor progression, tumor neovascularization, and cancer coagulopathy. *Semin Thromb Hemost* 2006; **32**:54–70.
- Rao LV, Pendurthi UR. Tissue factor-factor VIIa signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**:47–56.
- Belting M, Ahamed J, Ruf W. Signaling of the tissue factor coagulation pathway in angiogenesis and cancer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**:1545–1550.
- Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, et al. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc* 2007; **82**:364–380.
- Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, et al. Malignant melanoma in the 21st century, part 2: staging, prognosis, and treatment. *Mayo Clin Proc* 2007; **82**:490–513.
- Mueller BM, Reisfeld RA, Edgington TS, Ruf W. Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**:11832–11836.
- Bromberg ME, Konigsberg WH, Madison JF, Pawashe A, Garen A. Tissue factor promotes melanoma metastasis by a pathway independent of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**:8205–8209.
- Im JH, Fu W, Wang H, Bhatia SK, Hammer DA, Kowalska MA, et al. Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. *Cancer Res* 2004; **64**:8613–8619.
- Ornstein DL, Zacharski LR. Treatment of cancer with anticoagulants: rationale in the treatment of melanoma. *Int J Hematol* 2001; **73**:157–161.
- Bennett DC, Cooper PJ, Hart IR. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Int J Cancer* 1987; **39**:414–418.
- Geaquinto DL, Fernandes RS, Lima LG, Barja-Fidalgo C, Monteiro RQ. Procoagulant properties of human MV3 melanoma cells. *Braz J Med Biol Res* 2008; **41**:99–105.
- Petersen LC, Nørby PL, Branner S, Sørensen BB, Elm T, Stennicke HR, et al. Characterization of recombinant murine factor VIIa and recombinant murine tissue factor: a human-murine species compatibility study. *Thromb Res* 2005; **116**:75–85.
- Kirszberg C, Rumjanek VM, Monteiro RQ. Assembly and regulation of prothrombinase complex on B16F10 melanoma cells. *Thromb Res* 2005; **115**:123–129.
- Abe K, Shoji M, Chen J, Bierhaus A, Danave I, Micko C, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**:8663–8668.
- Yu JL, May L, Lhotak V, Shahzad S, Shirasawa S, Weitz JI, et al. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood* 2005; **105**:1734–1741.
- Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, et al. Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms. *Blood* 2007; **110**:133–141.
- Nierodzik ML, Karpatkin S. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell* 2006; **10**:355–362.
- Fernandes RS, Kirszberg C, Rumjanek VM, Monteiro RQ. On the molecular mechanisms for the highly procoagulant pattern of C6 glioma cells. *J Thromb Haemost* 2006; **4**:1546–1552.
- Dvorak HF, Senger DR, Dvorak AM. Fibrin as a component of the tumor stroma: origins and biological significance. *Cancer Metastasis Rev* 1983; **2**:41–73.

- 33 Wojtukiewicz MZ, Zacharski LR, Memoli VA, Kisiel W, Kudryk BJ, Rousseau SM, Stump DC. Malignant melanoma. Interaction with coagulation and fibrinolysis pathways in situ. *Am J Clin Pathol* 1990; **93**:516–521.
- 34 Zacharski LR, Dunwiddie C, Nutt EM, Hunt J, Memoli VA. Cellular localization of activated factor X by Xa-specific probes. *Thromb Haemost* 1991; **65**:545–548.
- 35 Zacharski LR, Memoli VA, Morain WD, Schlaeppli JM, Rousseau SM. Cellular localization of enzymatically active thrombin in intact human tissues by hirudin binding. *Thromb Haemost* 1995; **73**:793–797.
- 36 Tellez C, Bar-Eli M. Role and regulation of the thrombin receptor (PAR-1) in human melanoma. *Oncogene* 2003; **22**:3130–3137.
- 37 Depasquale I, Thompson WD. Prognosis in human melanoma: PAR-1 expression is superior to other coagulation components and VEGF. *Histopathology* 2008; **52**:500–509.
- 38 Wojtukiewicz MZ, Kozlowski L, Ostrowska K, Dmitruk A, Zacharski LR. Low molecular weight heparin treatment for malignant melanoma: a pilot clinical trial. *Thromb Haemost* 2003; **89**:405–407.
- 39 Sampsel JW, Macivor M, Barbera-Guillem E. Cure of metastatic melanoma with surgery, low-dose methotrexate and heparin: a case report. *Melanoma Res* 2004; **14**:425.
- 40 Lindemann W, Richter S, Schilling MK. Hirudin-based anticoagulant strategy during isolated limb perfusion in a patient with heparin-induced thrombocytopenia. *Melanoma Res* 2005; **15**:287–290.
- 41 Donnelly KM, Bromberg ME, Milstone A, Madison-McNiff JM, Terwilliger G, Konigsberg WH, Cappello M. Ancylostoma caninum anticoagulant peptide blocks metastasis in vivo and inhibits factor Xa binding to melanoma cells in vitro. *Thromb Haemost* 1998; **79**:1041–1047.
- 42 Esumi N, Fan D, Fidler IJ. Inhibition of murine melanoma experimental metastasis by recombinant desulfatohirudin, a highly specific thrombin inhibitor. *Cancer Res* 1991; **51**:4549–4556.
- 43 Zingali RB, Bianconi ML, Monteiro RQ. Interaction of bothrojaracin with prothrombin. *Haemostasis* 2001; **31**:273–278.
- 44 Nazareth RA, Tomaz LS, Ortiz-Costa S, Atella GC, Ribeiro JM, Francischetti IM, Monteiro RQ. Antithrombotic properties of Ixolaris, a potent inhibitor of the extrinsic pathway of the coagulation cascade. *Thromb Haemost* 2006; **96**:7–13.

## CURRICULUM VITAE

Nome: Andreia da Silva de Oliveira

Nasc.:19/04/1979

Naturalidade: Rio de Janeiro

### Formação Acadêmica

1. Ciências Biológicas – Modalidade Médica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. De 07/2004 a 12/2007.
2. Mestrado em Química Biológica no Instituto de Bioquímica Médica na Universidade Federal do Rio de Janeiro. De 04/2008 a 05/2010.

### Comunicação em Congresso

1. 7 comunicações em congressos nacionais
2. 2 comunicações em congressos internacionais

### Publicações

1. KIRSZBERG C, LIMA, L.G., DA SILVA DE OLIVEIRA, A., ZINGALI, R., W, P., GRAY E, BARROWCLIFFE TW, RUMJANEK, V. M. B. D, MONTEIRO, R.Q. Simultaneous tissue factor expression and phosphatidylserine exposure account for the highly procoagulant pattern of melanoma cell lines. *Melanoma Research.* , v.19, p.301 - 308, 2009.
2. RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; DA SILVA DE OLIVEIRA, A.; AMOEDO, N.; AFFONSO-MITIDIERI, O. R.; RUMJANEK, F.; RUMJANEK, V. Modulation of Immune System by Oubain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008.

# 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](#)