

**O MICROAMBIENTE TUMORAL COMO ALVO  
TERAPÊUTICO: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE  
ANTAGONISTAS DO RECEPTOR DE BRADICININA  
TIPO 1 EM MELANOMA MURINO**

**PATRÍCIA LUIZA NUNES DA COSTA**

**Tese de doutorado apresentada a Fundação Antônio  
Prudente para obtenção do Título de Doutor em  
Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientador: Prof. Dr Roger Chammas**

**São Paulo**

**2009**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Médica, LIM24 – Oncologia Experimental, Departamento de Radiologia na Faculdade de Medicina da USP e no laboratório do Dr. Ian Tannock no Princess Margareth Hospital em Toronto no Canadá.

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese.

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente**

Costa, Patrícia Luiza Nunes

**O microambiente tumoral como alvo terapêutico: avaliação do efeito de antagonistas do receptor de bradicinina tipo 1 em melanoma murino /**  
Patrícia Luiza Nunes da Costa – São Paulo, 2009.

182p.

Tese (doutorado) Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Roger Chamas.

Descritores: 1. RECEPTOR DE BRADICININA. 2. MELANOMA. 3. QUIMIOTERAPIA 4. MICROAMBIENTE TUMORAL.

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Francisco e Zélia, a quem devo tudo e tenho amor eterno. Seus exemplos de simplicidade, bondade, força de vontade e honestidade me acompanharão por toda a vida.*

*Aos meus amores Erlandes e o pequeno Daniel, que transformaram a minha vida e me mostraram como é ser verdadeiramente feliz.*

## AGRADECIMENTOS

**“Se vós e vossos filhos passais bem e se vos sucedem todas as coisas como desejais, agradeço a Deus, em quem ponho minha esperança”.**

**II Macabeus 9, 20**

À Deus, que sempre esteve ao meu lado, cuidando de mim, me mostrando o caminho e acima de tudo me amando. Tudo que tenho e sou eu agradeço a Ele. E nesses 4 anos de doutorado a presença de Deus ficou especialmente visível na minha vida, graças a Sua misericórdia e amor.

Ao *Dr Roger Chammas* pelo prazer da convivência, pelas inúmeras oportunidades de aprendizado proporcionadas em diversas áreas do conhecimento, por saber reconhecer nossas aptidões individuais e estimulá-las, por nos incentivar a ir além. To *Dr Ian Tannock* for welcoming me in your lab in Canada and provide moments of great learning. Also for your willingness and sympathy.

Ao *Dr. Pierre Sirois* pela colaboração e fornecimento dos antagonistas R-954 e R-715, testados neste projeto. Ao Dr. *João Pesqueiro* por gentilmente ceder os animais nocautes para o gene BKR1. Ao Dr. *João B Calixto* e à *Dra. Adriana Abalen* pelas críticas, sugestões e acompanhamento do projeto.

**“Um dia você aprende que o importante não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida.**

**E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher”.**

*William Shakespeare.*

Ao meu amigo *Guilherme* por toda sua dedicação a mim. Pela sua amizade incondicional e incontáveis “helps”. A minha amiga *Renata*, pela doçura, pelo carinho e pela disponibilidade em ajudar sempre. A querida *Cláudia* pela colaboração no projeto e na vida, pela amizade e carinho.

À *Daniele Yumi* pelas análises estatísticas do microarray, pela simpatia e disponibilidade. Ao meu filho grande, *Fernando*, pela ajuda nos experimentos e agradável companhia.

Aos amigos do GACC (Grupo de Adesão Celular e Câncer) de hoje; *Tharcísio, Lara, Helano, Andréia, Gabi, Luciana, Ana Cláudia, Camila, Rafael, Raphael Sales e Silvina*; e de ontem; *Mara, Luciana Andrade e Verônica*; pelos bons momentos vividos, pelos chopes, pelos almoços na copa e pelo apoio e

ensinamentos. À **Fabiana** pelo carinho, amizade e troca de conselhos. À **Dani Borim** pela amizade, disponibilidade e apoio na viagem ao Canadá. À **Fabiola** pelas discussões sobre *microarray* e pela amizade. À Felícia, sempre muito solícita, pela ajuda com o PCR em tempo real. Aos demais amigos do LIM 24 da FM-USP em especial à Cíntia, Simone e Maria José e aos **funcionários do LIM24**, por todo suporte que possibilitou a realização desse trabalho.

To my good friends from Dr Tannock's Lab in Toronto; **Andrea, Jas, Krupa and Carol**. It was a great pleasure to meet all of you guys, thanks for the help and friendship.

Aos meus pais **Francisco** e **Zélia** pelo incentivo e constante apoio e torcida durante toda a minha jornada na “escola”. Longos 18 anos de vida de estudante! Por terem me educado no amor e me permitido escolher meus próprios caminhos.

Ao **Daniel** por todo o trabalho gostoso nessa etapa final do doutorado! Depois do seu nascimento eu aprendi o que realmente significa AMAR.

Ao **Erlandes** pelo companheirismo e amor. Pelo incentivo, pelos planos, pela esperança, pelo carinho, pela compreensão... por você existir.

Aos meus irmãos **Paulinho** e **Duílio**, à cunhada **Rejane** e o sobrinho **Guilherme**, pelos momentos de distração e convivência em família.

À **Cecília**, minha “marida” mais fiel, a quem devo tantos favores que só Deus para compensá-la por mim. Obrigado pelo companheirismo, amizade e carinho.

Às minhas grandes amigas superpoderosas; **Chris, Lelê, Rose e Lizi**. Por estarem sempre ao meu lado, não importando a distância física. Pelos conselhos que muitas vezes pacificaram o meu coração. E pelo amor que brota dessa nossa bonita amizade.

Aos amigos espalhados pelo mundo que pela força da amizade de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho; **Cláudia e Robson** (Toronto), **Michelle** (Fortaleza), **Aldiran, Janaína e Pedro** (São Paulo), **Raphaella** e **Alessandra** (Brasília), pela amizade e apoio em momentos importantes.

Às secretárias da pós-graduação do Hospital AC Camargo, **Luciana Pitombeira e Ana Maria Kuninari**, por toda assistência no processo do doutorado sanduíche e na finalização da tese e à **Suely Francisco** da Biblioteca.

À **FAPESP** e ao **CNPq**, os quais disponibilizaram recursos financeiros para a realização desse estudo. E a **CAPES** pela oportunidade de realização do doutorado sanduíche no Canadá.

Enfim, a todos que colaboraram de alguma maneira para a realização desse trabalho,  
**muito obrigado!**

## RESUMO

Costa PLN. **O microambiente tumoral como alvo terapêutico: avaliação do efeito de antagonistas do receptor de bradicinina tipo 1 em melanoma murino.** São Paulo; 2009. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

O microambiente tumoral tem sido considerado um importante alvo para terapias anticâncer. Recentemente, o receptor de bradicinina tipo 1 (BKR1), o qual é expresso em leucócitos e células endoteliais, foi implicado na progressão de diversos cânceres, incluindo o melanoma. Este trabalho mostra que ocorre um atraso no desenvolvimento do melanoma B16-F10 em camundongos nocauteados para o gene BKR1, bem como uma maior taxa de sobrevivência dos animais com tumor, comparado aos do tipo selvagem. Foi investigado os efeitos de antagonistas seletivos de BKR1 avaliando também a sua combinação com o agente quimioterápico dacarbazina (DTIC). Células de melanoma B16-F10 foram injetadas subcutaneamente em camundongos C57Bl/6, os quais foram tratados com DTIC (2mg/kg) a cada 3 dias, R-954 (1mg/kg) diariamente, DTIC concomitante com R-954 ou PBS, como controle. Os camundongos foram sacrificados no 12º dia de tratamento, os tumores foram removidos e processados para extração de RNA. Os tratamentos com R-954, DTIC ou R-954 + DTIC não resultaram em redução da massa tumoral. Entretanto, o tratamento combinado aumentou a sobrevivência global dos camundongos. Experimentos de microarranjos de oligonucleotídeos foram realizados usando o GeneChip Mouse 430 (Affymetrix) e os dados foram normalizados pelo método RMA. Dois diferentes métodos foram utilizados na seleção de genes diferencialmente expressos (*differentially expressed genes* -DEGs): o teste “t de Student” e o teste Limma. Um total de 87 DEGs foram selecionadas com *fold change* >1,5 e valor de  $p < 0,05$ . Alguns desses genes, envolvidos em importantes processos como angiogênese, invasão, metástase e quimiorresistência, têm sido validados por PCR em tempo real, como: transglutaminase-2, HSP-1b, neuropilina-2, serpine 1, fator de crescimento do tecido conjuntivo (Ctgf) e serglicina. Em um segundo conjunto de experimentos foi avaliado o efeito de antagonistas de BKR1 em alterações de permeabilidade vascular

e distribuição de droga fluorescente (doxorrubicina) no microambiente do tumor. Os antagonistas de BKR1, R-954 e R-715, causaram redução da penetração de doxorrubicina no microambiente tumoral após tratamento por 2 horas, precedido ou não de tratamento crônico (diário), entretanto após 6 horas de tratamento foi observado um aumento da quantidade de doxorrubicina, comparado ao controle, seguido de redução após 24 horas de tratamento. No entanto, em tumores EMT6 (sarcoma mamário murino) após 2 horas de tratamento com esses antagonistas foi possível observar um aumento da quantidade de doxorrubicina no microambiente tumoral. Esses resultados sugerem mecanismos pelos quais as complexas interações entre as células tumorais e as células do hospedeiro, expressando BKR1, podem resultar na resistência tumoral aos quimioterápicos e a consequente falha dos tratamentos convencionais.

## SUMMARY

Costa PLN. **Tumor microenvironment as therapeutic target: Evaluation of the effect of bradykinin receptor 1 antagonists in murine melanoma.** São Paulo; 2009. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Tumor microenvironment has been considered an important target for anticancer therapies. Recently, the bradykinin receptor type 1 (BKR1), which is expressed on leukocytes and endothelial cells, has been implicated in the progression of several cancers, including melanoma. In this work we have shown that there is a delay in BKR1 knockout mice melanoma engraftment and we also observed higher survival rates in these animals compared to wild type mice. We have investigated the effects of selectives BKR1 antagonists evaluating its combination with the chemotherapeutic agent dacarbazine (DTIC). B16-F10 melanoma cells were injected subcutaneously in C57bl/6 mice, which were treated with DTIC (2mg/kg) every 3 days, R-954 (1mg/kg) daily, DTIC plus R-954 or PBS, as control. Mice were sacrificed at day 12 of treatment; tumors were excised and processed for RNA extraction. Treatments with R-954, DTIC or R-954 plus DTIC did not reduced tumor mass. However, the combined treatment increased the global survival of mice bearing tumor. Microarray experiments were performed using GeneChip Mouse 430 (Affymetrix). Data was normalized using the RMA method. Two different methods were employed for selection of differentially expressed genes (DEGs): the Student's T-test and the Limma package. A total of 87 DEGs were identified with fold change >1,5 and  $p$  value <0,05. Some of these genes, involved in important process as angiogenesis, invasion, metastasis and chemoresistance, had been validated by real time PCR as; transglutaminase-2, HSP-1b, neuropilin-2, serpine 1, connective tissue growth factor and serglycin. In a second set of experiments we evaluated the effect of antagonists BKR1 in vascular permeability alterations and distribution of fluorescent drug (doxorubicin) in tumor microenvironment. BKR1 antagonists, R-954 and R-715, caused a reduction of the penetration of doxorubicin in the tumor microenvironment after treatment for 2 hours, followed or not by chronic treatment (daily), but after 6

hours of treatment was observed an increase in the amount of doxorubicin, compared to the control, followed by reduction after 24 hours of treatment. However, in EMT6 tumors (murine mammary sarcoma) after 2 hours of treatment with these antagonists we observed an increased amount of doxorubicin in tumor microenvironment. These results suggest mechanisms by which the complex interactions between tumor and BKR1 positive host cells may result in tumor resistance to chemotherapeutic agents and the consequent failure of regular treatments.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	O sistema caliceína-cinina: Geração de bradicinina, Lys-bradicinina e seus principais metabólitos ativos, des-Arg <sup>9</sup> -BK e Lys-des-Arg <sup>9</sup> -BK.	28
<b>Figura 2</b>	Representação esquemática de um arranjo de sondas GeneChip® (Affymetrix, USA).	55
<b>Figura 3</b>	Esquema ilustrativo das etapas do microarranjo de oligonucleotídeos.	56
<b>Figura 4</b>	Desempenho do oligo B2.	63
<b>Figura 5</b>	Crescimento dos tumores B16-F10 em camundongos nocautes para BKR1 e do tipo tratados com DTIC.	79
<b>Figura 6</b>	Cinética de aparecimento de tumores B16-F10 em camundongos do tipo selvagem e nocautes para BKR1 tratados com DTIC ou PBS.	80
<b>Figura 7</b>	Avaliação da taxa de sobrevivência global de camundongos do tipo selvagem e nocautes para BKR1 com implante de melanoma, tratados ou não com DTIC.	81
<b>Figura 8</b>	Análise do crescimento tumoral em camundongos do tipo selvagem com implante de melanoma B16-F10 tratados com o antagonista de BKR1, R-954.	82
<b>Figura 9</b>	Análise do microambiente de melanomas em camundongos C57Bl-6 no 10º dia após a implantação tumoral na vigência do tratamento com R-954.	83

<b>Figura 10</b>	Análise do microambiente de melanomas em camundongos C57Bl-6 no 13° dia após a implantação tumoral na vigência do tratamento com R-954. As	84
<b>Figura 11</b>	Análise morfométrica dos tumores não mostrou diferenças quanto ao padrão necrótico, hemorrágico ou vascular quando do tratamento com R-954 no 10° e 13° dias após a implantação tumoral.	86
<b>Figura 12</b>	Análise do crescimento tumoral em camundongos com implante de melanoma tratados com PBS, como controle, com DTIC, com o antagonista R-954 ou concomitantemente com R-954 e DTIC (R-954 + DTIC).	87
<b>Figura 13</b>	Curvas de sobrevida global de camundongos com melanoma tratados com PBS, como controle, com DTIC, com o antagonista R-954 ou concomitantemente com R-954 e DTIC (R-954 + DTIC).	88
<b>Figura 14</b>	Avaliação do crescimento tumoral em camundongos com implante de melanoma tratados com o antagonista R-954, o quimioterápico dacarbazina (DTIC), R-954 e DTIC concomitantemente ou PBS, como controle.	90
<b>Figura 15</b>	Análise da integridade do RNA tumoral. RNA total (cerca de 1µg) extraído dos tumores corado com brometo de etídeo separado eletroforéticamente em gel de agarose 0,8% desnaturante.	91
<b>Figura 16</b>	QCStats – Estatística de controle de qualidade. Gráfico gerado pelo programa “R”, utilizando o algoritmo MAS 5.0 relativo aos controles das 12 hibridizações.	93
<b>Figura 17</b>	BoxPlot da intensidade de fluorescência das 12 hibridizações realizadas, antes (A) e depois da normalização (B)	94

<b>Figura 18</b>	Matriz de correlação entre as hibridações apresentando os coeficientes de correlação de Pearson. As cores indicam o grau de correlação entre os arranjos	95
<b>Figura 19</b>	Agrupamento hierárquico das amostras e dos genes diferencialmente expressos em tumores de camundongos tratados com PBS (controle) e Dacarbazina (DTIC).	98
<b>Figura 20</b>	Agrupamento hierárquico das amostras e dos genes diferencialmente expressos em tumores de camundongos tratados com PBS (controle) e Dacarbazina (DTIC).	100
<b>Figura 21</b>	Agrupamento hierárquico das amostras e dos genes diferencialmente expressos em tumores de camundongos tratados com PBS (controle) e R-954 +Dacarbazina (R+D).	104
<b>Figura 22</b>	Agrupamento hierárquico das amostras e dos genes diferencialmente expressos em tumores de camundongos tratados com DTIC e R-954+Dacarbazina (R+D).	106
<b>Figura 23</b>	Agrupamento hierárquico das amostras e dos genes diferencialmente expressos em tumores de camundongos tratados com R-954 comparados a R-954 +Dacarbazina (R+D).	107
<b>Figura 24</b>	Diagrama de Venn dos genes diferencialmente expressos encontrados em comum entre duas ou mais análises.	108
<b>Figura 25</b>	Análise da expressão relativa por RT-PCR em tempo real dos genes.	111
<b>Figura 26</b>	Análise comparativa da diferença de expressão (fold change) de genes selecionados do microarranjo avaliados por PCR em tempo real.	112

<b>Figura 27</b>	O tratamento com R-954 não alterou a permeabilidade vascular intratumoral em camundongos com melanoma B16-F10	115
<b>Figura 28</b>	Ensaio de toxicidade “in vivo” de doxorubicina associada ao antagonista R-954.	116
<b>Figura 29</b>	Ensaio de toxicidade “in vivo” de doxorubicina associada ao antagonista R-715.	117
<b>Figura 30</b>	Distribuição de doxorubicina em relação aos vasos sanguíneos funcionais em tumores B16-F10 (melanoma) tratados com os antagonistas de BKRI R-954 ou R-715 2h antes da injeção de doxorubicina.	118
<b>Figura 31</b>	Distribuição de doxorubicina em relação aos vasos sanguíneos em tumores B16-F10 tratados <u>diariamente</u> (efeito crônico) com os antagonistas de BKRI R-954 ou R-715.	119
<b>Figura 32</b>	Densidade microvascular em tumores B16-F10 tratados <u>diariamente</u> (efeito crônico) com os antagonistas de BKRI R-954 ou R-715.	121
<b>Figura 33</b>	Distribuição de doxorubicina em relação aos vasos sanguíneos em tumores B16-F10 tratados <u>diariamente</u> (efeito crônico) com o antagonista de BKRI R-954 após 2, 6 e 24hs do tratamento.	122
<b>Figura 34</b>	Distribuição de doxorubicina em relação aos vasos sanguíneos em tumores B16-F10 tratados <u>diariamente</u> (efeito crônico) com o antagonista de BKRI R-715 após 2, 6 e 24hs do tratamento	124
<b>Figura 35</b>	Densidade microvascular em tumores B16-F10 tratados <u>diariamente</u> (efeito crônico) com os antagonistas de BKRI R-954 ou R-715 após 2, 6 e 24hs do tratamento.	125

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Controles de hibridização do GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array.	62
<b>Tabela 2</b>	Oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de PCR em tempo real.	68
<b>Tabela 3</b>	Número de genes diferencialmente expressos (DEGs) identificados por meio da análise estatística com os algoritmos Limma e Teste <i>t</i> (simultaneamente) que apresentaram valor de $p < 0,05$ .	97
<b>Tabela 4</b>	Genes diferencialmente expressos quando comparado animais do grupo controle (tratados com PBS) e animais tratados com o quimioterápico Dacarbazina (DTIC) (Controle x DTIC).	99
<b>Tabela 5</b>	Genes diferencialmente expressos quando comparado animais do grupo controle (tratados com PBS) e animais tratados com o antagonista R-954 (Controle x R-954).	101
<b>Tabela 6</b>	Genes diferencialmente expressos quando comparado animais do grupo controle (tratados com PBS) e animais tratados concomitantemente com o quimioterápico Dacarbazina (DTIC) e R-954 (Controle x R+D).	104
<b>Tabela 7</b>	Genes diferencialmente expressos quando comparado animais tratados com DTIC e animais tratados concomitantemente com Dacarbazina (DTIC) e com o antagonista R-954 (DTIC x R+D).	106
<b>Tabela 8</b>	Genes diferencialmente expressos quando comparado animais tratados com R-954 e animais tratados concomitantemente com o quimioterápico Dacarbazina (DTIC) e com o antagonista R-954 (R-954 x R+D).	107

**Tabela 9** Genes diferencialmente expressos cujas funções biológicas são relevantes para a compreensão de mecanismos-chave envolvidos na progressão tumoral e na resistência/falha dos tratamentos quimioterápicos.

110

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ANOVA</b> -	Análise de variância
<b>AVMA</b> -	<i>American Veterinary Medical Association</i>
<b>BK</b> -	Bradicinina
<b>BKR1</b> -	Receptor de bradicinina subtipo 1
<b>BKR1 KO</b> -	Camundongo nocaute ( <i>Knock-out</i> ) para o receptor de bradicinina subtipo 1
<b>BKR2</b> -	Receptor de bradicinina subtipo 2
<b>BSA</b> -	Albumina bovina
<b>CAPPesq</b> -	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
<b>CD</b> -	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>CTGF</b> -	Fator de crescimento do tecido conjuntivo (do inglês <i>Connective tissue grow factor</i> )
<b>cRNA</b> -	RNA cópia
<b>Ct</b> -	Ciclo do <i>Threshold</i>
<b>DAB</b> -	3-3'diaminobenzidina
<b>DEG</b> -	Gene diferencialmente expresso (do inglês <i>Differentialy Expressed Gene</i> )
<b>DEPEC</b> -	Dietil pirocarbonato
<b>DIOC-7</b>	3,3' - Diheptyloxacarboyanine iodide
<b>DMSO</b> -	Dimetilsulfóxido
<b>dNTP</b> -	Desoxirribonucleotídeo-3-fosfato
<b>DTIC</b> -	Dacarbazina
<b>DTT</b> -	Ditiotreitol
<b>EDTA</b> -	Ácido Etileno Diamino Tetra-acético
<b>FGF</b> -	Fator de crescimento fibroblástico básico
<b>GM-CSF</b> -	Fator estimulador de colônia- granulócito macrófago (do inglês <i>Granulocyte Macrophage -Colony stimulating factor</i> )
<b>GMP</b> -	Guanosine monofosfato
<b>H&amp;E</b> -	Hematoxilina e eosina

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> -	Peróxido de hidrogênio
<b>HCl</b> -	Ácido Clorídrico
<b>HMWK</b> -	Cininôgeno de alta massa molecular (do inglês <i>High Molecular Weight Kininogen</i> )
<b>IFP</b> -	Pressão Intersticial de fluídos (do inglês <i>Interstitial Fluid Pressure</i> )
<b>IMP</b> -	Inosina monofosfato
<b>i.p</b> -	Intraperitoneal
<b>i.v.</b> -	Intravenoso
<b>Ig</b> -	Imunoglobulina
<b>IL</b> -	Interleucina
<b>IVT</b> -	Transcrição <i>in vitro</i> (do inglês <i>In vitro transcription</i> )
<b>KCl</b> -	Cloreto de potássio
<b>LMWK</b> -	Cininôgeno de baixa massa molecular ( <i>Low Molecular Weight Kininogen</i> )
<b>MAP</b> -	Proteínas ativadoras de mitógenos
<b>MeV</b> -	<i>MultiExperiment Viewer</i>
<b>MgCl<sub>2</sub></b> -	Cloreto de magnésio
<b>MM</b> -	<i>Mismatch</i>
<b>MMP</b> -	Metaloprotease de matriz extracelular
<b>MOPS</b> -	3-(N-morfolino)- ácido propanosulfônico
<b>MTT</b> -	Sal de tetrazólio (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)
<b>NaCl</b> -	Cloreto de sódio
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> -	Fosfato de sódio monobásico
<b>NCBI</b> -	National Center for Biotechnology Information
<b>NF-κB</b> -	Fator nuclear κ B
<b>O.D</b> -	Densidade Óptica
<b>PAF</b> -	Fator ativador plaquetário (do inglês <i>Platelet Activator Factor</i> )
<b>PAI1</b> -	Inibidor do ativador de plasminogênio 1 (do inglês <i>Plaminogen Activator Inhibitor</i> )
<b>PBS</b> -	Tampão fosfato salina

<b>PCR -</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PLC-β -</b>	Fosfolipase C-β
<b>PM -</b>	<i>Perfect Match</i>
<b>PPBP -</b>	<i>Pro-Platelet Basic Protein (CXCL-7)</i>
<b>RMA -</b>	<i>Robust Multi-Array Analysis</i>
<b>rNTP -</b>	Ribonucleotídeo-3-fosfato
<b>RPLPO</b>	Proteína ribossomal da subunidade maior (do inglês <i>Large ribosomal protein P0</i> )
<b>RT-PCR -</b>	Transcrição reversa seguida de PCR
<b>s.c -</b>	Subcutâneo
<b>SOM -</b>	<i>Self-Organizing Map</i>
<b>TCR -</b>	Receptor de célula T
<b>TGF-α -</b>	Fator de crescimento transformante alfa (do inglês <i>Transforming growth factor α</i> )
<b>TNF -</b>	Fator de necrose tumoral (do inglês <i>Tumoral Necrotic Factor</i> )
<b>TS -</b>	Timidilato Sintase
<b>uPA -</b>	Complexo do ativador de plasminogênio (do inglês <i>urokinase Plasminogen Activator</i> )
<b>VEGF -</b>	Fator de crescimento do endotélio vascular (do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
<b>WT -</b>	Camundongos do tipo selvagem (do inglês <i>wild type</i> )

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>22</b>
1.1	Câncer e Microambiente tumoral	22
1.2	Angiogênese tumoral	24
1.3	O sistema cinina-caliceína	26
1.4	Receptores de cininas	28
1.5	Receptores de bradicinina e inflamação	32
1.6	Angiogênese, permeabilidade vascular e cininas	33
1.7	Receptores de bradicinina e câncer	35
1.8	Tratamento do melanoma cutâneo	37
1.9	Terapias anti-angiogênicas	39
1.10	Resistência a drogas e o microambiente de tumores sólidos	41
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b>	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>44</b>
3.1	Animais	44
3.2	Linhagens celulares e manutenção em cultura	45
3.3	Fármacos	45
3.4	Regimes de tratamento	46
3.4.1	Regime de tratamento com o quimioterápico dacarbazina (DTIC)	46
3.4.2	Regime de tratamento com o antagonista R-954	46
3.4.3	Regime de tratamento com R-954 e DTIC	47
3.5	Análise da cinética de surgimento e crescimento tumoral	47
3.6	Histo e imunoistoquímica de tumores B16-F10 implantados subcutaneamente em camundongos C57Bl-6	50
3.7	Análise morfométrica	50
3.8	Extração de RNA total, quantificação e análise qualitativa.	51
3.9	Obtenção, quantificação e análise do RNA mensageiro	52
3.10	Microarranjo de sondas oligonucleotídicas	53

3.10.1	Obtenção do cDNA fita dupla	56
3.10.2	Purificação do cDNA fita dupla	57
3.10.3	Síntese do cRNA marcado com biotina	58
3.10.4	Purificação e quantificação do cRNA marcado	58
3.10.5	Fragmentação do cRNA marcado com biotina	59
3.10.6	Hibridização do cRNA aos oligonucleotídeos do chip	59
3.10.7	Lavagem, coloração e escaneamento do chip	60
3.11	Controles do microarranjo de oligonucleotídeos	61
3.12	Normalização dos dados do microarranjo de oligonucleotídeos	63
3.13	Seleção dos genes diferencialmente expressos	65
3.14	Agrupamentos dos dados de expressão gênica	66
3.15	Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação gênica e quantificação por PCR em tempo real.	67
3.16	Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real	68
3.17	Ensaio de permeabilidade vascular	70
3.18	Ensaio para avaliar a toxicidade dos antagonistas R-954 e R-715 associados a doxorrubicina	72
3.19	Ensaio para avaliar o efeito <u>agudo</u> dos antagonistas R-715 e R-954 na distribuição de doxorrubicina (agente fluorescente) no tecido tumoral	72
3.20	Ensaio para avaliar o efeito <u>crônico</u> dos antagonistas R-715 e R-954 na distribuição de doxorrubicina (agente fluorescente) no tecido tumoral	73
3.21	Quantificação da fluorescência de doxorrubicina em relação aos vasos sanguíneos (distribuição da droga no microambiente tumoral)	73
3.22	Quantificação dos vasos sanguíneos totais e funcionais no microambiente tumoral.	76
3.23	Análise estatística	77
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>78</b>
4.1	Avaliação da progressão do melanoma murino B16-F10 em	78

	camundongos nocautes para o gene BKR1 tratados com o quimioterápico dacarbazina.	
4.2	Análise da administração do antagonista de BKR1, R-954, no tratamento de camundongos do tipo selvagem com implante de melanoma B16-F10.	81
4.3	Avaliação do tratamento de camundongos com implante de melanoma com o antagonista R-954 concomitante com o quimioterápico dacarbazina.	86
4.4	Avaliação da expressão gênica de tumores tratados com R-954, dacarbazina ou R-954 concomitante com dacarbazina por meio de microarranjos de oligonucleotídeos.	88
4.5	Validação de resultados dos microarranjos de oligonucleotídeos por RT-PCR em tempo real.	109
4.6	Avaliação de alterações na permeabilidade vascular intratumoral em camundongos com implante de melanoma tratados com R-954.	113
4.7	Avaliação de alterações na distribuição da droga fluorescente doxorrubicina no microambiente de tumores sólidos em função do tratamento com os antagonistas R-954 e R-715.	115
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>127</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>154</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>156</b>

## **ANEXOS**

**Anexo 1** Análise da ativação da via de BKR1 em células B16-F10 *in vitro*.

**Anexo 2** Determinação do índice mitótico de células B16-F10

implantadas em camundongos, submetidos ao tratamento com R-954, DTIC e R-954 combinado à DTIC.

**Anexo 3** Avaliação do crescimento de tumores B16-F10 com a utilização de mini-bombas osmóticas para a administração contínua do

antagonista R-954.

**Anexo 4** Avaliação de alterações na distribuição de doxorubicina no microambiente de sarcoma EMT6 em função do tratamento com os antagonistas R-954 e R-715.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer e Microambiente tumoral

O câncer é uma doença de múltiplos passos, caracterizado pelo acúmulo progressivo de mutações genéticas nas células. Essas mutações levam a alterações na expressão ou função de genes-chave para a manutenção da homeostasia celular, podendo converter uma célula normal em uma célula transformada, que passa a não mais responder aos sinais de controle de proliferação, morte e diferenciação celular (PARK et al., 2000).

Por décadas, a pesquisa sobre câncer objetivou apenas a identificação de mudanças genéticas e fenotípicas das próprias células cancerígenas para explicar a natureza dessa doença. Recentemente, tem se verificado que a análise do microambiente tumoral é de importância crucial para uma melhor compreensão do câncer (HANAHAN e WEINBERG, 2000). O microambiente tumoral consiste, além das próprias células tumorais, principalmente da matriz extracelular, fibroblastos, células imunes e elementos neurais sustentados por uma rede vascular, além dos diversos fatores solúveis; como citocinas, hormônios, cininas e fatores de crescimento (BLANKENSTEIN, 2005; PARK et al., 2000).

Diferentemente das células tumorais, que apresentam uma taxa relativamente alta de proliferação, as demais células do microambiente tumoral apresentam um estrito controle de proliferação e diferenciação. Assim, estas últimas seriam interessantes alvos para terapias.

Estudos recentes têm sugerido que as células inflamatórias do microambiente têm papel bastante relevante, podendo atuar tanto reprimindo quanto promovendo o crescimento tumoral. O recrutamento local e a ativação de efetores imunes, tais como macrófagos, granulócitos e linfócitos podem elicitar uma efetiva resposta antitumoral. Porém, condições inflamatórias também podem favorecer o crescimento e a disseminação tumoral pela promoção da angiogênese e destruição do tecido, bem como pela produção de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e cininas (WILSON e BALKWILL, 2002; BISACCHI et al., 2003).

Monócitos, neutrófilos e linfócitos são ativamente atraídos da circulação periférica pelo tumor, principalmente devido à produção de quimiocinas das famílias CC e CXC, tais como a interleucina-8 (IL-8). Estas células também são capazes de produzir quimiocinas e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), que parecem recrutar células do endotélio e ativar células do infiltrado inflamatório, impulsionando a angiogênese em uma cascata de auto-amplificação (WILSON e BALKWILL, 2002; BISACCHI et al., 2003; MELNIKOVA e BAR-ELI, 2009). Além disso, tem-se demonstrado que monócitos e granulócitos produzem metaloproteases de matriz (MMP) que facilitam a invasão das células endoteliais durante a angiogênese (BISACCHI et al., 2003).

Nesse contexto, acredita-se que o microambiente tumoral tenha um papel relevante também na progressão do melanoma (LABROUSSE et al., 2004). Correa e colaboradores ilustraram a importância do microambiente tumoral em melanoma demonstrando que a inoculação de quantidades subtumorigênicas de células de melanoma murino resulta em um crescimento tumoral vigoroso, somente quando co-inoculadas com células apoptóticas. A presença das células apoptóticas

correlacionou-se com um infiltrado inflamatório transiente composto principalmente por macrófagos e neutrófilos. Sugere-se que as alterações no microambiente tumoral em resposta as células apoptóticas aconteçam de maneira semelhante durante o tratamento dos pacientes com quimioterápicos (CORREA et al., 2005).

## 1.2 ANGIOGÊNESE TUMORAL

O crescimento da massa tumoral requer uma grande demanda de nutrientes, oxigênio e metabólitos, estas necessidades são satisfeitas primariamente pela formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros pré-existentes, processo conhecido como angiogênese, e pelo aumento da permeabilidade vascular (FOLKMAN, 1975). Além disso, a angiogênese é a principal via pela qual as células malignas escapam do tumor e entram na circulação para estabelecer metástases (BISACCHI et al., 2003; MAEDA et al., 2003).

Os tumores apresentam uma vasculatura desorganizada, tortuosa, com múltiplas anormalidades estruturais e funcionais; possuem regiões dilatadas, numerosas fenestras e ausência da camada de pericitos, tornando-os mais permeáveis que os vasos de tecidos normais (CAIRNS et al., 2006).

A aquisição de um fenótipo angiogênico parece ser um evento chave na progressão tumoral, conhecido como “*angiogenic switch*”, que permite ao tumor transmutar de uma lesão microscópica (tumores ditos dormentes) com um potencial maligno limitado a uma massa tumoral de rápida expansão favorecendo a malignidade (HANAHAN e FOLKMAN, 1996; WEINBERG e HANAHAN, 2000).

No processo angiogênico existem diversos fatores solúveis envolvidos e o resultado final é determinado pelo equilíbrio local de fatores pró e anti-angiogênicos produzidos por várias células do microambiente tumoral, como células hematopoiéticas e fibroblastos. Um tumor maligno pode contar com um arsenal de moléculas que promovem a angiogênese. Dentre essas moléculas pró-angiogênicas destacam-se fatores de crescimento como o VEGF (*Vascular Endothelial Growth factor*), o fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-b), o fator de crescimento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), o fator de necrose tumoral (TNF), a IL-8 e enzimas líticas, como as da família de metaloproteases de matriz e serino-proteases da família uroquinase e do sistema cinina-caliceína (BISACCHI et al., 2003; NAIDOO et al., 2004; DE PALMA e NALDINI, 2006). Uma variedade de fatores, incluindo hipóxia e mudanças genéticas nas células tumorais (ativação de oncogenes e supressores de tumor), contribui para o aumento da produção de fatores angiogênicos (RAK et al., 2000; BOUDREAU e MYERS, 2003; AHMED e BICKNELL, 2009).

O VEGF, denominado inicialmente de fator de permeabilidade vascular – VPF compreende uma família de glicoproteínas; VEGF-A, -B, -C, -D, -E e PLGF (fator de crescimento placentário), que podem ser sintetizadas por células normais e neoplásicas e que exercem suas ações biológicas através da ligação com seus receptores tirosina quinase VEGFR-1, -2 e -3 que são expressos por células endoteliais e mononucleares (BYRNE et al., 2005; SALNIKOV et al., 2006). O VEGF estimula a proliferação de células endoteliais, induz sinais anti-apoptóticos, medeia à secreção e ativação de metaloproteases de matriz, dentre outras ações relacionadas não apenas à angiogênese, mas à migração e ao estabelecimento de

metástases (PAGÉS et al., 2000; BERGERS et al., 2000; HARMEY e BOUCHIER-HAYES, 2002; WANG et al., 2006).

Dentre os inibidores angiogênicos, destacam-se angiostatina, trombospondina, endostatina e tumstatina (GOOD et al., 1990; O'REILLY et al., 1997; FOLKMAN, 2006). Vários desses inibidores são produtos da proteólise de moléculas como plasminogênio, colágeno XVIII e colágeno IV (angiostatina, endostatina e tumstatina, respectivamente). Portanto, a geração desses fatores depende da ação de enzimas proteolíticas, que podem ser produzidas por macrófagos (MUELLER e FUSENIG, 2004).

### 1.3 O SISTEMA CININA-CALICREÍNA

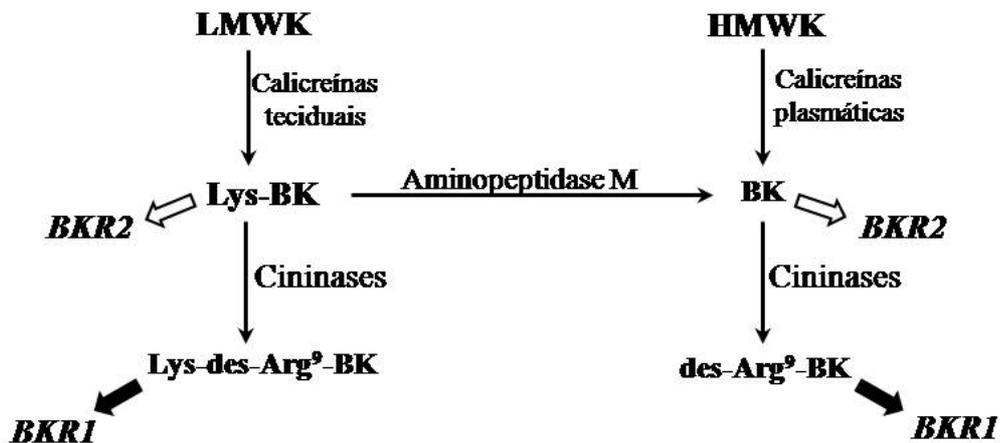
Pesquisas recentes têm mostrado que as cininas exercem grande influência no microambiente tumoral. As cininas são hormônios peptídicos compostos de 8 a 13 aminoácidos que medeiam importantes processos biológicos, tais como hipotensão, inflamação, vasodilatação, contração do músculo liso, proliferação celular, quimiotaxia de neutrófilos, homeostase cardiovascular e nocicepção (REGOLI et al., 1998; NEUGEBAUER et al., 2002; SHARMA e AL-DHALMAWI, 2003).

O sistema cinina-caliceína representa uma cascata endógena de enzimas o qual resulta na ativação de caliceínas para produzir cininas a partir de moléculas parentais chamadas de cininogênios (UENO e OH-ISHI, 2003). Os cininogênios são proteínas com multidomínios que incluem a seqüência de aminoácidos da bradicinina (BK). Um único gene humano de cininogênio codifica para a produção de um cininogênio de alta massa molecular (*High Molecular Weight Kininogen* - HMWK;

88–120 k Da) e um cininogênio de baixa massa molecular (*Low Molecular Weight Kininogen* - LMWK; 50–68 kDa) por meio de *splicing* alternativo. Os cininogênios circulantes são primariamente produzidos pelo fígado (REGOLI et al., 1998; MARCEAU et al., 2002; MARCEAU e REGOLI, 2004; MOREAU et al., 2005).

As pré-caliceínas estão presentes no sangue como pro-enzimas e são ativadas no plasma pela ação do Fator XII ativo, ou fator de Hageman, e ambos estão associados à iniciação do sistema caliceína-cinina e da coagulação sanguínea (MARCEAU e REGOLI, 2004). O sistema caliceína-cinina é constituído pelas caliceínas plasmáticas e glandulares (ou teciduais). As caliceínas glandulares são sintetizadas em tecidos glandulares e são encontradas na sua forma ativa em vários tecidos e seus fluidos, incluindo o pâncreas e o suco pancreático, glândulas salivares e a saliva, rins e urina. As caliceínas plasmáticas clivam preferencialmente o HMWK para formar bradicinina e as caliceínas glandulares clivam preferencialmente o LMWK, em humanos, produzindo Lys-bradicinina (também conhecida como calidina) (UENO e OH-ISHI, 2003, MOREAU et al., 2005).

Bradicinina e Lys-bradicinina (Lys-BK) são processadas por peptidases chamadas cininases formando os metabólitos ativos, respectivamente, des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina e des-Arg<sup>9</sup>-Lys-bradicinina, que desempenham efeitos biológicos específicos. As cininases mais relevantes são as carboxipeptidases N e M (cininases I), a enzima conversora de angiotensina I (ACE), a endopeptidase neutra (NEP) e as aminopeptidases M e P (REGOLI et al., 1998; CASSIM et al., 2002; COUTURE e GIROLAMI, 2004; LEEB-LUNDBERG et al., 2005).



**Figura 1.** O sistema caliceína-cinina: Geração de bradicinina, Lys-bradicinina e seus principais metabólitos ativos, des-Arg<sup>9</sup>-BK e Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK. Os cininogênios de alta e baixa massa molecular (HMWK e LMWK) são clivados por caliceínas teciduais e plasmáticas gerando os metabólitos Lys-bradicinina (Lys-BK) e bradicinina (BK), respectivamente, que por sua vez são clivados por cininases gerando respectivamente os metabólitos ativos Lys-des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina e des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina. Lys-BK e BK são agonistas dos receptores de bradicinina subtipo 2 (BKR2) e Lys-des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina e des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina são agonistas dos receptores de bradicinina subtipo 1 (BKR1).

A produção de cininas *in vivo* é controlada, em parte, por inibidores endógenos das enzimas caliceínas. Os principais inibidores das caliceínas plasmáticas são o inibidor C1, a  $\alpha$ 2-macroglobulina e a antitrombina III, já o principal inibidor de caliceínas glandulares é a calistatina (CAMPBELL, 2003; CASSIM et al., 2002).

#### 1.4 RECEPTORES DE CININAS

Dois subtipos de receptores de bradicinina têm sido definidos, BKR1 e BKR2, com base nas suas propriedades farmacológicas. Em condições fisiológicas, o BKR2 é constitutivamente expresso. BKR1 está geralmente ausente em tecidos normais, porém sua expressão é regulada positivamente sob condições

patofisiológicas, como injúria tecidual e inflamação, após tratamento com endotoxinas bacterianas, ou após exposição à citocinas, como IL-1 e TNF $\alpha$  (COUTURE et al., 2001; PRADO et al., 2002; BLAUKAT, 2003; UENO e OH-ISHI, 2003). A expressão do BKR1 parece ser controlada por citocinas, por algumas proteínas cinases ativadoras de mitógenos (MAP) relacionadas a estresse e por fatores de transcrição como o fator nuclear B (NF- $\kappa$ B) (MARCEAU e REGOLI, 2004). Uma diferença marcante entre esses dois receptores é que o BKR2 é dessensibilizado e internalizado rapidamente, entretanto o BKR1, uma vez induzido, apresenta persistente sinalização (IGNJATOVIC et al, 2002; BOCKMANN e PAEGELOW, 2000).

Bradicinina e Lys-bradicinina ligam-se preferencialmente a BKR2, entretanto os peptídeos truncados no carboxi-terminal, dentre eles des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina e des-Arg<sup>9</sup>-Lys-bradicinina, têm alta afinidade pelo BKR1 (REGOLI et al., 1993; MARCEAU et al., 1998).

BKR1 e BKR2 são receptores do tipo heptaélicos, isto é, que apresentam sete domínios transmembrânicos. Em geral, esses receptores têm sido encontrados acoplados a proteínas G levando a ativação da fosfolipase C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ) e subseqüentemente a geração de mensageiros secundários como, inositol-1,4,5-trifosfato, diacilglicerol e cálcio (IGNJATOVIC et al., 2002). O aumento da quantidade de cálcio pode levar a ativação da via óxido nítrico/Guanosilmonofosfato cíclico (GMPc). Diacilglicerol e cálcio ativam diversas isoformas de proteínas kinases C que estão envolvidas em várias vias de sinalização, incluindo aquelas que participam do controle da proliferação celular. Os receptores de cininas também podem ativar as fosfolipases A2 e D, bem como esfingosinas kinases, resultando em

um aumento da concentração de ácido araquidônico, que é subsequente convertido em prostaglandina (BLAUKAT, 2003).

A ativação de bradicinina induz vias adicionais em determinados modelos experimentais, como a produção de IL-6 e IL-8 em fibroblastos de pulmão e a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células do músculo liso. Bradicininina também induz a síntese de um número de agentes inflamatórios tais como o fator ativador de plaquetas (PAF), óxido nítrico e leucotrienos (PRADO et al, 2002).

Inúmeros antagonistas dos receptores de BK têm sido desenvolvidos, inclusive alguns deles surgem como promessa para o tratamento de determinadas patologias, já que esses receptores têm sido encontrados superexpressos em alguns tumores e em condições patológicas como o *Diabetes* tipo 1 (STEWART et al., 2002; STEWART, 2004).

Os primeiros antagonistas de BKR2 foram obtidos a partir da substituição de resíduos da posição 7 (Pro<sup>7</sup>) do nonapeptídeo bradicinina. Atualmente existem antagonistas, peptídicos e não peptídicos, com alta afinidade pelo BKR2 (BOCK e LONGMORE, 2000). Antagonistas para o BKR1 foram descobertos quase uma década depois, um deles resulta da troca do resíduo de fenilalanina do C-terminal do agonista de B1, des-Arg9-bradicinina, por um resíduo de leucina ou isoleucina (STEWART et al, 1999). O antagonista do BKR1, R-715, vem sendo utilizado em estudos com modelos de *Diabetes* tipo 1, inflamação pulmonar, neuropatias e melanomas murinos (ERIC et al., 2003; GAMA LANDGRAF et al., 2004; GABRA e SIROIS, 2005; FERREIRA et al., 2005; ANDRADE et al., 2007). Posteriormente surgiu uma segunda geração de peptídeos derivados do R-715, dentre eles o R-954,

que apresenta o mesmo potencial como antagonista, porém, é mais estável metabolicamente, pois é resistente a degradação por algumas cininases, resultando em peptídeo com maior meia-vida (NEUGEBAUER et al., 2002).

Nosso laboratório tem avaliado os fatores microambientais associados ao desenvolvimento de melanomas murinos. Recentemente, o papel da ativação do BKR1 em parâmetros associados à vasculatura tumoral foi avaliado por meio da utilização do antagonista R-715. Análises de expressão gênica mostraram um aumento de VEGF, mas não de VEGF-C e VEGFR-1, em animais tratados cronicamente com R-715. A permeabilidade vascular intratumoral, medida pelo extravasamento do corante azul de Evans, apresentou-se duas vezes maior em camundongos tratados com R-715, consistente com o aumento da expressão de VEGF (ANDRADE et al., 2007). Estes dados sugerem que a pressão intersticial de fluidos no melanoma tende a ser menor quando do tratamento com R-715 em comparação aos tumores controles. As alterações observadas na permeabilidade vascular poderiam ser utilizadas para melhorar a entrega de agentes quimioterápicos ao tumor. São necessários estudos para avaliar o efeito destes antagonistas na distribuição de agentes quimioterápicos no microambiente tumoral e também o seu efeito na normalização da vasculatura.

Esse projeto ocorre em colaboração com o grupo do Dr. Pierre Sirois do Instituto de Farmacologia de Sherbrooke, Canadá, que esta patenteando a utilização do antagonista R-954 para o tratamento de câncer e complicações neuropáticas induzidas por agentes quimioterápicos (patente n. 60/689,058 de 10 de junho de 2005).

## 1.5 RECEPTORES DE BRADICININAS E INFLAMAÇÃO

As cininas são peptídeos inflamatórios farmacologicamente muito potentes, os quais podem ser produzidos em vários tecidos e fluidos corporais. BKR1 e BKR2 podem causar a liberação de diversos mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, leucotrienos, interleucinas, fator ativador de plaquetas e TNF de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e células endoteliais (SHARMA, 2003).

Classicamente, BKR2 parece atuar como mediador principalmente da resposta inflamatória aguda e tem sido implicado na hipotensão, broncoconstrição aguda e formação de edema, além disso, observou-se também uma regulação positiva desses receptores após infarto do miocárdio (HORLICK et al., 1999; BOCK e LONGMORE, 2000; CASSIM et al., 2002). Já BKR1 teria papel preponderante na inflamação crônica, hiperalgesia e choque séptico.

A administração de BK reproduz os 4 sinais cardinais clássicos da inflamação; calor, inchaço, vermelhidão e dor, através da ativação de BKR2 que causa vasodilatação devido a produção de óxido nítrico e prostaglandinas por células endoteliais. Modelos de inflamação crônica demonstram o envolvimento de BKR1, onde o papel de leucócitos infiltrantes, como macrófagos, é relevante no suprimento de citocinas (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) requeridas para a indução da expressão de BKR1, e em alguns modelos, de BKR2 (fibroblastos pulmonares humanos) (PARENTI et al., 2001; COUTURE et al., 2001; MOREAU et al., 2005).

Camundongos nulizigotos para o gene do BKR1 apresentam reduzido acúmulo de neutrófilos no tecido inflamado, desta maneira, a ativação do BKR1 parece modular a homeostase e migração de neutrófilos. BKR1 também tem papel

importante na inflamação crônica, hiperalgesia e choque séptico (PESQUEIRO et al., 2000). O fato de BKR1 estar ausente em tecidos saudáveis e serem induzidos em inflamações faz com que esse receptor seja um alvo atrativo para drogas.

Um estudo recente mostrou que o implante de células de melanoma é facilitado pela reação inflamatória desencadeada no sítio de inoculação. Esta reação foi caracterizada pela morte maciça de células no local da injeção, seguida de infiltrado de neutrófilos, macrófagos e células endoteliais. A resposta inflamatória foi atenuada em animais nulizigotos para o gene do BKR1, sugerindo que as respostas celulares induzidas por metabólitos de bradicinina estejam entre os fatores determinantes do crescimento tumoral (CORREA et al., 2005).

O fato de BKR1 estar ausente em tecidos saudáveis e ser induzido em inflamações faz com que esse receptor seja um alvo atrativo para drogas. A habilidade de antagonistas do BKR1 de bloquear a resposta inflamatória celular pode ser um mecanismo anti-inflamatório importante e clinicamente explorável.

## 1.6 ANGIOGÊNESE, PERMEABILIDADE VASCULAR E CININAS

Apesar de existirem evidências da participação das cininas no processo de angiogênese tumoral, ainda é bastante controverso o mecanismo pelo qual elas desempenham esses papéis, bem como os metabólitos e subtipos de receptores envolvidos. Parece que os efeitos angiogênicos que elas exercem são dependentes temporal e espacialmente, bem como, do modelo experimental/tipo celular envolvido (MORBIDELLI et al., 1998; PARENTI et al., 2001; SONG et al., 2004).

Evidências sugerem que as cininas exercem efeitos pró-angiogênicos e também aumentam a permeabilidade dos vasos sanguíneos (CASSIM et al., 2002; MAEDA et al., 2003; STEWART, 2004). Segundo Ishihara e colaboradores (2002), bradicinina promove a angiogênese tumoral por meio de dois principais mecanismos. Na fase inicial a bradicinina estaria envolvida principalmente na hiperpermeabilidade da vasculatura tumoral via BKR2 das células do endotélio vascular. Porém, em fases mais tardias, na qual o tumor pesa mais que 0,2mg, a bradicinina induziria a angiogênese principalmente pela indução da expressão de VEGF em fibroblastos do estroma, também via BKR2 (ISHIHARA et al., 2002; IKEDA et al., 2004). Em modelo de sarcoma murino S-180 antagonistas de BKR2, mas não de BKR1, foram capazes de inibir a angiogênese e o crescimento tumoral (ISHIHARA et al., 2001). Nesse mesmo modelo, a administração do antagonista de BKR2 HOE 140 (Icatibant) reduziu a permeabilidade vascular em tumores ascíticos, bem como a quantidade de fluido ascítico (WU et al., 1998).

Segundo Parenti e colaboradores, a ativação do BKR2 associa-se a angiogênese por meio do recrutamento de mediadores inflamatórios e não envolve a proliferação de células do endotélio. Enquanto o efeito pró-angiogênico da bradicinina devido à ativação do BKR1 envolveria a proliferação de células do endotélio capilar e resultaria na regulação positiva de FGF-b no endotélio pela ativação da via óxido-nítrico sintase *in vivo* (PARENTI et al., 2001). Foi observado também o fenômeno de neovascularização de córnea de coelho após estimulação *in vivo* de BKR1 (PARENTI et al., 2001). O potencial mitogênico de BKR1 e BKR2 em células endoteliais também foi sugerido por Naidoo e Raidoo (2006) em modelo de co-cultura de células endoteliais (HUVECS) e células de neuroblastoma.

Os efeitos pró-angiogênicos das cininas, através de ambos os receptores, tem sido avaliados na neovascularização de tecido cardíaco após injúria isquêmica, onde detectou-se a expressão aumentada de BKR1 (EMANUELI et al., 2002). Recentemente Krankel e colaboradores relataram evidências da relevância de BKR2 no recrutamento de populações distintas de células progenitoras circulantes, com ação pró-angiogênica, para sítios de isquemia. Além disso, detectaram deficiência da sinalização de BKR2 em células progenitoras de pacientes com doença cardiovascular, o que poderia contribuir com o impedimento da neovascularização após isquemia nesses pacientes (KRÄNKEL et al., 2008).

## 1.7 RECEPTORES DE BRADICININA E CÂNCER

O papel potencial das cininas na progressão de cânceres tem sido avaliado, tendo em vista a habilidade das cininas de estimular o crescimento, aumentar a permeabilidade vascular, estimular a angiogênese e induzir inflamação pode contribuir para o comportamento biológico de tumores (LEEB-LUNDBERG et al., 2005).

Diversos trabalhos relatam a expressão de BKR1 em diferentes cânceres, como o de próstata (TAUB et al., 2003), renal (WANG et al., 1996), o gástrico (SAWANT et al., 2001), o carcinoma de esôfago (DLAMINI et al., 1999) e carcinoma mamário (MOLINA et al., 2009). Algumas linhagens de células tumorais, tais como PC-3, LNCaP (TAUB et al., 2003) e células de tumor astrocítico (RAIDOO et al., 1999) expressam BKR1 em sua superfície. Já o BKR2 tem sido detectado em câncer do endométrio, próstata, cervical (CLEMENTS e MUKHTAR,

1997; TAUB et al., 2003), adenocarcinoma gástrico, carcinoma pulmonar, hepatoma, linfoma e sarcoma murino S-180 (WU et al., 2002).

Greco e colaboradores (2005) demonstraram que bradicinina induz a proliferação em células oriundas de cultura primária de câncer de mama via BKR2. Recentemente, Molina e colaboradores (2009) demonstraram que a estimulação de BKR1 também induz a proliferação de células de câncer de mama sensíveis a estrógeno de forma dependente da ativação da via de sinalização de EGFR.

Utilizando células PC3 (BKR1 positivas), como modelo de estudo de câncer de próstata insensível a andrógeno, foi demonstrado que bradicinina promove o crescimento celular, a migração e a invasão através da sinalização de BKR1 (TAUB et al., 2003). Além disso, o crescimento tumoral foi inibido por antagonistas específicos de BKR1 em camundongos atímicos com tumores PC-3 (STEWART et al., 2002; STEWART et al., 2003).

Entretanto, antagonistas de BKR1 não afetaram o crescimento basal e proliferação de linhagens celulares tumorais BKR1-positivas como LNCaP e S-180 (ISHIHARA et al., 2001; REID et al., 1994; WU et al., 2002).

Stewart e colaboradores mostraram que o antagonista peptídico de bradicinina, B-9870 (CU201), e seu análogo não-peptídico BKM-570 foram capazes de estimular a apoptose, inibir a angiogênese e a ação de MMPs em camundongos atímicos com tumores de pulmão e próstata (STEWART et al., 2005). Além disso, a utilização de B-9870 combinado com quimioterápicos como doxorrubicina, etoposídeo, cisplatina, vinorelbina e paclitaxel produziu efeito sinérgico ou aditivo na inibição do crescimento de câncer de pulmão de pequenas células e combinado com paclitaxel e ZD1839 (inibidor de EGFR) em câncer pulmonar não - pequenas

células (CHAN et al., 2002). Morissette e colaboradores investigaram o complexo comportamento de B-9870 como um “*biased agonist*” (funciona ora como agonista, ora como antagonista) de BKR2 e/ou BKR1. B-9870 demonstrou ações antagonistas e parcialmente agonistas de ambos os receptores (BKR1 e BKR2) em função da expressão e densidade dos mesmos (MORISSETTE et al., 2007).

Tendo em vista que bradicinina pode estimular a proliferação de células tumorais diretamente, e também estimular a migração, invasão e angiogênese através, por exemplo, da ativação de MMPs e estimulação da liberação de VEGF, antagonistas de bradicinina podem, em tese, bloquear 3 importantes aspectos do desenvolvimento tumoral com apenas um único agente e oferecer a possibilidade de aumentar a eficácia de drogas anticâncer, sem aumentar a toxicidade (STEWART et al., 2005).

## 1.8 TRATAMENTO DO MELANOMA CUTANEO

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele que tem origem nos melanócitos e apresenta baixa prevalência, entretanto sua incidência tem aumentado no mundo nos últimos anos. Embora só represente 4% dos tipos de câncer de pele, o melanoma é o mais grave devido à sua elevada possibilidade de metástase. Para 2008 estão previstos 5.920 casos novos no Brasil, segundo a Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil (INCA, 2007). A maioria dos melanomas que são detectados e tratados precocemente é curada, entretanto doenças em estágio avançado apresentam um prognóstico extremamente ruim. A maioria dos pacientes com melanoma metastático têm sobrevida média de 6 a 9 meses (BALCH et al., 2001).

Não há nenhuma droga disponível para uso clínico que seja efetiva contra melanoma metastático. Apesar do grande número de estudos que nos últimos 20 anos investigaram diferentes regimes quimioterápicos, a dacarbazina (Dietil-triazenoimidazol carboxamida - DTIC) continua sendo o tratamento padrão (THIRLWELL e NATHAN, 2007). Dentre outros quimioterápicos utilizados no tratamento de melanoma estão temozolomida, cisplatina e paclitaxel, geralmente utilizados em regimes combinados. Outros agentes terapêuticos, como inibidores específicos de vias de sinalização, vêm sendo testados sozinhos ou em combinação com quimioterápicos, mas até agora nenhum mostrou concreta eficácia (THIRLWELL e NATHAN, 2007; MA e ADJEI, 2009).

A dacarbazina é o agente alquilante de referência no tratamento de melanoma, com resposta tumoral em aproximadamente 13-20% dos pacientes em estágios iniciais do tumor e cerca de 5% em estágios mais avançados (BUZAID, 2002; BROXTERMAN et al., 2003; EGGERMONT e KIRKWOOD, 2004). Em melanoma metastático seu efeito é reduzido, não ocorrendo remissão do tumor, mas apenas aumento de alguns meses da sobrevida livre de progressão. Dessa maneira, fica clara a necessidade de se estudar novos compostos que, em associação com quimioterápico, possam tornar mais eficiente o tratamento de melanomas.

O mecanismo de ação da dacarbazina inclui metilação e danos ao DNA, resultando em parada no ciclo celular e morte celular (D'INCAN e SOUTEYRAND, 2001; EGGERMONT e KIRKWOOD, 2004). Apesar da grande maioria dos agentes alquilantes serem imunossupressores, característica indesejada no contexto da ação antitumoral, tem sido relatado que dacarbazina é pouco imunossupressora em humanos, quando comparada, por exemplo, com a ciclofosfamida e nitrosoureas.

Além disso, alguns autores têm mostrado que DTIC interage com as células tumorais tornando-as mais imunogênicas (MITCHELL, 2004).

Uma das desvantagens do tratamento de melanoma com dacarbazina é a quimiorresistência que as células tumorais passam a apresentar. O mecanismo dessa resistência ao quimioterápico não está claro e pode estar associado a um aumento de expressão de fatores de crescimento por essas células. Células de melanoma humano tratadas com dacarbazina e fotoestimuladas apresentam um aumento na expressão de fatores angiogênicos como VEGF e IL-8. Assim, a associação de agentes anti-angiogênicos à dacarbazina para o tratamento de melanoma pode potencializar os efeitos da dacarbazina (LEV et al., 2003; LEV et al., 2004).

## 1.9 TERAPIAS ANTI-ANGIOGÊNICAS

Tradicionalmente o tratamento do câncer tem tido como alvo as células tumorais propriamente ditas, com a utilização principalmente de quimioterapia e radioterapia, além da cirurgia. Entretanto, tem crescido o número de abordagens onde o alvo da terapia não é a célula tumoral, mas células ou processos (vias de sinalização) do hospedeiro que estão relacionados ao desenvolvimento do câncer, como a angiogênese, processos inflamatórios e outros.

A inibição da angiogênese parece ser uma abordagem interessante para prevenir ou tratar o câncer. Porém, a angiogênese tumoral difere da angiogênese normal onde os vasos resultantes são mal formados, irregulares e hiperpermeáveis. Estas anormalidades resultam em fluxo sanguíneo irregular, baixa tensão de oxigênio e alta pressão intersticial de fluidos no tumor. A pressão intersticial de fluidos é

maior no centro do tumor e decresce em direção a periferia, conseqüentemente o transporte de moléculas terapêuticas é fortemente dificultado (HELDIN et al., 2004; CAIRNS et al., 2006; TEICHER et al., 2009).

Evidências recentes sugerem que terapias anti-angiogênicas podem normalizar a estrutura e função dos vasos sanguíneos, melhorando o “*delivery*” de drogas. Este efeito de normalização pode beneficiar o uso combinado de agentes anti-angiogênicos e citotóxicos (JAIN, 2005; FERRARA e KERBEL, 2005; FUKUMURA e JAIN, 2007). Por exemplo, o relativo sucesso da terapia com anticorpo anti-VEGF (Becivacizumab) no tratamento de pacientes com câncer parece não ser resultado direto de um efeito anti-angiogênico, como hipotetizado anteriormente, mas resulta principalmente da sua habilidade de modificar a fisiologia do tumor, reduzindo a pressão intersticial e aumentando a entrega da droga, e também potencialmente reduzindo a hipóxia tumoral, que é um conhecido fator de aumento da resistência a quimioterápicos (SALNIKOV et al., 2006, WILLETT et al., 2004 e WILDIERS et al., 2003; FUKUMURA e JAIN, 2007). Pacientes com melanoma têm apresentado melhor resposta à quimioterapia quando a pressão intersticial intratumoral se reduz durante o tratamento (CURTI et al., 1993). Desta maneira, intervenções terapêuticas que reduzam a pressão intersticial intratumoral poderiam aumentar a resposta aos tratamentos convencionais.

O sucesso de uma modalidade de tratamento que inclua agentes anti-angiogênicos e terapias tumorais convencionais pode ter uma complexa dependência entre dose e estratégia terapêutica: dependendo da dose, modo de ação e dinâmica de administração, a terapia anti-angiogênica pode aumentar ou reduzir o fluxo de sangue no tumor, modulando a dose do quimioterápico correntemente administrado,

possibilitando assim, teoricamente, uma redução das doses e/ou frequência dos quimioterápicos, o que resultaria em uma diminuição dos efeitos colaterais e possivelmente da resistência à droga (EICHHORN et al., 2004). Como é provável que a quimioterapia e a radioterapia continuem por muitos anos sendo as principais terapias adjuvantes contra o câncer, o desenvolvimento de metodologias mais efetivas que combinem os tratamentos existentes com drogas anti-angiogênicas torna-se cada vez mais crucial (ABDOLLAHI et al., 2005).

Dados recentes do nosso laboratório demonstraram a presença de células BKR1 positivas no microambiente tumoral de camundongos que receberam transplante de células de melanoma murino e que foram submetidos ao tratamento com dacarbazina, justificando a utilização da dacarbazina em associação a antagonistas do BKR1 em busca de uma ação sinérgica.

## 1.10 RESISTÊNCIA A DROGAS E O MICROAMBIENTE DE TUMORES SÓLIDOS

A resistência de tumores sólidos a drogas anticâncer é frequentemente atribuída a mutações e ampliações gênicas ou modificações epigenéticas que influenciam a entrada, o metabolismo ou a liberação de drogas. Uma causa importante, porém pouco apreciada, de causa de resistência é a habilidade limitada de drogas de penetrar no tecido tumoral e alcançar todas as células tumorais em concentração potencialmente letal (TRÉDAN et al., 2007).

A distribuição de drogas no tumor é frequentemente dificultada pela alta pressão intersticial de fluidos, que tem sido associada com baixa penetração de

drogas e resposta a quimioterapia em melanoma e linfoma (CURTI et al., 1993). Desta maneira, intervenções terapêuticas que reduzam a pressão intersticial intratumoral poderiam aumentar a resposta aos tratamentos convencionais.

A vascularização irregular e limitada da grande maioria dos tumores faz com que existam células muito distantes de qualquer capilar, estando, portanto, em privação de nutrientes e em hipóxia crônica. Esta situação pode levar à necrose das células, porém a maioria das células hipóxicas são ainda viáveis. Com efeito, com a morte das células localizadas próximas aos vasos – em maior contato com o quimioterápico –, o aporte de nutrientes e oxigênio às células hipóxicas melhora consideravelmente, permitindo que estas células sobrevivam e contribuam para a repopulação tumoral (HUXHAM et al., 2004; TRÉDAN et al., 2007).

Tannock e colaboradores têm mostrado por diferentes metodologias a limitada penetração de drogas, como a doxorrubicina, no tecido tumoral (TUNGGAL et al., 1999, TANNOCK et al., 2002, PRIMEAU et al., 2005; TRÉDAN et al., 2007). Por técnicas de microscopia intravital eles quantificaram e mapearam a distribuição de doxorrubicina no tumor em relação à presença de vasos sanguíneos e regiões de hipóxia e mostraram que muitas células tumorais não são expostas a droga após uma única injeção intravenosa (PRIMEAU et al., 2005).

Nesse contexto, alterações no microambiente tumoral vêm sendo apontadas como importantes causas de resistência às drogas. Nosso laboratório tem avaliado os fatores microambientais associados ao desenvolvimento do melanoma e as causas de falha no seu tratamento. Dentre esses fatores, o papel de BKR1 foi avaliado nesse trabalho.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o antagonismo do receptor de bradicinina subtipo 1 (BKR1) na progressão do melanoma murino B16-F10, analisando também a relevância dessa via no tratamento combinado com o quimioterápico dacarbazina.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos fêmeas com 6-8 semanas das linhagens C57Bl/6 ou BALB/c. Os animais foram mantidos em biotério de experimentação, em ambiente convencional controlado, com no máximo 5 camundongos por gaiola, recebendo ração e água *ad libitum*. Os animais foram eutanizados ao término dos experimentos, de acordo com as recomendações do painel de eutanásia da *American Veterinary Medical Association* (AVMA Guidelines on Euthanasia - 2007), em câmara de CO<sub>2</sub> ou com anestésicos inalatórios. Os animais C57Bl/6 do tipo selvagem, utilizados na maioria dos experimentos, foram obtidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP. Os camundongos C57Bl/6 nulizigotos para o gene do receptor de bradicinina subtipo 1 (BKR1 *Knockout* – BKR1 KO), e do tipo selvagem utilizados no mesmo experimento, foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), cedidos gentilmente pelo Dr. João Bosco Pesqueiro. Camundongos C57Bl/6 e BALB/c do tipo selvagem, utilizados nos experimentos de distribuição de droga, foram comprados do fornecedor Jax e mantidos no Biotério do Ontario Cancer Institute no Princess Margareth Hospital (Toronto, CA). O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São

Paulo (protocolo de pesquisa n. 533/04 de 14 de julho de 2004), bem como pelo comitê de ética do biotério do Ontario Cancer Institute.

### 3.2 LINHAGENS CELULARES E MANUTENÇÃO EM CULTURA

Células de melanoma murino B16-F10 foram mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma, USA), pH 7,4, suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO BRL, ARG), em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. O meio era trocado a cada 48 horas e ao atingir a confluência, as células eram lavadas com solução PBS/EDTA, pH 7,2-7,4, destacadas dos frascos com solução 0,2% de tripsina (Instituto Adolfo Lutz, BRA) e transferidas para novos frascos na proporção de 1:3 ou conforme conveniência. Alíquotas foram congeladas em soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, USA) e estocadas em nitrogênio líquido. Foram utilizadas alíquotas de células B16-F10 com diferença de no máximo 5 passagens.

### 3.3 FÁRMACOS

Foram utilizados nos ensaios os antagonistas do receptor de bradicinina do subtipo 1 (BKR1), R-954 (Ac-Orn-[Oic<sup>2</sup>, α-MePhe<sup>5</sup>, D-β-Nal<sup>7</sup>, Ile<sup>8</sup>] desArg<sup>9</sup>-Bradykinin) e R-715 (AcLys[D-β-Nal<sup>7</sup>, Ile<sup>8</sup>] desArg<sup>9</sup> Bradykinin) (IPS Pharma, CAN), adquiridos em colaboração com o Dr. Pierre Sirois (Institute of Pharmacology of Sherbrooke, CAN), o quimioterápico dacarbazina (DTIC - Sigma, USA), administrado na concentração de 2mg/kg, e o quimioterápico doxorubicina

(Pharmacia, CAN), fornecido pela farmácia do Hospital Princess Margaret na concentração de 2mg/mL. Composto fluorescente DIOC-7 (3,3' - Diheptyloxacarbocyanine iodide) (AnaSpec Inc.,USA).

### 3.4 REGIMES DE TRATAMENTO

#### 3.4.1 Regime de tratamento com o quimioterápico dacarbazina (DTIC)

Camundongos do tipo selvagem e nocautes para BKR1 foram tratados com 2mg/Kg de DTIC injetados intraperitonealmente (i.p.) a cada três dias após a implantação tumoral (dias 3, 6, 9 e assim por diante), ou com PBS, como controle. Células de melanoma murino B16-F10 foram injetadas ( $5 \times 10^5$  células/animal) subcutaneamente (s.c.) no flanco direito dos animais (dia 0). O tratamento foi realizado por 4 ciclos de quimioterapia (12º dia), após o qual os animais foram mortos e os tumores removidos cirurgicamente, ou até os tumores atingirem o volume de  $1\text{cm}^3$ .

#### 3.4.2 Regime de tratamento com o antagonista R-954

O tratamento dos animais com o antagonista do BKR1, R-954, foi iniciado 24 horas antes da implantação tumoral (dia -1). Foi administrado subcutaneamente 1mg/kg de R-954, diariamente em cada animal por até 10 ou 13 dias após o implante tumoral quando eles foram sacrificados. Células de melanoma murino B16-F10 foram injetadas ( $5 \times 10^5$  células/animal) subcutaneamente no flanco dos animais (dia 0). Os animais do grupo controle receberam uma injeção subcutânea diária de 100µL

de PBS. O tratamento foi realizado até o 10º, 12º ou 13º dia, de acordo com o experimento, após o qual os animais foram mortos e os tumores removidos cirurgicamente.

### 3.4.3 Regime de tratamento com R-954 e DTIC

O tratamento dos animais com R-954 (1mg/kg s.c.) foi iniciado 24 horas antes da implantação tumoral (dia -1) e com o quimioterápico dacarbazina (DTIC- 2mg/Kg i.p.) a cada três dias após a implantação tumoral (dias 3, 6, 9 e assim por diante). Células de melanoma murino B16-F10 foram injetadas ( $5 \times 10^5$  células/animal) subcutaneamente (dia 0). Foram avaliados 4 grupos experimentais: controle, animais tratados somente com PBS (injeções diárias s.c.); DTIC, animais tratados com DTIC i.p a cada 3 dias e diariamente com PBS s.c.; R-954, animais tratados com doses diárias de R-954 s.c. e doses de PBS i.p a cada 3 dias; R-954 + DTIC, animais tratados com doses diárias de R-954 s.c. e com DTIC i.p a cada 3 dias. O tratamento foi realizado por 4 ciclos de quimioterapia (12º dia), após o qual os animais foram mortos e os tumores removidos cirurgicamente, ou até os tumores atingirem o volume de  $1\text{cm}^3$ .

## 3.5 ANÁLISE DA CINÉTICA DE SURGIMENTO E CRESCIMENTO TUMORAL

Os animais foram observados diariamente para que fossem acompanhados o aparecimento e o crescimento do tumor. As dimensões do tumor, aproximadamente

elipsóide, foram mensuradas com o auxílio de um paquímetro, determinando-se o tamanho do maior e do menor eixo da elipse. O volume do tumor foi então calculado utilizando-se a fórmula  $V=0.52 \times (\text{eixo menor})^2 \times \text{eixo maior}$ .

### 3.6 HISTO E IMUNOISTOQUIMICA DE TUMORES B16-F10 IMPLANTADOS SUBCUTANEAMENTE EM CAMUNDONGOS C57BL-6

Os fragmentos tumorais removidos cirurgicamente ao final dos regimes de tratamentos já descritos, foram fixados em solução de formol 10% em PBS durante 24hs, lavados com PBS, cortados em fragmentos menores e descalcificados em solução de ácido nítrico 5% durante 6hs. Após lavagem em água corrente, os fragmentos foram desidratados em gradiente crescente de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Cortes de 3 $\mu$ m de espessura foram coletados em lâminas silanizadas e usados para coloração de hematoxilina e eosina (H&E) e/ou reações imunoistoquímicas.

Foi realizado ensaio imunoistoquímico para localização do marcador de células endoteliais CD34. Antes do início da imunomarcção, as lâminas foram mantidas por 24hs em estufa a 60°C, desparafinizadas (xilol a 60°C por 20 minutos; xilol à temperatura ambiente por 20 minutos; etanol 100% por 30 segundos; etanol 85% por 30 segundos e etanol 70% por 30 segundos) e lavadas em água corrente. Foi realizada a recuperação dos sítios antigênicos fervendo-se as lâminas em tampão citrato de sódio a 10mM pH 6.0, em panela de pressão (Eterna®, Nigro), durante 4 minutos. Após a fervura, a panela de pressão foi mantida fechada sob água corrente

por 10 minutos e aberta à temperatura ambiente por mais 10 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente.

Foi realizado o bloqueio de peroxidase endógena com  $H_2O_2$  a 3% em água destilada com 4 trocas de 5 minutos cada, lavagem em água corrente e água destilada. Após lavagem em PBS 10mM pH 7,4 por 5 minutos, foi realizado o bloqueio de cargas e sítios inespecíficos com soro normal de cavalo ou bode (de acordo com o anticorpo) a 5% (Vector, USA) diluído em PBS contendo albumina bovina a 1% (BSA – Sigma, USA) e azida sódica a 0,1% por 20 minutos a 37°C em câmara úmida. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpos primários anti-CD34 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA), diluídos em PBS (1:100) contendo BSA 1% e azida sódica 0,1% durante 28 horas a 4°C em câmara úmida.

Após a incubação foram realizadas 3 lavagens de 3 minutos com PBS e em seguida foi realizada a incubação com anticorpo secundário anti-IgG de cabra biotilado (Vector Laboratories, USA) diluído em PBS (1:200), por 30 minutos à 37°C. Decorrido este período, os cortes foram novamente lavados em PBS, com 3 trocas de 3 minutos cada, e a atividade da peroxidase revelada com 60mg de 3-3'diaminobenzidina (DAB – Sigma, USA) diluído em 100mL de PBS, contendo 1mL de  $H_2O_2$  a 6% e 1mL de Dimetilsulfóxido, durante 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. A oxidação da DAB resulta em um produto de reação castanho.

Após lavagem em água corrente e água destilada por 3 minutos, os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris por 1 minuto, desidratados em gradiente de etanol (etanol 85%, 30 segundos; etanol 95%, 30 segundos; etanol 95%, 30 segundos; etanol 100%, 30 segundos), diafanizados (xilol, 4 banhos de 30 segundos cada) e montados em Entelan (Merck, DEU). O material foi observado ao

microscópio de luz. O controle negativo da reação foi realizado omitindo-se o anticorpo primário.

### 3.7 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Os fragmentos tumorais obtidos de animais controle e tratados submetidos à imunistoquímica foram observados ao microscópio de luz (Nikon Eclipse E600) para análise qualitativa e as imagens foram adquiridas com a câmera digital DXM 1200F (Nikon) e visualizadas pelo programa Eclipse Net (Nikon) para a análise morfométrica.

A massa tumoral total de cada fragmento foi analisada, totalizando cerca de 6 a 15 campos (micrografias) de cada espécime, de acordo com o tamanho do fragmento tumoral. Cada fragmento tumoral representa um tumor proveniente de um animal. As micrografias foram feitas com aumento de 100x nas lâminas coradas com hematoxilina e eosina, nas quais foram realizadas as análises de áreas necróticas e hemorrágicas no microambiente tumoral. Foi feita a contagem manual dos pontos sobre áreas necróticas, hemorrágicas e tumorais com o auxílio de um retículo de pontos.

A morfometria de vasos sanguíneos neoformados na massa tumoral foi feita nas lâminas imunomarcadas com CD34. Foram analisados cerca de 20 campos em cada fragmento tumoral e as micrografias foram feitas com aumento de 200x. O cálculo das áreas vascular e tumoral foi feito com o auxílio do retículo já citado. Os resultados foram expressos em termos de número de vasos por unidade de área

tumoral e área relativa ocupada pelos vasos, apenas em áreas tumorais livres de necrose.

### 3.8 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL, QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE QUALITATIVA.

Após remoção cirúrgica, o tumor de cada animal foi individualmente lavado em PBS e embebido em 1mL de Trizol (GIBCO BRL, DEU). Cada amostra tumoral foi rapidamente homogeneizada em Politron e a fração solúvel transferida para tubos de minicentrífuga para centrifugação (2.600rpm, 15 minutos, 4°C). Os sobrenadantes foram então transferidos para novos tubos e mantidos a temperatura ambiente por 5 minutos para a dissociação completa de complexos nucleoproteína. Adicionou-se 200µL de clorofórmio, homogeneizou-se por inversão e incubou-se a temperatura ambiente por 2 minutos. Em seguida centrifugou-se a 12000xg por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação observaram-se 3 fases: a fase aquosa, onde se encontra o RNA, a interface, que contém proteínas e DNA e a fase com fenol clorofórmio. Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo e adicionou-se 500µl de álcool isopropílico para precipitar o RNA. Os tubos foram então incubados por 16 horas a -20°C. Após este período, centrifugou-se os tubos a 11000xg por 10 minutos a 4°C, lavou-se o pellet com etanol 75%, e centrifugou-se a 7500xg por 5 minutos a 4°C. As amostras foram então dissolvidas em água DEPEC (água tratada com o inibidor de RNase, dietilpirocarbonato - MERCK) e incubadas por 10 minutos a 60°C para permitir a

completa dissolução do RNA. Em seguida, as mesmas foram mantidas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso.

A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro a 260 nm e 280 nm. Para cada  $1\mu\text{L}$  de amostra foram acrescidos  $200\mu\text{L}$  de água milli-Q autoclavada e a leitura foi feita no espectrofotômetro *GeneQuant Pro* (GE Healthcare, USA). Para os experimentos de microarranjo foram considerados RNAs de qualidade aqueles que apresentaram a razão O.D.260/O.D.280 entre 1,7 e 2,1. Além disso, a integridade do RNA total foi confirmada após eletroforese em gel analítico de agarose (agarose 0,8%, MOPS (3-(N-morfolino)-ácido propanosulfônico) 1X, formaldeído 5%,  $1\mu\text{L}$  de brometo de etídeo  $0,5\text{mg/mL}$  e  $\text{H}_2\text{O}$  milli-Q autoclavada) com a visualização das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S, 18S e 5S íntegras. Assim, para cada  $1\mu\text{L}$  da amostra adicionou-se  $8\mu\text{L}$  de tampão de RNA 5X (50% glicerol, 1mM EDTA, pH 8,0, 0,25% bromofenol blue, 0,25% xileno cianol) sob o gelo. Em seguida, as amostras foram aquecidas em banho seco a  $65^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos para denaturação. A eletroforese foi feita a 100V durante 2 horas em tampão MOPS 1X. A visualização das bandas ribossomais foi feita em transiluminador.

### 3.9 OBTENÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DO RNA MENSAGEIRO

O RNA mensageiro poli A+ foi isolado a partir do RNA total extraído dos tumores utilizando-se o kit Oligotex (QIAGEN, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O procedimento de purificação utiliza condições de lise denaturante rigorosas para gerar um ambiente livre de RNase para o isolamento de mRNA

intacto. A resina Oligotex consiste de partículas de látex-poliestireno de tamanho uniforme com oligonucleotídeos dC<sub>10</sub>T<sub>30</sub> ligados covalentemente à sua superfície. As partículas formam uma suspensão estável que tem uma grande área de superfície para ligação eficiente de ácidos poliadenílicos, que são posteriormente separados em colunas por centrifugação.

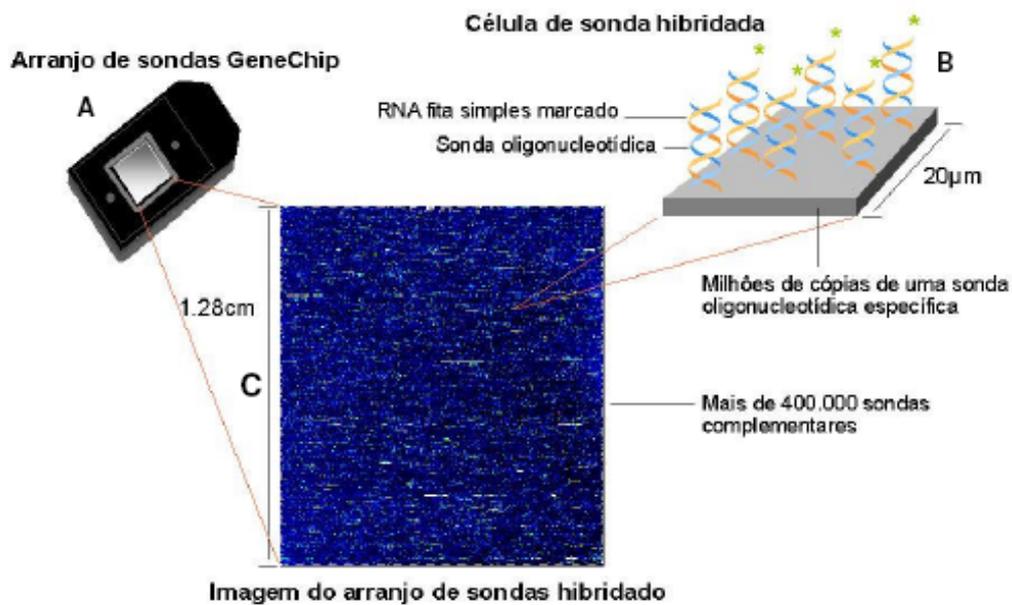
Foi utilizado o kit mRNA Nano Series II (Agilent 2100). Foi colocado 550µL de matriz de gel em um microtubo com filtro e centrifugado por 1500rpm por 10 minutos. Alíquotas de 65µL de gel filtrado foram “vortexadas” com mais 1µL de corante e centrifugado por 13.000rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Foram aplicados 9µL do mix gel-corante nos orifícios indicados do NanoChip. Após 30 segundos foi aplicado 5µL de marcador (RNA 6000 Nano Marker), 1µL de RNA 6000 Ladder e 1µL de amostra em cada um dos orifícios para amostras. O chip foi vortexado por 1 minuto a 2400rpm e analisado no Agilent Bioanalyzer 2100.

### 3.10 MICROARRANJO DE SONDAS OLIGONUCLEOTÍDICAS

Os experimentos de microarranjos foram realizados com a plataforma e kits da Affymetrix. Os arranjos de sonda GeneChip® (Affymetrix, USA) são fabricados utilizando uma tecnologia que combina fotolitografia e química combinatorial. Centenas de milhares de sondas oligonucleotídicas diferentes são sintetizadas em cada arranjo. Cada oligonucleotídeo está localizado em uma área específica do arranjo chamada de célula de sonda. Cada célula de sonda contém milhões de cópias de um determinado oligonucleotídeo (sonda), como mostra a figura 2.

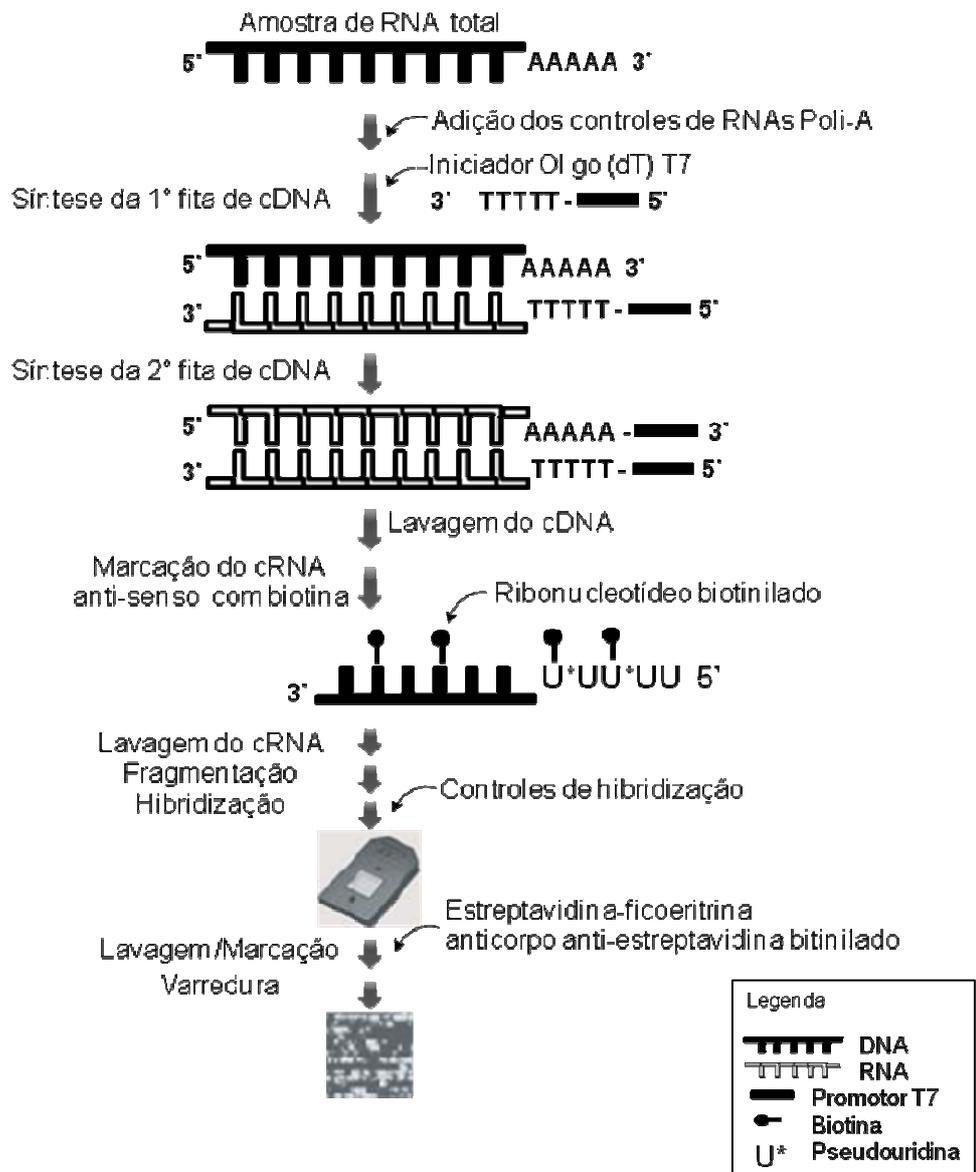
Cada gene é representado por dois conjuntos de até 20 sondas oligonucleotídicas, cada sonda correspondendo a um fragmento do gene. Um dos conjuntos contém oligonucleotídeos com seqüência idêntica à do gene e complementar ao RNAm; essas sondas são chamadas *Perfect Match* (PM). Já o outro conjunto contém oligonucleotídeos contendo uma única mutação em relação à seqüência do gene; são chamados *Mismatch* (MM). A relação entre a intensidade de sinal das sondas PM e MM indica se um gene está sendo expresso (“ligado”) ou não (“desligado”) na célula ou tecido em uma determinada situação experimental. Este sinal tende a ser proporcional à abundância do RNA na amostra, até certa concentração de transcritos.

Utilizamos os arranjos GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix, USA) que contém 45.000 conjuntos de sondas que permitem a análise do padrão de expressão de mais de 39.000 transcritos e variantes de 34.000 genes bem caracterizados de camundongos.



**Figura 2.** Representação esquemática de um arranjo de sondas GeneChip® (Affymetrix, USA) mostrando (A) um cassete contendo o arranjo, (B) uma célula de sonda e (C) uma imagem real de um arranjo após hibridação.

As reações descritas nos próximos tópicos foram realizadas para 12 amostras de RNAs mensageiros, provenientes de tumores de camundongos tratados com PBS, DTIC, R-954 e R-954 combinado à DTIC. A figura 3 ilustra de maneira simplificada todas as etapas do experimento com microarranjos.



**Figura 3.** Esquema ilustrativo das etapas do microarranjo de oligonucleotídeos.

### 3.10.1 Obtenção do cDNA fita dupla

O kit One-Cycle cDNA Synthesis (Affymetrix, USA) foi utilizado para a obtenção do cDNA fita dupla a partir do RNA mensageiro. A reação de síntese da primeira fita de cDNA foi feita incubando-se à 70° C por 10 minutos: 1µg de RNA

mensageiro; 2µL de RNA poli- A controle diluído 1:50; 2µL de T7 Oligo(dT) Primer (50µM) e água livre de RNase para completar um volume de 12 µL. Após resfriar a reação a 4° C por pelo menos 2 minutos foi adicionado 4 µL de tampão 5X de reação da primeira fita; 2 µL de DTT 0,1M e 1µL de dNTP 10mM, misturado bem e incubado a 42° C por 2 minutos. Foi adicionado 1µL de SuperScript II, misturado e incubado a 42° C por 1 hora, em seguida resfriado por 2 minutos.

Ao final da reação de síntese da primeira fita foi adicionado 91µL de água livre de Rnase; 30µL de tampão 5X de reação da segunda fita; 3µL de dNTP 10mM, 1µL de DNA ligase de *E. coli*; 4µL de DNA polimerase I de *E. coli* e 1µL de Rnase H, misturado bem e incubado a 16° C por 2 horas. Em seguida foi adicionado 2µL de T4 DNA polimerase e incubado por 5 minutos a 16° C. Após a incubação com T4 DNA polimerase foi adicionado 10µL de EDTA 0,5M.

### 3.10.2 Purificação do cDNA fita dupla

A purificação do cDNA fita dupla foi feita com o kit Clean-up ModuLe for One Cycle/Two Cycle Labeling Assays (Affymetrix, USA). Após a síntese da fita dupla de cDNA foi adicionado 600µL de tampão de ligação de cDNA, votexado por 3 segundos, transferido para uma coluna de purificação (cDNA *cleanup spin column*) e centrifugado a 10.000rpm por 1 minuto. A coluna foi transferida para um novo microtubo vazio, adicionado 750µL de tampão de lavagem e centrifugado a 10.000rpm por 1 minuto. A coluna foi transferida para um novo microtubo vazio,

adicionado 14 $\mu$ L de tampão de eluição de cDNA à coluna, incubado a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugado a 14.000rpm por 1 minuto para eluição.

### 3.10.3 Síntese do cRNA marcado com biotina

A síntese do cRNA marcado com biotina foi realizada com o kit GeneChip IVT labeling (Affymetrix, USA). Aos 9 $\mu$ L do cDNA eluídos no passo anterior foi adicionado 11 $\mu$ L de água livre de RNase, 4 $\mu$ L de tampão de marcação IVT (*in vitro* transcription), 12 $\mu$ L de mix de ribonucleotídeo-3-fosfato (rNTP) marcado e 4 $\mu$ L de enzima de marcação IVT, misturados e incubados a 37°C por 16 horas. O cRNA marcado pode ser estocado a -20°C, a -70°C ou imediatamente purificado.

### 3.10.4 Purificação e quantificação do cRNA marcado

A purificação e a fragmentação do cRNA marcado foram realizadas com o kit Sample Cleanup module (Affymetrix, CA, USA). Foi adicionado 60 $\mu$ L de água livre de RNase à reação do IVT e vortexado, em seguida foi adicionado 350 $\mu$ L de tampão de ligação de cRNA IVT e também misturado por vortexação. A seguir foi adicionado 250 $\mu$ L de etanol 100% ao lisado e misturado bem por pipetagem. A amostra (700 $\mu$ L) foi adicionada dentro da coluna de purificação (IVT cRNA Cleanup Spin Column) acoplada a um microtubo de 2mL e centrifugada a 10.000rpm por 15 segundos. A coluna foi transferida para um novo tubo de coleta, foi adicionado dentro da coluna 500 $\mu$ L de tampão de lavagem de cRNA e centrifugado a 10.000rpm por 15 segundos. O processo de lavagem foi repetido com 500 $\mu$ L etanol 80% e uma

centrifugação adicional de 5 minutos a 14.000rpm com os microtubos abertos. A coluna foi transferida para novos microtubos, pipetado 11 $\mu$ L de água livre de Rnase diretamente na membrana da coluna e centrifugado por 1 minuto a 14.000rpm para eluição. Foi pipetado mais 10 $\mu$ L de água na membrana da coluna e centrifugado por 1 minuto a 14.000rpm. Para a quantificação foi feita uma diluição de 1:200 do cRNA marcado eluido da coluna e este foi analisado no Agiliente Bionalyzer 2100, como descrito anteriormente. Uma alíquota de cRNA foi separada para análise em gel de agarose.

### 3.10.5 Fragmentação do cRNA marcado com biotina

A fragmentação do cRNA foi feita de modo a se obter fragmentos de 35 a 200pb. Cerca de 20 $\mu$ g de cRNA marcado foi incubado com 8 $\mu$ L de tampão de fragmentação e água livre de Rnase para um volume final de 40 $\mu$ L a 95°C por 35 minutos em seguida resfriado no gelo. Uma alíquota de cRNA fragmentado foi separada para quantificação e análise em gel de agarose.

### 3.10.6 Hibridização do cRNA aos oligonucleotídeos do chip

A hibridização foi realizada com o kit GeneChip Hybridization, Wash and Stain kit e GeneChip Eukaryotic Hybridization Control (Affymetrix, USA). 15 $\mu$ g de cRNA marcado foram adicionados a 5 $\mu$ L de oligonucleotídeos controle B2 3 nM, 15 $\mu$ L de controles de hibridização (descritos a seguir), 2 $\mu$ L de tampão de hibridização (100 mM MES, 1M [Na<sup>+</sup>], 20 mM EDTA, 0.01% Tween-20), 30 $\mu$ L de

DMSO 10% e água para completar um volume de 300µL. O *cocktail* de hibridização foi incubado a 99°C por 5 minutos. Enquanto isso, o arranjo foi preenchido com 200µL de tampão de pré-hibridização, através de um dos septos (inferior), e incubado a 45°C por 10 minutos a 60rpm no forno de hibridização (GeneChip Hybridization Oven 640 - Affymetrix). O *cocktail* de hibridização foi transferido do banho seco a 99°C para 45°C e incubado por mais 5 minutos. Em seguida centrifugado a 14.000rpm por 5 minutos. O chip foi retirado do forno de hibridização e uma ponteira de 200µL foi encaixada no septo superior para que o ar pudesse sair e através do septo inferior o tampão de pré-hibridização foi extraído do chip. Por este mesmo septo o *cocktail* de hibridização foi inserido no chip e este foi incubado a 45°C por 16 horas a 60rpm no forno de hibridização.

### 3.10.7 Lavagem, coloração e escaneamento do chip

Para lavagem e coloração foi utilizada a estação fluídica GeneChip Fluidic Station 450 (Affymetrix, USA) que é operada pelo programa GCOS/Microarray Suite. A estação fluídica deve ser carregada previamente com os tampões de lavagem.

Após as 16 horas de hibridização dos arranjos, o *cocktail* de hibridização foi retirado do chip com uma pipeta, através do septo, e este foi preenchido com 250 µL de tampão de lavagem A (900mM NaCl, 60mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6mM EDTA, 0.01% Tween-20). Para cada array foi aliqotado em microtubos de 1,5mL: 600µL do *cocktail* de coloração 1 (100mM MES, 1M [Na<sup>+</sup>], 0.05% Tween-20, BSA 2mg/mL, Ficoeritrina/Estreptavidina 10µg/mL); 600µL do *cocktail* de coloração 2 (100 mM

MES, 1M [Na<sup>+</sup>], 0.05% Tween-20, BSA 2mg/mL, IgG de cabra 0,1mg/mL, anticorpo anti-estreptavidina biotilado 3µg/mL feito em cabra); 800µL do tampão de escaneamento do arranjo (não fornecido) e estes foram encaixados nos locais indicados na estação fluídica. Cada estação fluídica tem capacidade para lavar e corar 4 arranjos por vez. Protocolo de lavagem e coloração: Cada chip foi submetido a 10 ciclos de 2 lavagens com tampão de lavagem A à 30°C; 6 ciclos de 15 lavagens com o tampão B (100 mM MES, 0.1M [Na<sup>+</sup>], 0.01% Tween-20) à 50°C; as sondas do arranjo foram marcadas por 5 minutos com *cocktail* de coloração 1 à 35°C; 10 ciclos de 4 lavagens com tampão de lavagem A à 30°C; as sondas do arranjo foram marcadas por 5 minutos com *cocktail* de coloração 2 à 35°C; em seguida por mais 5 minutos com *cocktail* de coloração 3 à 35°C; 15 ciclos de 4 lavagens com tampão de lavagem A à 35°C e por ultimo o arranjo foi preenchido com tampão de escaneamento. Ao final do processo de lavagem e coloração os chips foram retirados da estação de lavagem e verificados quanto a presença de bolhas de ar, que foram retiradas com tampão de escaneamento quando presentes.

Os arranjos foram escaneados no GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix, USA), após 10 minutos de aquecimento do mesmo, que é operado pelo programa GCOS/Microarray Suite.

### 3.11 CONTROLES DO MICROARRANJO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

O controle de qualidade é um passo crucial para o sucesso da análise dos dados do microarranjo: antes de qualquer comparação é necessário checar se há

problemas com o processamento das amostras e verificar se os arranjos apresentam qualidade suficiente para serem incluídos no estudo e comparados. Através do algoritmo MAS 5.0 que faz parte da biblioteca de funções analíticas “Simpleaffy”, do pacote de *softwares* de análise de microarranjos denominado Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>) são avaliados os seguintes parâmetros: Média da fluorescência basal; Fator de escala (*Scale factor*); Número de genes presentes; Razões 3’: 5’ dos genes  $\beta$ -actina e GAPDH; Controles de hibridização internos. Além disso, ao longo do processo de marcação e hibridização são adicionados outros controles (controles externos), como mostra a tabela 1.

**Tabela 1.** Controles de hibridização do GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array

<b>Origem do organismo</b>	<b>Nome do gene</b>	<b>Finalidade</b>
Sintético	Oligo B2	Alinhamento do <i>grid</i> .
<i>E.coli</i>	<i>bioB</i> <i>bioC</i> <i>bioD</i>	cRNA anti-senso biotilado utilizado como controle de hibridização.
P1 Bacteriófago	<i>cre</i>	
<i>B. subtilis</i>	<i>lys</i> <i>Phe</i> <i>Thr</i> <i>Dap</i>	RNA-poli A senso utilizado como controle da marcação e da hibridização.

Os oligos B2 são controles positivos da hibridização e são usados pelo software para ajustar um *grid* sobre a imagem. É formado um padrão alternante de intensidade de fluorescência nas bordas (figura 4). Os cRNAs anti-senso biotilado dos genes *bioB*, *bioC*, *bioD* e *cre* são utilizados como controle de hibridização. *Bio b* esta no limite da sensibilidade do ensaio e deve estar presente em aproximadamente

50% das amostras, *bioC*, *bioD* e *cre* devem estar presentes em intensidades crescentes refletindo suas concentrações (1.5pM, 5pM, 25pM, and 100pM). Os controles de hibridização podem ser usados indiretamente para verificar a qualidade das amostras entre as replicatas. *Dap*, *lys*, *phe*, *thr*, and *trp* são genes do *Bacillo subtilis* que foram modificados pela adição de cauda poli-A. Uma mistura dos RNAs desses genes em concentrações definidas é marcada e hibridizada junto com a amostra. Todos os controles de Poli-A devem estar presentes com sinal crescente na seguinte ordem: *lys*, *phe*, *thr*, *dap*.



**Figura 4.** Desempenho do oligo B2. a) Exemplo de iluminação (escaneamento) das extremidades do arranjo b) Nome do arranjo localizado no meio do mesmo.

### 3.12 NORMALIZAÇÃO DOS DADOS DO MICROARRANJO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

O padrão de expressão gênica dos tumores cujos camundongos foram tratados com PBS (controle), DTIC, R-954 e R-954 combinado à DTIC foram analisados por microarranjos de oligonucleotídeo. Utilizamos os microarranjos GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix, USA) que contém 45.000 conjuntos de sondas

que permitem a análise do padrão de expressão de mais de 39.000 transcritos e variantes de 34.000 genes bem caracterizados de camundongos.

Os arquivos em formato (.cel), contendo valores referentes à intensidade de sinal capturado pelo *scanner* para cada sonda, foram normalizados pelo método RMA (*Robust Multi-Array Analysis*). Este método faz parte da biblioteca de funções analíticas “Affy”, do pacote de *softwares* de análise de microarranjos denominado Bioconductor (GENTLEMAN et al., 2004; GAUTIER et al., 2004). O método de análise RMA consiste de quatro etapas (IRIZARRY et al., 2003):

a) **Eliminação da fluorescência basal**

b) **Normalização:** A etapa de normalização visa a atenuação de erros sistemáticos inerentes a complexidade do procedimento e consiste, no método RMA, na equiparação da distribuição dos valores de intensidade das sondas das diversas hibridações realizadas (método de normalização por *quantiles*).

c) **Eliminação da hibridização inespecífica:** a complexidade da composição qualitativa de uma amostra de RNAm é muito grande, e uma determinada sonda de 25 nucleotídeos pode hibridar com outros alvos, diferentes daquele perfeitamente complementar. Para diminuir esse componente de erro, o GeneChip contém as sondas MM (*mismatch*), conforme descrito na introdução, as quais podem ser utilizadas para quantificar a hibridização inespecífica. No entanto, o método RMA não utiliza as sondas MM, pois o tratamento matemático da informação destas sondas ainda não está bem estabelecido, incorporando erros no processo de análise.

d) **Transformação dos dados:** na arquitetura do GeneChip, cada gene é avaliado por um conjunto de aproximadamente 16 sondas, as quais apresentam distintas constantes de afinidade pelo alvo e, conseqüentemente, diferentes níveis de

intensidade do sinal. Para que a medida final de intensidade represente uma quantificação do nível de RNAm presente na amostra hibridada, é necessário a transformação dos valores de intensidade, referentes às 16 sondas, em um único valor de intensidade final. No método RMA, isso é obtido através da técnica de alisamento por medianas (*median polish*).

Ao final do processo do método RMA, é obtido um valor numérico relativo à concentração do RNAm na amostra alvo, para cada um dos genes avaliados pelo GeneChip.

### 3.13 SELEÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

Para a seleção dos genes diferencialmente expressos (DEGs) foram utilizados dois métodos diferentes: o Teste- *T Student* do programa MeV- *MultiExperiment Viewer* (SAEED et al., 2003) e o pacote Limma (SMYTH, 2005) do Bioconductor, ambos definidos com o valor de  $p < 0,05$ . O algoritmo Limma utiliza métodos Bayesianos empíricos para fornecer resultados estáveis, mesmo quando o número de matrizes é pequeno. A estatística T é a distância entre duas amostras em unidades de desvio padrão. Um pequeno valor de  $p$  indica que a hipótese de expressão diferencial não é verdade e o gene é diferencialmente expresso.

Estes dois métodos foram executados para cada uma das análises:

- PBS x DTIC
- PBS x R-954
- PBS x R+D
- DTIC x R+D

- R-954 x R+D

A normalização dos dados foi feita separadamente para cada uma das análises citadas acima com o objetivo de evitar que valores de expressão das condições R-954 pudessem influenciar nos valores das condições DTIC - quando comparadas com a condição controle PBS, por exemplo.

Desenvolvemos uma macro no Microsoft Excel para a identificação dos DEGs comuns aos métodos Teste-T e Limma e para adicionar anotação a cada gene. O arquivo de anotação da placa Mouse Genome 430A 2.0 foi obtido do site da Affymetrix.

### 3.14 AGRUPAMENTOS DOS DADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA

O agrupamento hierárquico tem como finalidade reunir os genes presentes em um microarranjo com base nas variações de expressão sofridas por eles tanto em uma hibridização como entre hibridizações de uma ou mais amostras biológicas. Tal método possibilita identificar genes em que a expressão varia de maneira correlacionada, o que pode refletir em vias comuns de regulação entre esses genes.

A análise de agrupamentos dos genes diferencialmente expressos foi feita com os algoritmos de agrupamento hierárquico; K-means, SOM (*Self-organizing map*), disponíveis no programa MeV - MultiExperiment Viewer (<http://www.tm4.org/mev.html>) e SAMBA (agrupamento bidimensional), disponível no programa Expander (SHAMIR et al., 2006). Para o agrupamento hierárquico foi utilizado o método de ligação média. Os algoritmos K-means e SOM foram executados várias vezes com diferentes valores definidos para  $k$  e para a matriz do

SOM e ambos definidos com a distância Euclidiana, que leva em conta a magnitude das diferenças, podendo variar de zero, para amostras totalmente semelhantes, até teoricamente  $+\infty$ . A definição de diferentes dimensões destes algoritmos permitiu observar o comportamento dos genes em diferentes cenários, também foi possível buscar melhor homogeneidade dos genes nos grupos e heterogeneidade entre grupos.

### 3.15 DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO GÊNICA E QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL.

Os oligonucleotídeos utilizados foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 Input ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). Os oligonucleotídeos senso e anti-senso foram desenhados em diferentes exons para evitar amplificação de DNA genômico. A amplificação específica de cada gene por esses iniciadores foi verificada por meio do programa *Blast - Basic Local Alignment Search Tool* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) e a formação de estruturas secundárias entre os iniciadores foi verificada no programa OligoTech (Versão 1.0) (<http://www.oligotech.com/OLIGOTech.HTM>).

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de PCR em tempo real.

Referência no NCBI	Oligonucleotídeos	Sequência (sentido 5'→3')	Amplicon (pb)
NM 007393.2	$\beta$ -actina	Senso CTGTGGCATCCACGAAACTA Antisenso AGTACTTGCGCTCAGGAGGA	188 pb
NM 007539	BKR1	Senso GGTCCAGGTGAGAGTGATCCA Antisenso G TTCAGGCAGCTGTTGACAAAA	100pb
NM 009846.2	CD24	Senso GTAAATCTGCGTGGGTAGGAG Antisenso CGAGCTTAGCAGATCTCCACT	139pb
NM 010217.1	CTGF	Senso CTTGGCGATTTTAGGTGTCC Antisenso TGCAGACTGGAGAAGCAGAG	110pb
NM 010478.2	HSPA1B	Senso GATGACCATCTCCAGGGAAC Antisenso TGC ACTGTACCAGGGGATTA	136pb
NM001077404.1 001077404.1	NRP2	Senso GGGGAGAGGGCTATGAAGAT Antisenso AGCCCCTGAGGTAGAGGAAG	141pb
NM 023785.2	PPBP	Senso TGAATGGGATTCCAGAGATG Antisenso CCTGCCCACTTCATAACCTC	149pb
NM 008871.2	SERPINE1	Senso CCGAACCACAAAGAGAAAGG Antisenso CAAAAGGTCAGGATCGAGGT	125pb
NM 011157.2	SRGN	Senso GAACTGCATCGAGGAGAAGG Antisenso CCCGAACCTGACCCATAGT	280pb
NM 009373.3	TGM2	Senso CTTTCCGATCCCCTGTATGA Antisenso GTGGAGGCCAATATCAGTCG	396pb

### 3.16 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

Inicialmente as reações foram padronizadas por meio de curvas de determinação da eficiência da amplificação dos iniciadores onde foram testadas concentrações crescentes de iniciadores (5 a 500nM) com uma concentração fixa de cDNA. Foram realizadas também curvas de calibração das amostras, onde concentrações crescentes (1,6 a 1000ng) da amostra de referência (cDNA de melanoma murino) foram testadas, considerando-se a eficiência da amplificação entre 0,9 e 1,0. Foram determinadas assim as quantidades ideais de iniciadores e de amostra a serem utilizadas nos ensaios. Este processo foi realizado tanto para a

amostra utilizando os iniciadores alvo como para a amostra com uso dos iniciadores do gene constitutivos  $\beta$ -actina.

A quantificação dos RNA alvos foi normalizada em relação à quantificação do genes da  $\beta$ -actina. Os ensaios foram realizados em duplicata no aparelho Rotor-Gene RG 3000 (Corbett Research, USA) e foi aceita uma variação entre as duplicatas menor que 1,5 no seu Ct (ciclo do *Threshold*), de acordo com as instruções do fabricante do aparelho. Além disso, em todos os ensaios havia uma mesma amostra chamada de amostra referência e um controle negativo o qual não continha cDNA.

Para cada reação foram misturados: 20mM de Tris-HCl (pH8,4), 50mM de KCl, 200 $\mu$ M de dNTP; 5% de DMSO; 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 1,5x de SYBR Green; 1,5U de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA) e as quantidades determinadas de oligonucleotídeos senso e anti-senso para o gene a ser quantificado e o cDNA da amostra ou referência em um volume final de 20 $\mu$ l. As amostras foram amplificadas com uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização a 59°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 40 segundos. A curva de desnaturação foi realizada variando a temperatura no intervalo de 72°C a 95°C, sendo 1°C por etapa. As amostras foram analisadas em gel de agarose 1,5% juntamente com o marcador de DNA de 100pb “DNA ladder”.

Os resultados das PCRs em tempo real foram analisados com auxílio do programa Rotor-Gene 6 versão 6.0 (Corbett Research). Os resultados obtidos foram normalizados por meio do modelo matemático proposto por Pfaffl (PFAFFL, 2001):

$$R = (E_{\text{alvo}})^{\Delta CT_{\text{alvo}}} / (E_{\text{normalizador}})^{\Delta CT_{\text{normalizador}}}$$

Onde E alvo corresponde à eficiência da amplificação dos oligonucleotídeos para o gene alvo e E normalizador corresponde à eficiência da amplificação dos oligonucleotídeos para o gene normalizador ( $\beta$ -actina). As eficiências foram calculadas como  $10^{(-1/\text{slope})}$ , sendo que o slope corresponde à inclinação da reta obtida quando se analisa a variação do CT em função do log de diferentes quantidades de cDNA e uma eficiência de 100% da reação equivale a 2. O  $\Delta\text{CT}_{\text{alvo}}$  é a média do CT do gene alvo na amostra referência subtraída da média do CT da amostra alvo. O  $\Delta\text{CT}_{\text{normalizador}}$  por sua vez, é a média do CT do gene normalizador na amostra referência subtraída da média do CT da amostra normalizadora.

### 3.17 ENSAIO DE PERMEABILIDADE VASCULAR

16 Camundongos C57Bl-6 foram submetidos ao regime de tratamento e implantação tumoral descritos no tópico 3.4.3. No 12º dia de crescimento tumoral os animais foram tratados com PBS ou R-954 conforme grupo de tratamento. e após 1h30min estes foram mantidos em uma pequena gaiola e irradiados por luz vermelha por cerca de 3 minutos para dilatação da veia da cauda. Cada animal foi então imobilizado e injetou-se 100 $\mu$ L de Azul de Evans 1% em PBS na veia lateral da cauda (intravenoso). Trinta minutos após a injeção de azul de Evans os animais foram anestesiados com solução anestésica de 100mg/kg Cetamina (Vetanarcol®) e 10mg/Kg de Cloridrato de Xilazina (Rompum®) diluídos em água (200 $\mu$ L/animal) e injetado intraperitonealmente. Foram injetados também 100 $\mu$ L de heparina 10%

intraperitonealmente. Logo que a anestesia atingia nível cirúrgico a caixa torácica dos animais era aberta sem romper vasos sanguíneos, de modo a deixar expostos o fígado e o coração. Para realização da perfusão sanguínea foi utilizado um equipo preenchido com solução fisiológica com 14mM de KCl (para manutenção da diástole) acoplado a uma agulha que foi inserida no ventrículo esquerdo. Foi feito um picote no átrio direito para permitir que a solução fisiológica percorresse todo o circuito sanguíneo (2mL/min) e extravasasse. O procedimento de perfusão foi realizado até que o fígado ficasse pálido (cerca de 30-40 minutos). Ao final do procedimento o tumor de cada animal foi removido cirurgicamente e pesado em balança analítica, bem como um fragmento do fígado. Os tumores e fragmentos de fígado foram mantidos em 1mL de formamida a temperatura ambiente por 5 dias para extração do corante. A solução de formamida foi recolhida de cada tubo e centrifugada em velocidade máxima por 5 minutos. 50 $\mu$ L do sobrenadante foi recolhido e adicionado em triplicatas em micro placa de titulação para leitura da absorbância a 650nm. Foi feita a razão da média das absorbâncias de cada tecido (tumor ou fígado) pela massa do mesmo. Em seguida foi calculada a razão deste valor obtido para o tumor pelo valor obtido para o fígado de um mesmo animal.

### 3.18 ENSAIO PARA AVALIAR A TOXICIDADE DOS ANTAGONISTAS R-954 E R-715 ASSOCIADOS À DOXORRUBICINA

Camundongos BALB/c foram tratados com diferentes doses dos antagonistas R-715 (i.p) ou R-954 (s.c) ou PBS como controle duas horas antes da injeção de

doxorribicina (i.v.) 32mg/kg de camundongo. A massa corpórea dos camundongos foi mensurada a cada 3 dias.

### 3.19 ENSAIO PARA AVALIAR O EFEITO AGUDO DOS ANTAGONISTAS R-715 E R-954 NA DISTRIBUIÇÃO DE DOXORRUBICINA (AGENTE FLUORESCENTE) NO TECIDO TUMORAL

Células de melanoma B16-F10 ( $5 \times 10^5$  células/sítio tumoral) ou células de sarcoma mamário EMT6 ( $10^6$  células/sítio tumoral) foram implantadas subcutaneamente nos flancos direito e esquerdo de camundongos C57Bl-6 e BALB/c, respectivamente. O crescimento tumoral foi acompanhado diariamente até os tumores atingirem de 8-12mm de diâmetro quando foi administrada uma dose única de 0,5mg/Kg de R-715 i.p. ou 3mg/kg de R-954 s.c. ou PBS como controle, juntamente com 0,2mL i.p. do anticorpo EF5 (10 mmol/L), marcador de hipóxia. Duas horas após a injeção dos antagonistas os camundongos receberam uma injeção intravenosa de doxorribicina (8mg/kg) e em seguida de DIOC-7. Os animais foram mortos e os tumores excisados 3 minutos após a injeção de DIOC-7.

### 3.20 ENSAIO PARA AVALIAR O EFEITO CRÔNICO DOS ANTAGONISTAS R-715 E R-954 NA DISTRIBUIÇÃO DE DOXORRUBICINA (AGENTE FLUORESCENTE) NO TECIDO TUMORAL

O tratamento dos animais com os antagonistas do BKRI, R-954 e R-715, foi iniciado 24 horas antes da implantação tumoral (dia -1). Foi administrado diariamente 3mg/kg s.c. de R-954 ou 0,5mg/kg i.p. de R-715 ou PBS (controle). Células de melanoma murino B16-F10 foram injetadas ( $5 \times 10^5$  células/sítio tumoral) subcutaneamente nos flancos direito e esquerdo dos animais (dia 0). Quando os tumores atingiram de 8-12mm de diâmetro a última dose de antagonista foi administrada, juntamente com 0,2mL i.p. de EF5 (10 mmol/L). 2, 6 ou 24hs após a injeção dos antagonistas os animais receberam injeção de doxorubicina (8mg/kg i.v.) e em seguida de DIOC-7. Os animais foram mortos e os tumores excisados 3 minutos após a injeção de DIOC-7.

### 3.21 QUANTIFICAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DE DOXORRUBICINA EM RELAÇÃO AOS VASOS SANGUÍNEOS (DISTRIBUIÇÃO DA DROGA NO MICROAMBIENTE TUMORAL)

Os tumores removidos dos animais foram imediatamente embebidos em *optimum cutting temperature compound*, congelados em nitrogênio líquido e estocados à -70°C. Com o auxílio do criostato foram cortadas 3 secções de 10µm de

espessura para cada tumor, em diferentes níveis, e estas foram montadas em lâminas de vidro e mantidas à -70°C.

A autofluorescência de doxorrubicina (comprimento de onda de excitação 480nm e de emissão 580nm) e DIOC-7 (comprimento de onda de excitação 482nm e de emissão 504nm ) foram detectadas com o microscópio de fluorescência Olympus BX50 e usando as lentes objetivas Olympus UPlanSApo 10x/0.40 com parâmetros idênticos de amplificação do sinal para cada experimento. As imagens foram capturadas com a câmera Roper Scientific CoolSnap HQ CCD e os tumores foram fotografados por inteiro utilizando-se uma platina motorizada guiada por “joystick” e o software Media Cybernetics *In Vivo*.

Os vasos sanguíneos foram reconhecidos pela expressão de CD31 nas células endoteliais e as regiões de hipóxia foram reconhecidas pela marcação com EF5. Os vasos sanguíneos foram perfundidos previamente *in vivo* pelo “marcador” fluorescente DIOC-7, portanto considera-se que a marcação com DIOC-7 corresponde aos vasos sanguíneos ditos funcionais.

Após aquisição das imagens de doxorrubicina e DIOC-7, os tumores foram fixados em acetona por 10 minutos, lavados em PBS e bloqueados (ID Labs, CAN) por 15 minutos. As lâminas foram marcadas duplamente com anticorpos anti-CD31 feito em rato (1:100; BD PharMingen, CAN), e anti-EF5 conjugado a Cy5 feito em camundongo (1:50, cedido por Dr. C. Koch, USA) por 1 hora, em seguida as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com anti-IgG de rato conjugado a Cy3 (1:400; Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA) por 40 minutos. As lâminas foram mantidas à -70C e protegidas da luz.

Os cortes tumorais foram re-fotografados de forma idêntica à captura da fluorescência de doxorubicina e DIOC-7. A fluorescência de Cy3, representando vasos sanguíneos, foi visualizada usando filtros de excitação de 530-560nm e de emissão de 573-647nm. A fluorescência de Cy5, representando regiões de hipóxia, foi visualizada usando filtros de excitação de 630-650nm e de emissão de 665-695nm. Em seguida, os cortes tumorais foram corados com hematoxilina para identificação das regiões de necrose.

A composição das imagens de doxorubicina, CD31, DIOC7 e EF5 foram geradas usando o Media Cybernetics Image Pro PLUS (versão 6.0). As imagens da marcação com anti-CD31, bem como DIOC-7, foram convertidas para imagens binárias preto e branco de 8-bites (255 unidades arbitrárias) e objetos menores que  $5\mu\text{m}^2$  foram removidos, se baseado em uma estimativa de menor diâmetro capilar (LESS et al., 1991). As imagens resultantes foram sobrepostas às imagens correspondentes obtidas a partir da fluorescência de doxorubicina resultando em uma imagem preto e branco com os vasos sanguíneos totais (CD31) ou funcionais (DIOC-7) identificados por uma intensidade de 255 (branco) e doxorubicina em uma escala de cinza variando de 0 (preto) a 254 unidades. Regiões de interesse com  $1.6\text{mm}^2$  foram selecionadas de cada corte tumoral. As regiões de necrose, as extremidades do tumor e os artefatos de coloração foram excluídos. Para a quantificação de doxorubicina o valor correspondente a autofluorescência do tecido foi descontada, baseando-se na média do *background* de regiões sem marcação. A intensidade dos pixels (doxorubicina) e a distância dos vasos sanguíneos (CD31 ou DIOC-7 positivos) mais próximos para todos os pixels na região de interesse selecionada foram mensuradas com o auxílio de um algoritmo computacional

customizado (PRIMEAU et al., 2005). A intensidade de doxorrubicina foi medida em função da distância (x) do vaso sanguíneo mais próximo. Em alguns experimentos a distribuição de doxorrubicina foi avaliada em função dos vasos sanguíneos totais (CD31), em outros em função dos vasos sanguíneos ditos funcionais (DIOC-7) e em outro foram feitas ambas as análises (separadamente).

As imagens obtidas pela marcação com anticorpo anti-EF5, representando regiões de hipóxia, foram sobrepostas as imagens doxorrubicina-CD31 correspondentes e utilizadas para análise qualitativa em imagens coloridas, onde doxorrubicina foi representada em azul, os vasos sanguíneos marcados com CD31 em vermelho, os vasos perfundidos com DIOC-7 co-localizados com CD31 em amarelo e as regiões de hipóxia em verde.

### 3.22 QUANTIFICAÇÃO DOS VASOS SANGUÍNEOS TOTAIS E FUNCIONAIS NO MICROAMBIENTE TUMORAL.

As imagens completas dos tumores obtidas no experimento anterior a partir da fluorescência dos marcadores CD31 e DIOC7, separadamente, foram utilizadas no software Media Cybernetics Image Pro PLUS (versão 6.0) para a quantificação dos objetos (vasos sanguíneos). Para isso, todos os artefatos de marcação foram “apagados”, bem como as áreas de necrose tumoral. Como explicado anteriormente os vasos sanguíneos são identificados por uma intensidade de 255 unidades (branco), proporcionando assim a quantificação dos mesmos em função da área tumoral delimitada visualmente com o auxílio do “mouse”.

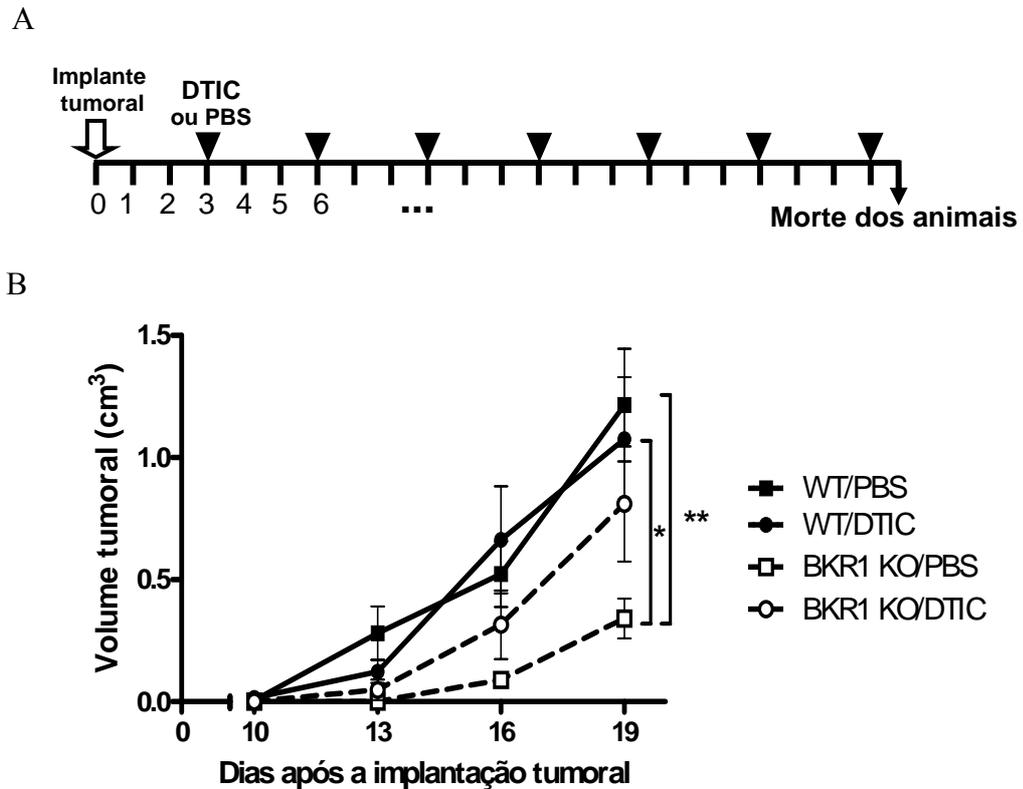
### 3.23 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises de sobrevida dos camundongos e cinética de aparecimento tumoral foram submetidas ao teste estatístico de Kaplan-Meier seguido do teste Log rank. Todos os outros dados foram inicialmente submetidos ao teste de Normalidade e, após confirmação dos dados obedecerem à curva de distribuição Normal (distribuição Gaussiana), estes foram analisados pelo teste T de *Student*, quando o desenho experimental envolveu a comparação apenas entre 2 grupos, ou pelo teste ANOVA, quando foi feita a comparação entre 3 ou mais grupos. Foi realizado o teste One way ANOVA quando se tratou da comparação entre mais de 2 grupos e avaliação de apenas uma variável, como por exemplo, o tratamento, e este foi seguido pelo teste de Bonferroni. Quando foram avaliadas mais de uma variável, como por exemplo, o tratamento e o fenótipo do animal foi realizado o teste Two way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Nos casos em que os dados não apresentaram uma distribuição Normal foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis seguido do múltiplo teste de Dunn, para comparações entre 3 ou mais grupos. Em todos os casos foi utilizado o software GraphPad Prism versão 5.0 e os dados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p \leq 0,05$ .

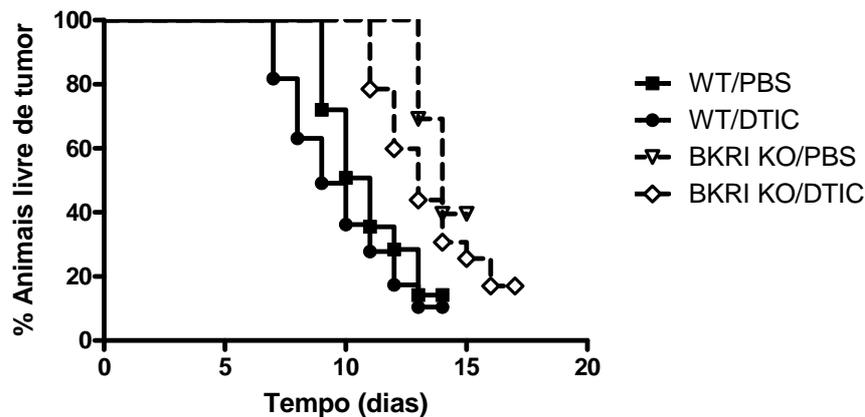
## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO DO MELANOMA MURINO B16-F10 EM CAMUNDONGOS NOCAUTES PARA O GENE BKR1 TRATADOS COM O QUIMIOTERÁPICO DACARBAZINA.

Camundongos do tipo selvagem (*wild type* - WT) e nocautes para o receptor de bradicinina subtipo 1 (BKR1 KO) foram implantados com células de melanoma B16-F10 e tratados com dacarbazina (DTIC) ou PBS, como controle, segundo o regime de tratamento esquematizado na figura 5A.

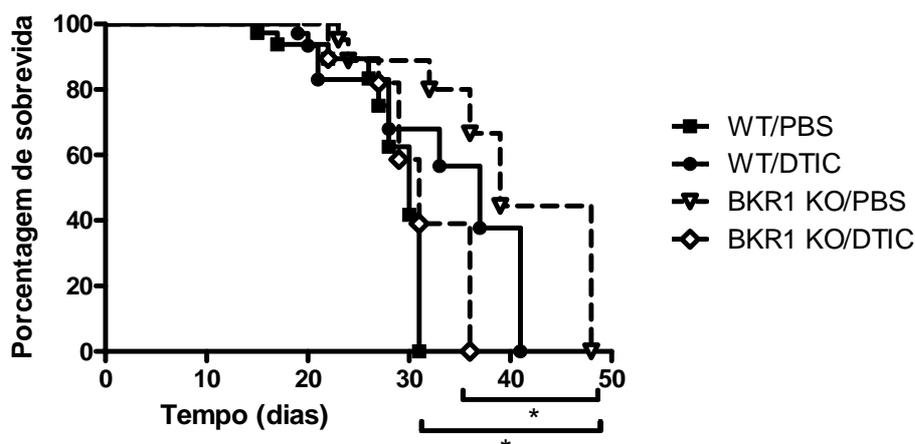


**Figura 5. Crescimento dos tumores B16-F10 em camundongos nocautes para BKR1 e do tipo tratados com DTIC.** Camundongos C57BL/6 (WT) ou nocautes para BKR1 (BKR1 KO) foram tratados com DTIC (2mg/kg i.p.) ou com PBS (grupo controle) a cada 3 dias após o implante tumoral (injeção subcutânea de  $5 \times 10^5$  células B16-F10 no flanco direito de cada animal). A) Esquema de administração de DTIC. B) Taxa de crescimento tumoral. O volume tumoral foi obtido a partir das dimensões do tumor mensuradas com paquímetro. Os pontos representam a média aritmética do volume de 7 a 9 tumores  $\pm$  erro padrão da média. Experimento representativo de um total de 2. Foi realizado o teste estatístico *Two way* ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni (\*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,001$ ).



**Figura 6. Cinética de aparecimento de tumores B16-F10 em camundongos do tipo selvagem e nocautes para BKR1 tratados com DTIC ou PBS.** Camundongos C57BL/6 (WT) ou nocautes para BKR1 (BKRI KO) foram tratados com DTIC (2mg/kg i.p.) ou com PBS (grupo controle) a cada 3 dias após o implante tumoral (injeção subcutânea de  $5 \times 10^5$  células B16-F10 no flanco direito de cada animal). Considerou-se animal livre de tumor aqueles que não apresentavam tumor palpável ou mensurável no dia da avaliação. Foi feita a análise estatística de Kaplan-Meyer seguida do teste Log rank ( $p < 0,0001$ ).

Os camundongos nocautes para BKR1 apresentaram uma taxa de crescimento significativamente mais lenta que os camundongos do tipo selvagem (\*\*  $p < 0,001$ ), apresentando volume tumorais em média cerca de 4 a 5 vezes menor. O tratamento com DTIC não alterou a taxa de crescimento tumoral nos camundongos do tipo selvagem ou nocautes. Em concordância com o resultado anterior, a figura 6 mostra que os tumores surgiram mais tardiamente ( $p < 0,0001$ ) nos camundongos nocautes para BKR1, comparados aos camundongos do tipo selvagem, independente do tratamento.

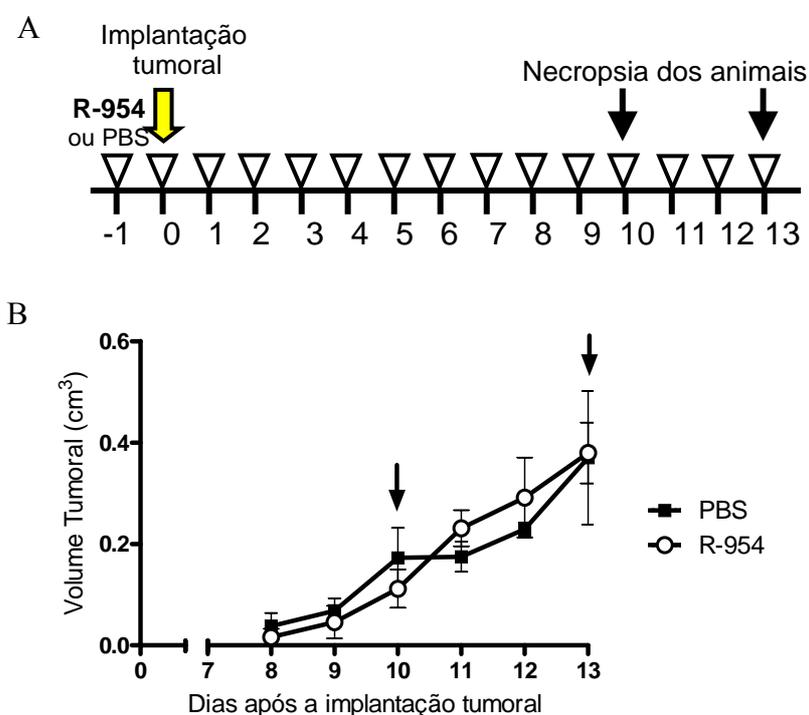


**Figura 7. Avaliação da taxa de sobrevivência global de camundongos do tipo selvagem e nocautes para BKR1 com implante de melanoma, tratados ou não com DTIC.** Curva de sobrevivência global de camundongos do tipo selvagem tratados com PBS (WT/PBS), como controle, ou com DTIC (WT/DTIC) e dos camundongos nocautes para BKR1 tratados com PBS (BKR1 KO/PBS) ou com DTIC (BKR1 KO/DTIC). Os pontos representam a média de sobrevivência dos camundongos. As barras de erro foram omitidas para melhor visualização do gráfico. Foi feita a análise estatística de Kaplan-Meier seguida do teste Log rank (\*  $p < 0,05$ ).

Os camundongos nocautes para o gene BKR1 com implante de melanoma apresentaram maior taxa de sobrevivência quando comparados aos camundongos do tipo selvagem ( $p = 0,01$ ) quando tratados com PBS, entretanto esse efeito é perdido quando os animais são tratados com DTIC. A sobrevivência dos camundongos nocautes para BKR1 com implante de melanoma tratados com DTIC foi significativamente menor que a dos camundongos nocautes tratados com PBS ( $p = 0,02$ ), indicando um possível efeito tóxico de DTIC nesses camundongos (figura 7).

#### 4.2 ANÁLISE DA ADMINISTRAÇÃO DO ANTAGONISTA DE BKR1, R-954, NO TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS DO TIPO SELVAGEM COM IMPLANTE DE MELANOMA B16-F10.

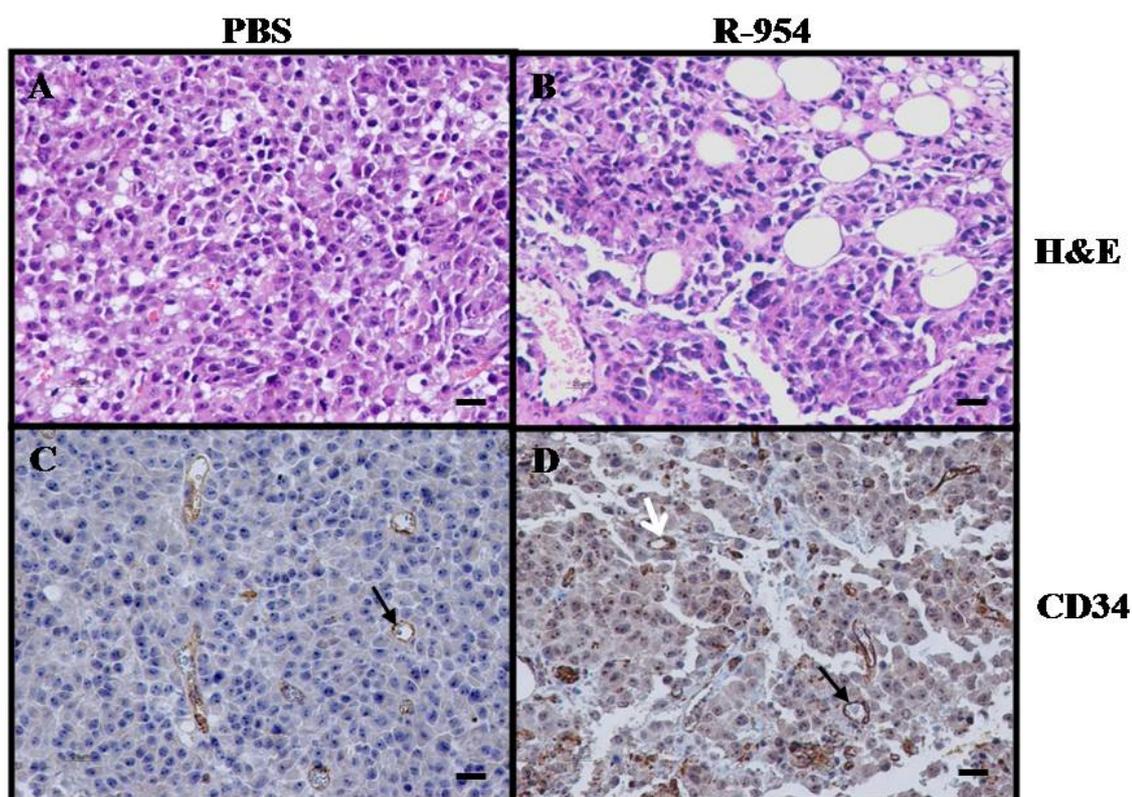
Tendo em vista a importância do receptor de bradicinina subtipo 1 no estabelecimento do melanoma murino, utilizamos o antagonista seletivo do BK<sub>R1</sub>, o peptídeo R-954, para tratar camundongos C57BL/6 do tipo selvagem com implante de células B16-F10 e observar o seu efeito no controle do crescimento da massa tumoral e na composição (qualitativa e quantitativa) do microambiente tumoral.



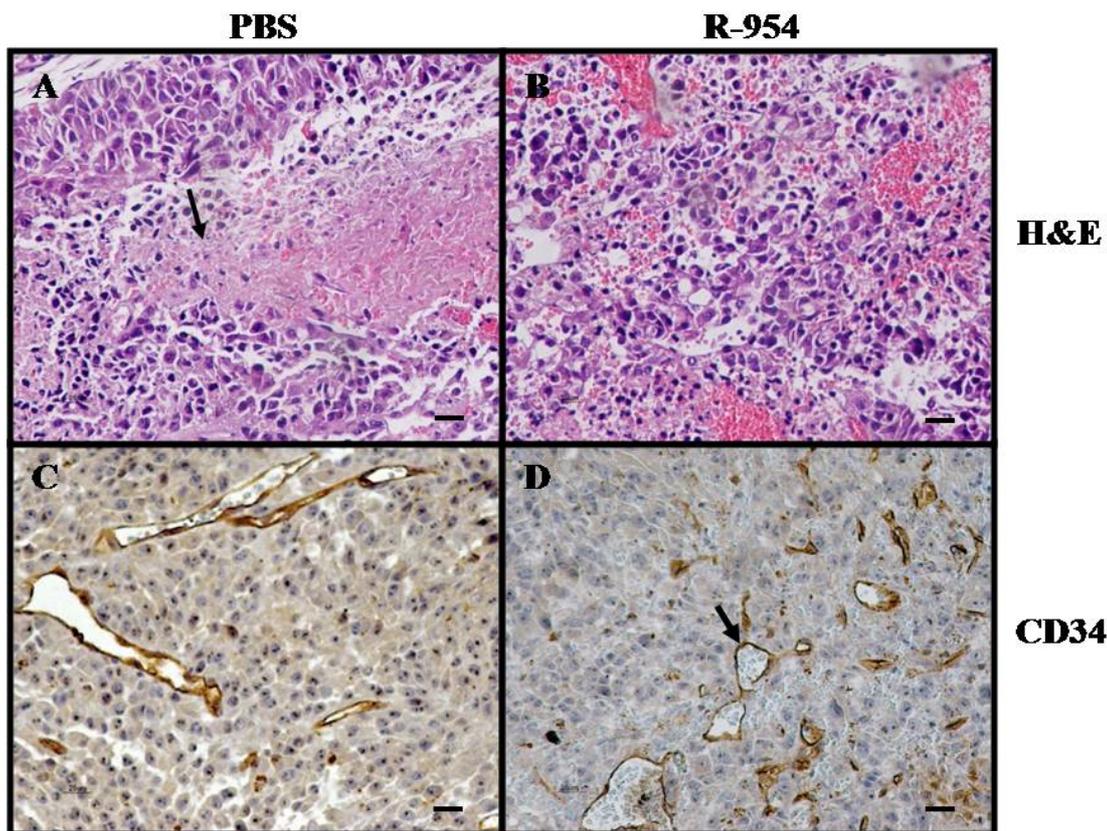
**Figura 8. Análise do crescimento tumoral em camundongos do tipo selvagem com implante de melanoma B16-F10 tratados com o antagonista de BK<sub>R1</sub>, R-954.** Camundongos C57BL/6 foram tratados diariamente com R-954 (1mg/kg s.c.) desde 24 horas antes da implantação tumoral ( $5 \times 10^5$  células B16-F10 s.c.) até 10 ou 13 dias após o implante tumoral quando eles foram sacrificados. A) Esquema de administração do antagonista R-954. B) Taxa de crescimento tumoral. Os pontos representam a média aritmética do volume de 6 tumores  $\pm$  erro padrão da média (experimento representativo de um total de 3). A análise estatística foi realizada com teste T de *Student* ( $p=0,959$ ).

O tratamento com R-954 não alterou a cinética de crescimento tumoral ( $p=0,959$ ), como mostra a figura 8B.

As massas tumorais obtidas no experimento anterior foram coletadas e processadas para análise histopatológica ao microscópio de luz convencional. Para isso, cortes seriados de  $3\mu\text{m}$  de espessura foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) ou usados para reações imunoistoquímicas com anticorpos anti-CD34 (marcador de célula endotelial).



**Figura 9. Análise do microambiente de melanomas em camundongos C57Bl-6 no 10° dia após a implantação tumoral na vigência do tratamento com R-954.** As micrografias das colunas da esquerda e da direita, representam tumores de animais do grupo controle e tratado com R-954, respectivamente, no 10° dia após a implantação tumoral. As figuras (A) e (B) correspondem a cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H&E). As figuras (C) e (D) correspondem a reações imunoistoquímicas utilizando anticorpos anti-CD34. As micrografias foram feitas num aumento de 200x. Barra = 25 micras.

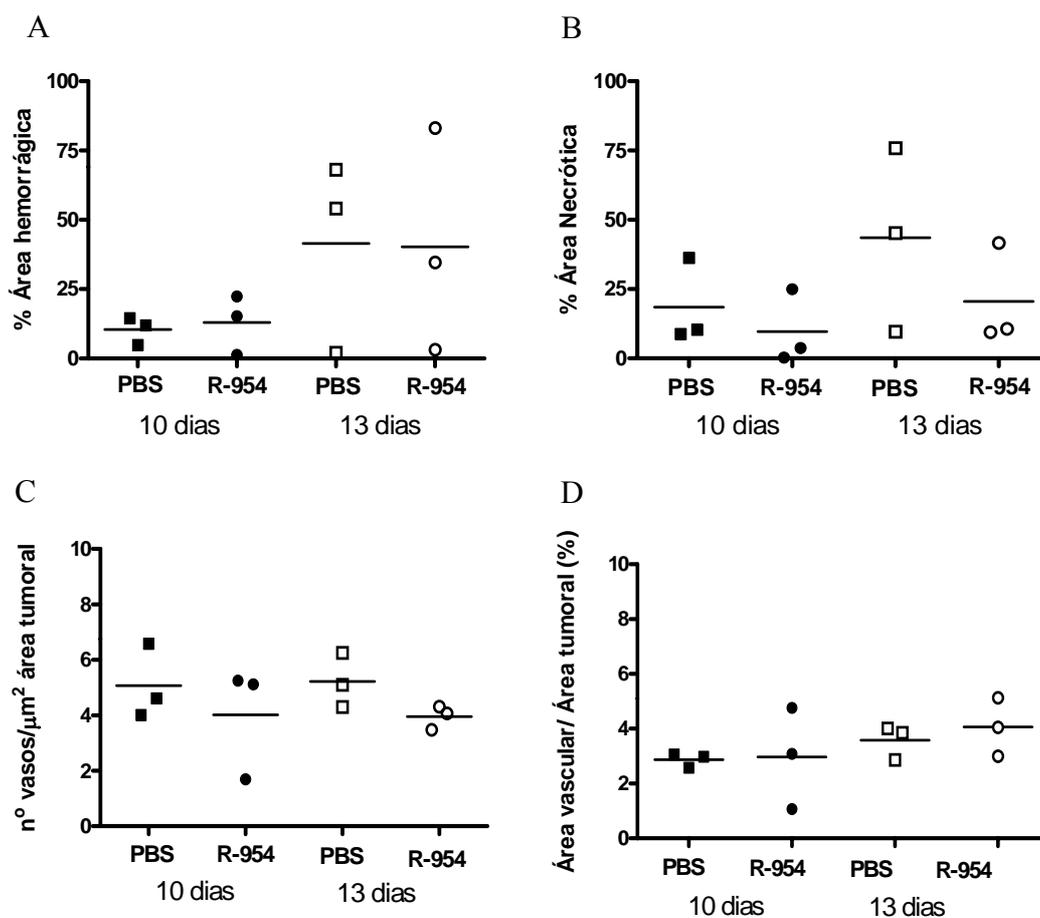


**Figura 10. Análise do microambiente de melanomas em camundongos C57Bl-6 no 13° dia após a implantação tumoral na vigência do tratamento com R-954.** As micrografias das colunas da esquerda e da direita, representam tumores de animais do grupo controle e tratado com R-954, respectivamente, no 13° dia após a implantação tumoral. As figuras (A) e (B) correspondem a cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H&E). As figuras (C) e (D) correspondem a reações imunohistoquímicas utilizando anticorpos anti-CD34. As micrografias foram feitas num aumento de 200x. Barra = 25 micras.

A análise histopatológica dos cortes de tumores corados com H&E dos camundongos sacrificados no 13° dia mostrou áreas de extensa hemorragia, tanto no controle quanto no tratado com R-954 (figura 10A), em contraposição ao padrão aparentemente menos hemorrágico, observado com 10 dias de tratamento (figura 9A e B). Entretanto, a quantificação dessas áreas por morfometria mostrou que não há diferença significativa na porcentagem de áreas hemorrágicas quando do tratamento com R-954 ( $p=0,387$ ), figura 11A.

A presença de áreas necróticas foi identificada nas secções tumorais coradas com H&E pela presença de núcleos picnóticos e mais claros, nem sempre bem evidenciados, células fragmentadas, grande eosinofilia e a presença de “sombras” (das células), conhecido como necrose de condensação, como indicado pela seta preta na figura 10A. A quantificação das áreas necróticas não diferiu estatisticamente entre os grupos tratado e não-tratado ( $p=0,322$ ), figura 11B.

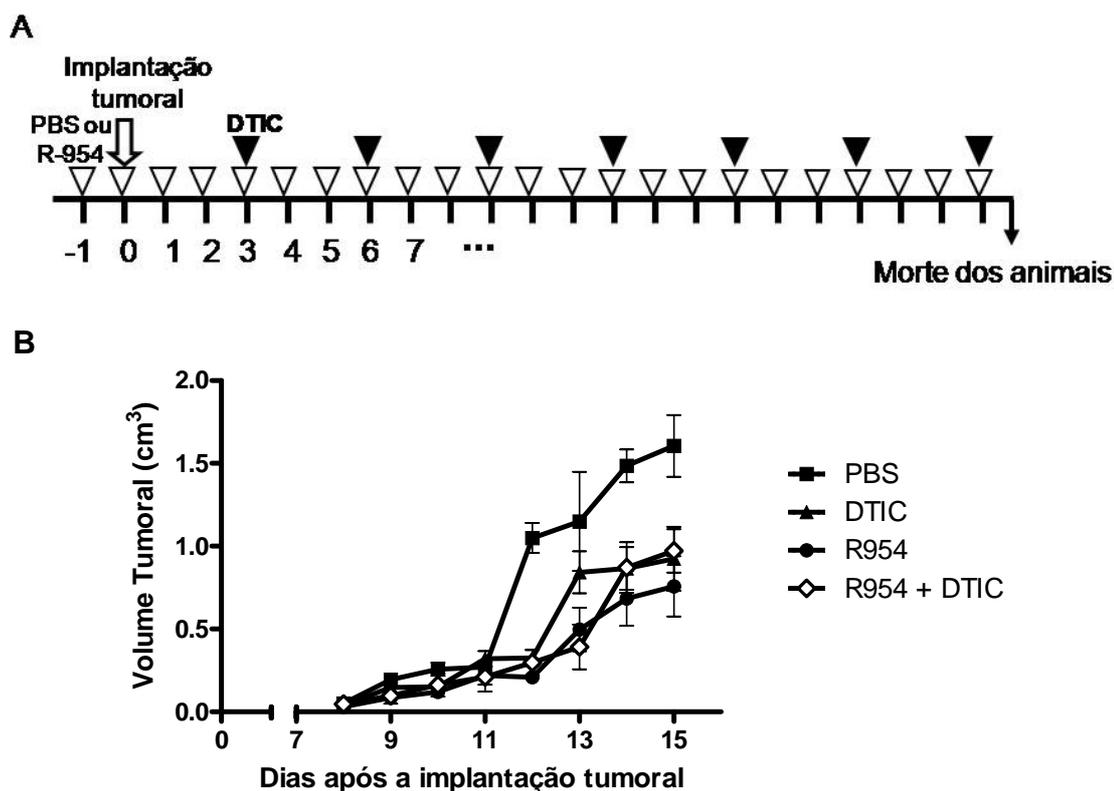
A fim de avaliar o padrão vascular dos tumores foi feita marcação com o anticorpo anti-CD34, como mostra as figuras 9 e 10 (C e D). Foram observados nos tumores excisados no 10º dia após o tratamento estruturas vasculares de pequeno e médio calibre, bem marcadas pela reação imunoistoquímica, indicadas pelas setas pretas nas figuras 7C e 7D. Enquanto os vasos sanguíneos encontrados nos tumores excisados no 13º dia em geral apresentavam maior calibre (figura 10C). Grande parte dessas estruturas vasculares apresentava hemácias no seu interior sugerindo a funcionalidade do vaso sanguíneo (figura 10D). O número de vasos sanguíneos por área tumoral total foi estatisticamente igual entre os grupos, tanto no 10º quanto no 13º dia após o tratamento (figura 11C). E a porcentagem de área vascular em relação à área tumoral total também não foi diferente estatisticamente entre os grupos ( $p=0,560$ ), figura 11D.



**Figura 11. Análise morfométrica dos tumores não mostrou diferenças quanto ao padrão necrótico, hemorrágico ou vascular quando do tratamento com R-954 no 10<sup>o</sup> e 13<sup>o</sup> dias após a implantação tumoral.** A) Porcentagem de área hemorrágica relativa presente no microambiente tumores tratados com R-954. B) Porcentagem de área necrótica relativa presente no microambiente de tumores tratados com R-954. C) Densidade vascular (expressa pelo número de vasos sanguíneos/  $\mu\text{m}^2$  de área tumoral). D) Área vascular (expressa pela porcentagem de área tumoral compreendida por vasos sanguíneos). Cada ponto representa um fragmento tumoral e a barra mostra a média dos fragmentos analisados por grupo. A análise estatística foi determinada pelo teste T de *Student*.

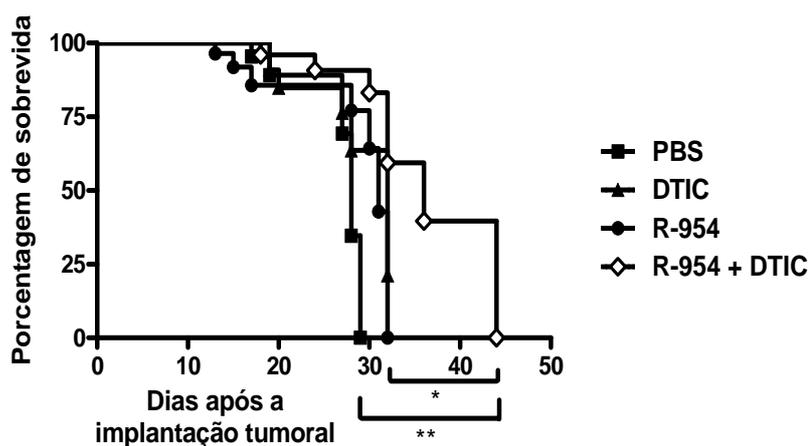
#### 4.3 AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS COM IMPLANTE DE MELANOMA COM O ANTAGONISTA R-954 CONCOMITANTE COM O QUIMIOTERÁPICO DACARBAZINA.

A fim de analisar o crescimento tumoral e a sobrevivência de camundongos com implante tumoral tratados com R-954 e DTIC isoladamente ou em associação, camundongos receberam o implante de melanoma e foram tratados diariamente com R-954 e a cada três dias com DTIC, como esquematizado na figura 12A.



**Figura 12. Análise do crescimento tumoral em camundongos com implante de melanoma tratados com PBS, como controle, com DTIC, com o antagonista R-954 ou concomitantemente com R-954 e DTIC (R-954 + DTIC).** Camundongos C57BL/6 foram tratados diariamente com R-954 (1mg/kg s.c.) desde 24 horas antes da implantação tumoral ou com DTIC (2mg/kg i.p) a cada 3 dias após o implante tumoral ou concomitantemente com R-954 e DTIC nas mesmas doses e periodicidade dos grupos anteriores. Os animais do grupo controle receberam uma injeção diária de PBS (s.c.). A implantação tumoral foi realizada pela injeção subcutânea de  $5 \times 10^5$  células B16-F10. A) Esquema de administração do antagonista R-954 e do quimioterápico DTIC. B) Taxa de crescimento tumoral nos primeiros 15 dias do experimento. Os pontos representam a média aritmética do volume de 7 tumores  $\pm$  erro padrão da média. A análise estatística foi determinada pelo teste *One way ANOVA* ( $p=0,206$ ). Experimento representativo de um total de 3.

Apesar da taxa de crescimento tumoral ter sido estatisticamente igual entre os grupos experimentais ( $p=0,206$ ), como mostra a figura 12B, o tratamento simultâneo com R-954 e DTIC aumentou a sobrevivência dos animais quando comparado ao controle e aos tratamentos simples com R-954 ou DTIC, como mostra a figura 13.



**Figura 13. Curvas de sobrevivência global de camundongos com melanoma tratados com PBS, como controle, com DTIC, com o antagonista R-954 ou concomitantemente com R-954 e DTIC (R-954 + DTIC).** O regime de tratamento foi realizado como descrito na figura 10. Os pontos representam a média de sobrevivência de 6 camundongos. Foi feita a análise estatística de Kaplan-Meier seguida do teste Log rank (\*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ).

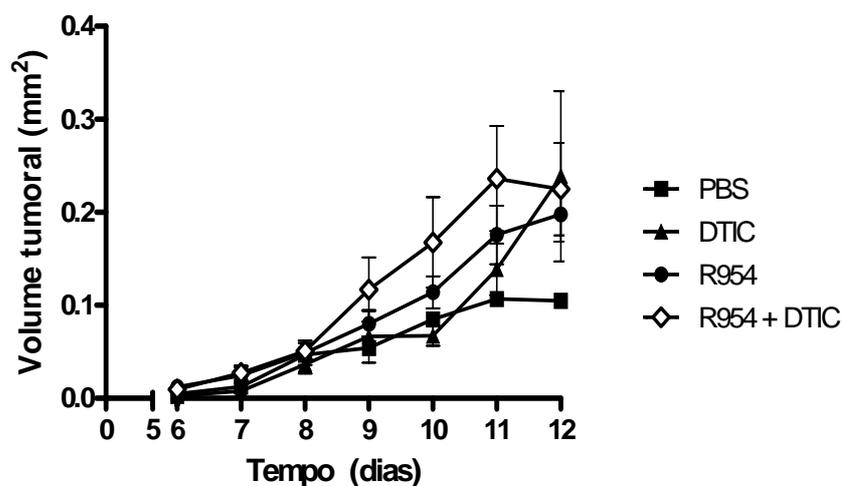
#### 4.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE TUMORES TRATADOS COM R-954, DACARBAZINA OU R-954 CONCOMITANTE COM DACARBAZINA POR MEIO DE MICROARRANJOS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS.

Para avaliar o efeito *in vivo* do antagonista R-954 e do quimioterápico dacarbazina, separadamente ou em combinação, na expressão gênica das células do

microambiente tumoral, o RNA total dos tumores de camundongos tratados com PBS, DTIC, R-954 e R-954 + DTIC foi extraído, o RNA mensageiro foi purificado e foram utilizados para hibridizar no chip da Affymetrix. O GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array contém 45 000 sondas representativas de 34 000 transcritos bem caracterizados de camundongo.

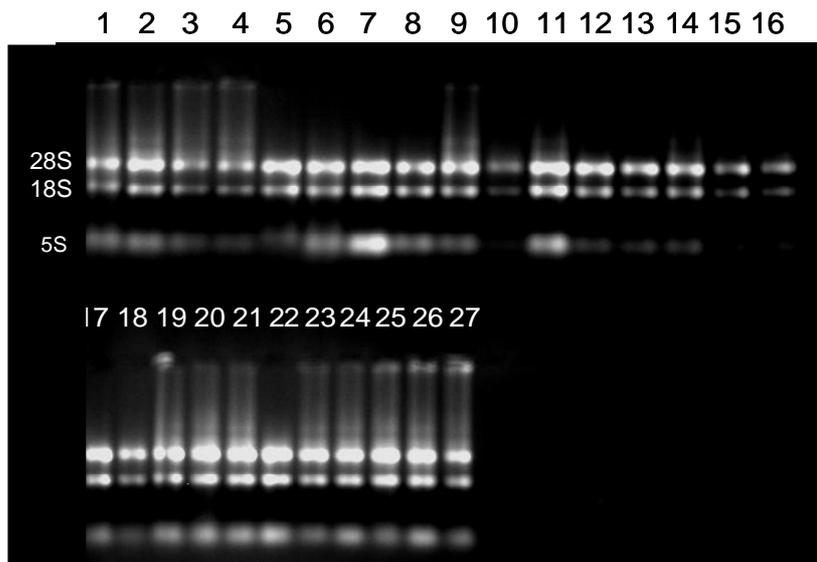
Camundongos C57Bl/6 receberam o implante tumoral (B16-F10) e foram tratados diariamente com R-954, desde 1 dia antes da implantação tumoral, e a cada três dias com DTIC, como esquematizado em detalhes na figura 12A. Após 4 ciclos de quimioterapia, 12º dia após a implantação tumoral, os camundongos foram eutanizados. Os tumores excisados foram divididos em dois fragmentos, um foi fixado e processado para análises histoquímica e imunoistoquímica e o outro fragmento foi utilizado para extração de RNA total e avaliação da expressão gênica por microarranjos de DNA.

A taxa de crescimento tumoral foi bastante semelhante em todos os grupos experimentais ( $p=0,38$ ), como mostra a figura 14, apresentando também resultado semelhante ao observado em outros experimentos.



**Figura 14. Avaliação do crescimento tumoral em camundongos com implante de melanoma tratados com o antagonista R-954, o quimioterápico dacarbazina (DTIC), R-954 e DTIC concomitantemente ou PBS, como controle.** Camundongos C57BL/6 foram tratados diariamente com injeções de R-954 (1mg/kg s.c.) desde 24 horas antes da implantação tumoral ( $5 \times 10^5$  células B16-F10) ou com DTIC (2mg/kg i.p) a cada 3 dias após o implante tumoral ou concomitantemente com R-954 e DTIC nas mesmas doses e periodicidade dos grupos anteriores. Os animais do grupo controle receberam uma injeção diária de PBS (s.c.). Os tratamentos seguiram até o 12º dia. Os pontos representam a média aritmética do volume de 7 tumores  $\pm$  erro padrão da media. Teste estatístico *One way ANOVA* ( $p=0,38$ ).

Os fragmentos tumorais destinados a extração de RNA foram homogeneizados em Politron e o RNA foi extraído com o reagente Trizol. A qualidade do RNA foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% com formaldeído onde podem ser observadas as bandas intactas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S, 18S e 5S (figura 15). De acordo com a quantidade e qualidade do RNA e também uniformidade macroscópica do tumor (tamanho, consistência e padrão hemorrágico), foram escolhidas 12 amostras de RNA do total de 27, sendo 3 de cada grupo experimental (1, 2, 3, 8, 9, 13, 16, 18, 19, 24, 25 e 26).



**Figura 15. Análise da integridade do RNA tumoral. RNA total (cerca de 1µg) extraído dos tumores corado com brometo de etídeo separado eletroforéticamente em gel de agarose 0,8% desnaturante.** As canaletas de 1 a 7 representam RNAs de tumores de camundongos tratados com R-954 e DTIC; as canaletas de 8 a 14 representam RNAs de tumores de camundongos tratados com R-954; as canaletas de 15 a 20 representam RNAs de tumores de camundongos tratados com DTIC e as canaletas de 21 a 27 representam RNAs de tumores de camundongos tratados com PBS. Podem ser observadas as bandas que representam os RNAs ribossomais 28S, 18S e 5S.

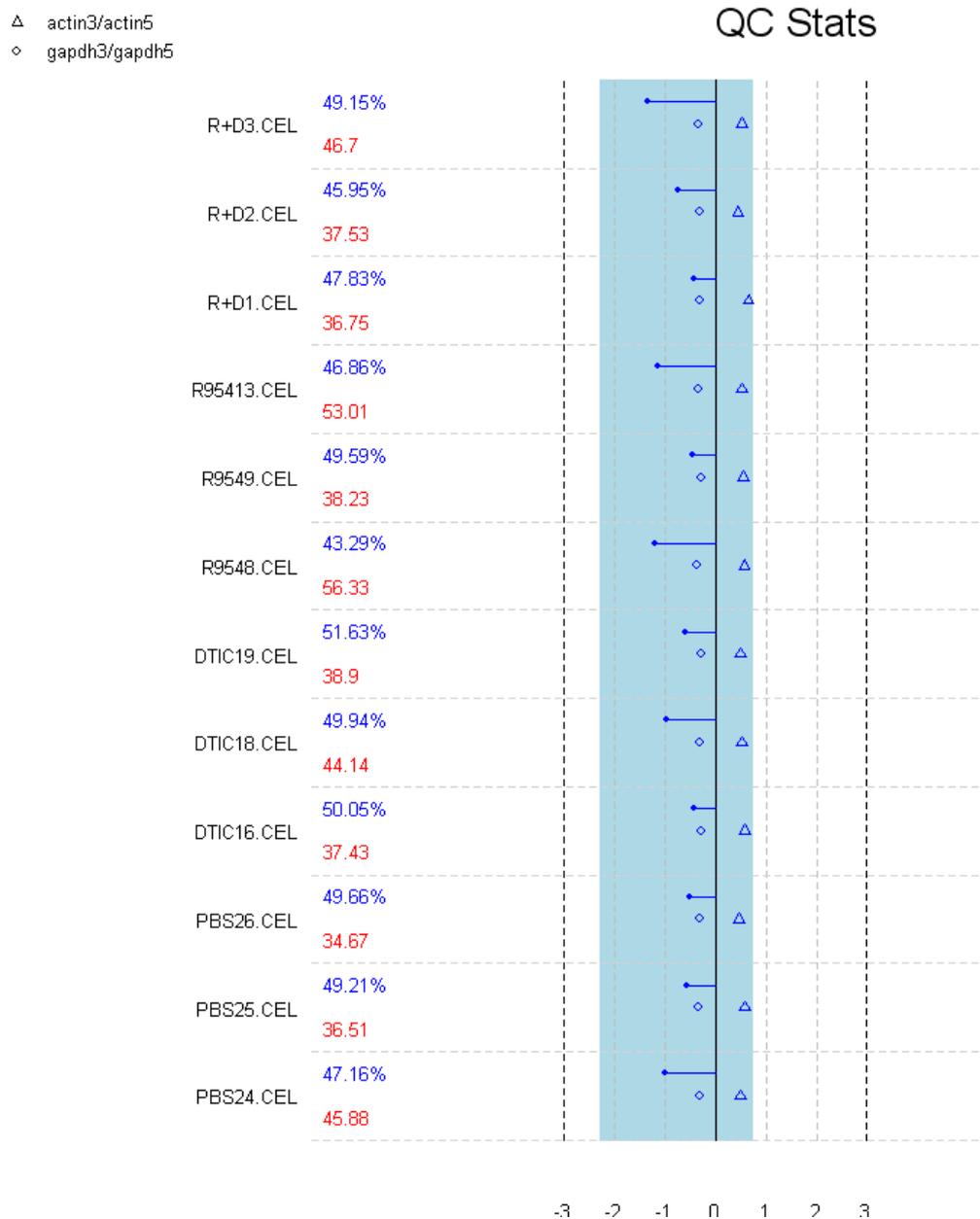
As mesmas amostras também foram analisadas no Agilent Bioanalyzer 2100. As amostras foram consideradas de excelente qualidade, pois a constante de integridade do RNA (*RNA Integrity Number - RIN*) foi maior que 9,0 na maioria das amostras (RNAs de qualidade apresentam RIN entre 7 e 10), resultado não apresentado.

O RNA mensageiro das 12 amostras selecionadas foi purificado, quantificado novamente e utilizado em reações de transcrição reversa *in vitro*. A partir do cDNA foi obtido o cRNA marcado com biotina que em seguida foi fragmentado e hibridizado nos microarranjos de oligonucleotídeos (sondas). Após as hibridizações foram realizadas lavagens para retirar os cRNAs não hibridizados, seguidos da

coloração com Ficoeritrina/Estreptavidina e anticorpo anti-estreptavidina biotilado e por fim o escaneamento de cada arranjo.

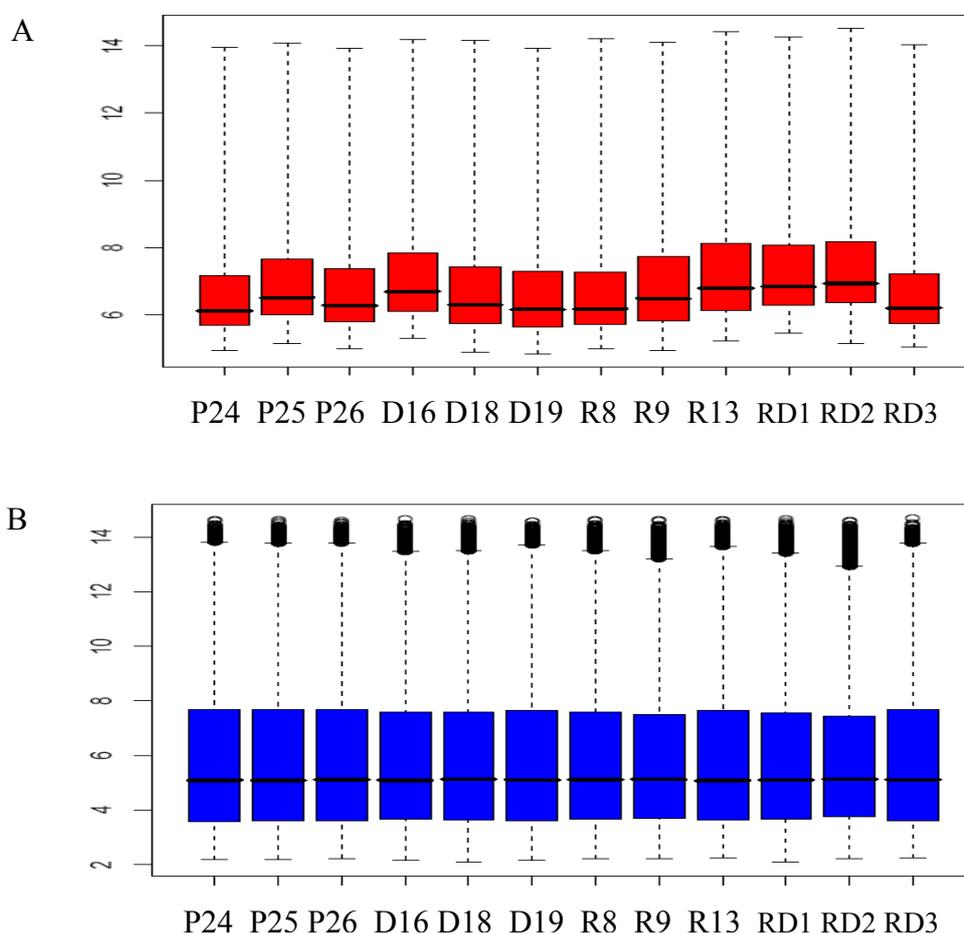
Os arranjos do GeneChip da Affymetrix apresentam diversos controles internos e externos que devem ser considerados na avaliação da qualidade das etapas do microarranjo como; marcação, hibridização, escaneamento e ajuste da imagem, que influenciam diretamente na confiabilidade dos dados. A figura 16 apresenta um gráfico do controle de qualidade dos chips hibridizados – Estatística de controle de qualidade (QCStats), elaborado a partir do pacote “simpleaffy” utilizando o algoritmo MAS 5.0 (Microarray Suíte 5.0).

Todos os parâmetros apresentados no gráfico do controle de qualidade (figura 16) estão de acordo com as recomendações da Affymetrix (descritos em detalhes na seção de material e métodos), para todas as 12 hibridizações.



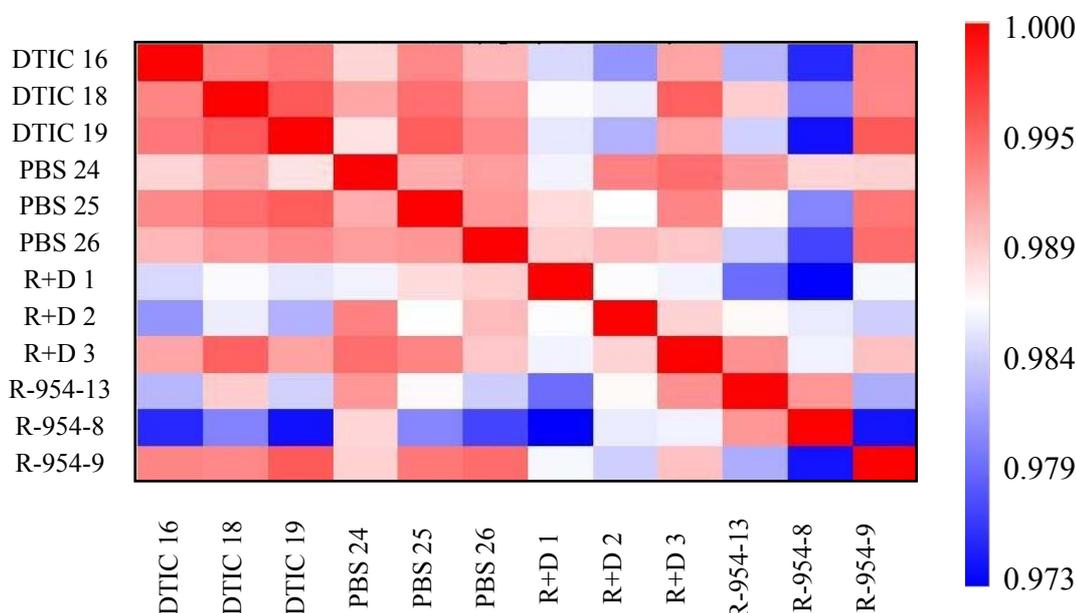
**Figura 16. QCStats – Estatística de controle de qualidade. Gráfico gerado pelo programa “R”, utilizando o algoritmo MAS 5.0 relativo aos controles das 12 hibridizações.** Os triângulos representam a razão 3’:5` do gene da  $\beta$ -actina e os losangos a razão 3’:5` do gene GAPDH. A faixa azul representa a amplitude de 3 vezes a média dos fatores de escala de todos os chips. A esquerda da figura é apresentada a porcentagem de genes presentes (azul) e a fluorescência basal média (vermelho) de cada chip.

Após a verificação da qualidade das hibridizações, os valores das intensidades de fluorescências para cada sonda foram normalizados pelo método RMA (*Robust Multi-Array Analysis*; IRIZARRY et al., 2003). Este método faz parte da biblioteca de funções analíticas “Affy”, do pacote de *softwares* de análise de microarranjos denominado Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>) que pode ser desenvolvido dentro do programa “R”.



**Figura 17. BoxPlot da intensidade de fluorescência das 12 hibridizações realizadas, antes (A) e depois da normalização (B).** Dos valores das intensidades de fluorescência brutas foram subtraídos a intensidade do *background* e os dados foram normalizados entre os arranjos pelo método RMA (*Robust Multi-Array Analysis*) pelo programa “R”. (P=PBS; D=DTIC; R= R-954; RD=R-954 + DTIC).

A figura 17 mostra os gráficos de *BoxPlot* para as 12 hibridações antes e depois da normalização. Os cálculos para a correção e subtração do *background* foram feitos anteriormente à normalização em si. O traço geralmente próximo ao meio da caixa representa a mediana, isto é, a intensidade que divide as sondas em 50% mais fracas e 50% mais fortes. E as linhas verticais representam os extremos das distribuições.



**Figura 18. Matriz de correlação entre as hibridações apresentando os coeficientes de correlação de Pearson. As cores indicam o grau de correlação entre os arranjos.** A matriz foi feita no programa Expression Console (Affymetrix) ([http://www.affymetrix.com/products/software/specific/expression\\_console\\_software.affx](http://www.affymetrix.com/products/software/specific/expression_console_software.affx)).

Uma forma de se tentar evidenciar hibridizações ruins, que afetam o processo posterior de seleção de genes diferencialmente expressos, é avaliar a correlação que existe entre os conjuntos de sonda de cada par de hibridizações (correlação de Pearson). Um coeficiente de correlação igual a 1 (vermelho) significa que as duas hibridizações comparadas são idênticas. Um coeficiente de correlação igual a 0

(zero) significa que as duas hibridações não apresentam nenhuma correspondência entre si. No caso dos dados de GeneChip da Affymetrix, o coeficiente de correlação entre duas hibridações quaisquer, após a normalização e resumo das intensidades das 16-20 sondas referentes a cada gene em único número, é geralmente superior a 0,90 o que diminui sua potencialidade como indicador de qualidade da hibridização. No entanto, é um dos poucos índices gerais sugeridos pela Affymetrix para que se possa avaliar tal qualidade. A figura 18 mostra a matriz de correlação para as 12 hibridações realizadas nesse trabalho, comparando todas elas duas a duas. Observa-se índices de correlação extremamente altos, variando de 0,973 a 1.

Para a seleção dos genes diferencialmente expressos (DEGs) entre os tumores murinos após tratamento com o antagonista de BKR1 R-954, DTIC ou R-954 e DTIC concomitante foram utilizados dois métodos estatísticos: o Teste-*T Student* realizado através do programa *Multiexperiment Viewer* – MeV e o pacote Limma do Bioconductor, como descrito em mais detalhes na seção de material e métodos. Foram selecionados somente os DEGs identificados em comum entre os dois testes e com valor de  $p < 0,05$ . Estas análises foram aplicadas independentemente a cada uma das comparações possíveis, descritas na tabela 3. Com base nesses critérios foram pré selecionados 188 DEGs no total.

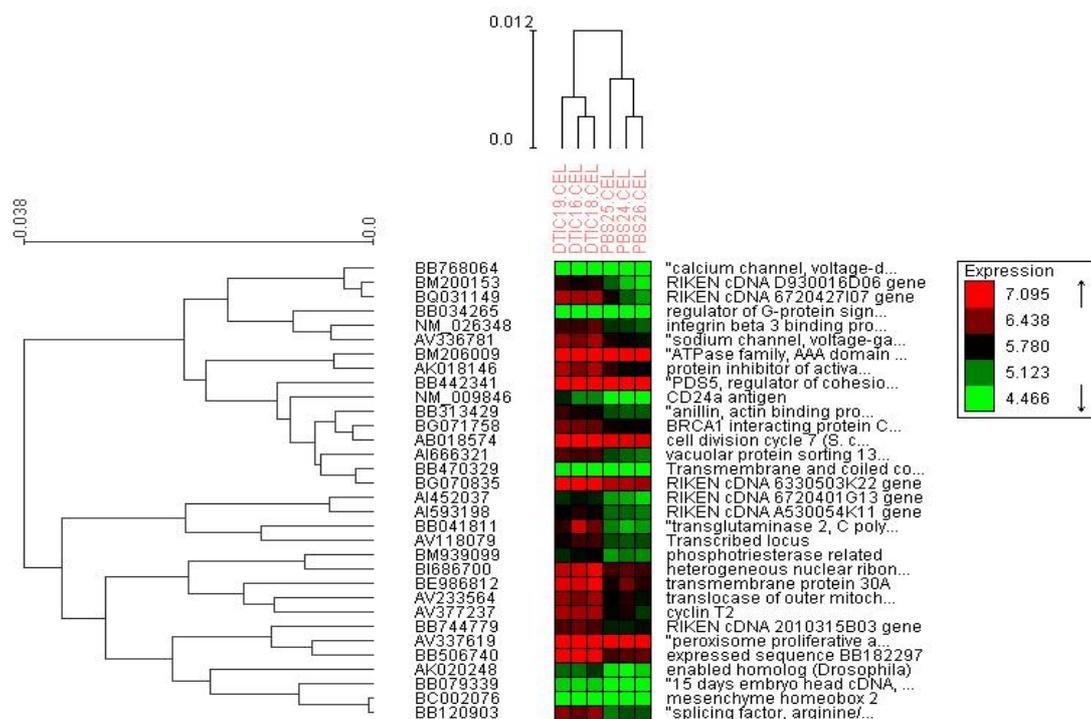
**Tabela 3.** Número de genes diferencialmente expressos (DEGs) identificados por meio da análise estatística com os algoritmos Limma e Teste *t* (simultaneamente) que apresentaram valor de  $p < 0,05$ .

<b>Comparações</b>	<b>Descrição da comparação</b>	<b>DEGs</b>
Controle x DTIC	Genes diferencialmente expressos quando se compara tumores de camundongos tratados com dacarbazina (DTIC) com camundongos tratados com PBS.	31
Controle x R-954	Genes diferencialmente expressos quando se compara tumores de camundongos tratados com R-954 (R-954) com camundongos tratados com PBS.	71
Controle x R+D	Genes diferencialmente expressos quando se compara tumores de camundongos tratados concomitantemente com dacarbazina e R-954 (R+D) com camundongos tratados com PBS.	58
DTIC x R+D	Genes diferencialmente expressos quando se compara tumores de camundongos tratados concomitantemente com dacarbazina e R-954 (R+D) com camundongos tratados com dacarbazina.	17
R-954 x R+D	Genes diferencialmente expressos quando se compara tumores de camundongos tratados concomitantemente com dacarbazina e R-954 (R+D) com camundongos tratados com R-954.	11
<b>Total</b>		<b>188</b>

Foram feitos agrupamentos hierárquicos dos genes diferencialmente expressos encontrados em cada uma das comparações (figuras 19 a 23). Nesses agrupamentos a escala de cores é representativa da intensidade de fluorescência das amostras para cada gene, indicando o nível de expressão dos mesmos (apresentado na legenda da figura). Por meio do perfil dos agrupamentos é possível visualizar grupos de genes cujo comportamento em resposta aos tratamentos é semelhante, em relação à expressão gênica, ou seja, genes cuja modulação por DTIC, R-954 ou ambos segue um mesmo padrão.

Os genes diferencialmente expressos obtidos para cada comparação com seus respectivos símbolos e valores de *fold change* (FC) - número de vezes que um gene difere em nível de expressão entre duas amostras em comparação - e a

significância estatística (valor de  $p$ ) são apresentados nas tabelas de 4 a 9 logo após seus respectivos agrupamentos hierárquicos. Do total de 188 DEGs selecionadas 87 apresentaram um  $FC \geq 1,5$ .



**Figura 19. Agrupamento hierárquico das amostras e dos genes diferencialmente expressos em tumores de camundongos tratados com PBS (controle) e Dacarbazina (DTIC).** As amostras foram agrupadas segundo o padrão de expressão gênica através da correlação de Pearson pelo algoritmo SOM (*Self-Organizing map*), disponível no programa MeV (*MultiExperiment Viewer*).

**Tabela 4.** Genes diferencialmente expressos quando comparado animais do grupo controle (tratados com PBS) e animais tratados com o quimioterápico Dacarbazina (DTIC) (Controle x DTIC).

<b>Símbolo</b>	<b>Nome do gene</b>	<b>FC</b>	<b>“P”</b>
Cd24a	CD24a antigen	3.01	0.0088
Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide	2.74	0.0312
6720427I07Rik	RIKEN cDNA 6720427I07 gene	2.49	0.0403
Sfrs18	splicing factor, arginine/serine-rich 18	2.29	0.0020
D930016D06Rik	RIKEN cDNA D930016D06 gene	2.15	0.0399
BB182297	expressed sequence BB182297	1.95	0.0005
Cent2	cyclin T2	1.91	0.0187
Vps13a	vacuolar protein sorting 13A (yeast)	1.89	0.0102
Tmem30a	transmembrane protein 30A	1.88	0.0326
Cacnb4	calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit	1.75	0.0248
6720401G13Rik	RIKEN cDNA 6720401G13 gene	1.74	0.0159
Hnrph3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	1.72	0.0223
Scn1a	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha	1.67	0.0045
Pias2	protein inhibitor of activated STAT 2	1.67	0.0091
Enah	enabled homolog (Drosophila)	1.67	0.0072
Itgb3bp	integrin beta 3 binding protein (beta3-endonexin)	1.66	0.0049
Tomm70a	translocase of outer mitochondrial membrane 70 homolog A (yeast)	1.63	0.0073
Atad2	ATPase family, AAA domain containing 2	1.60	0.0068
A530054K11Rik	RIKEN cDNA A530054K11 gene	1.58	0.0019
---	15 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D930002E06 product:hypothetical protein, full insert sequence	1.57	0.0003
Pter	phosphotriesterase related	1.55	0.0052
Ppargc1a	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha	1.55	0.0058
Anln	anillin, actin binding protein (scraps homolog, Drosophila)	1.53	0.0156
Rgs2	regulator of G-protein signaling 2	1.53	0.0053
6330503K22Rik	RIKEN cDNA 6330503K22 gene	1.52	0.0030
2010315B03Rik	RIKEN cDNA 2010315B03 gene	1.50	0.0028
Tmcc1	Transmembrane and coiled coil domains 1	1.50	0.0041
Cdc7	cell division cycle 7 (S. cerevisiae)	1.46	0.0007

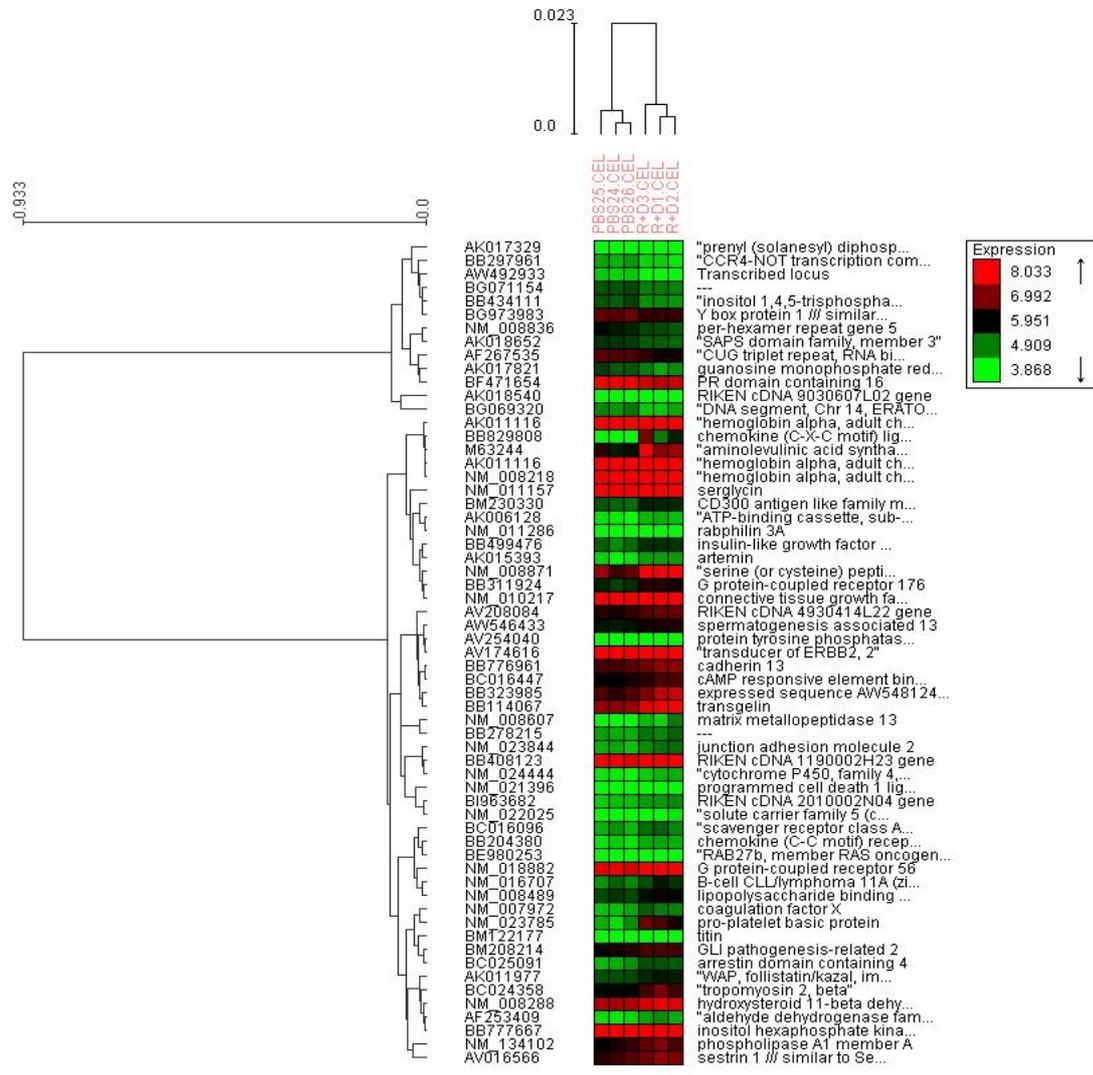
Legenda: As tabelas apresentam os genes diferencialmente expressos identificados simultaneamente pelos algoritmos Limma e Teste t que apresentaram valor de  $p < 0,05$ . Os genes que apresentaram  $p < 0,01$  estão sombreados. FC – *Fold change* - número de vezes que um gene difere em nível de expressão entre duas amostras em comparação. P - Valor de “P” (significância estatística). Valores negativos indicam que o gene esta sendo hipoeexpresso e valores positivos significam que o gene esta hiperexpresso.



**Tabela 5.** Genes diferencialmente expressos quando comparado animais do grupo controle (tratados com PBS) e animais tratados com o antagonista R-954 (Controle x R-954).

<b>Símbolo</b>	<b>Nome do gene</b>	<b>FC</b>	<b>P</b>
Hspa1b	heat shock protein 1B	-3.12	0.0162
Nrp2	neuropilin 2	-2.08	0.0403
Ints1	integrator complex subunit 1	-2.02	0.0449
Lasp1	LIM and SH3 protein 1	-1.73	0.0143
Adm	adrenomedullin	-1.70	0.0386
Kctd12	potassium channel tetramerisation domain containing 12	-1.67	0.0400
Bmp2k	BMP2 inducible kinase	-1.63	0.0495
Entpd4 ///	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4 /// similar to ectonucleoside triphosphate		
LOC100048085	diphosphohydrolase 4	-1.62	0.0145
H3f3b	H3 histone, family 3B	-1.56	0.0125
Nnt	nicotinamide nucleotide transhydrogenase	-1.53	0.0244
A630054L15Rik	RIKEN cDNA A630054L15 gene	-1.51	0.0286
Lmo7	LIM domain only 7	-1.49	0.0474
Sfxn2	Sideroflexin 2	-1.46	0.0268
Armxc2	armadillo repeat containing, X-linked 2	-1.46	0.0421
AI429214	Expressed sequence AI429214	-1.45	0.0160
---	16 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9630010F18 product:unclassifiable, full insert sequence	-1.44	0.0422
Egr2	early growth response 2	-1.44	0.0442
Smyd5	SET and MYND domain containing 5 tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon	-1.43	0.0206
Ywhae	polypeptide	-1.42	0.0202
Tubb2b	tubulin, beta 2b	-1.42	0.0032
Lasp1	LIM and SH3 protein 1	-1.42	0.0062
Rapgef3	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3	-1.42	0.0074
Cyfp2	cytoplasmic FMR1 interacting protein 2	-1.40	0.0273
Speg	SPEG complex locus	-1.40	0.0265
Tm7sf3	Transmembrane 7 superfamily member 3	-1.40	0.0387
Klhl30	kelch-like 30 (Drosophila)	-1.40	0.0318
Kpnb1	karyopherin (importin) beta 1	-1.39	0.0016
8430427H17Rik	RIKEN cDNA 8430427H17 gene	-1.39	0.0081
Abtb2	ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2	-1.38	0.0408
Abcb1b	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B	-1.38	0.0208

Laptm4b	lysosomal-associated protein transmembrane 4B	-1.35	0.0027
Nr2c1	nuclear receptor subfamily 2, group C, member 1	-1.32	0.0071
G0s2	G0/G1 switch gene 2	1.65	0.0495
Trdmt1	tRNA aspartic acid methyltransferase 1	1.64	0.0471
0610040B09Rik	RIKEN cDNA 0610040B09 gene	1.55	0.0135
Cep135	centrosomal protein 135	1.55	0.0349
---	16 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9630050J22 product:unclassifiable, full insert sequence	1.53	0.0370
Tssk3	testis-specific serine kinase 3	1.52	0.0120
4921517L17Rik	RIKEN cDNA 4921517L17 gene	1.50	0.0334
Chordc1	Cysteine and histidine-rich domain (CHORD)- containing, zinc-binding protein 1	1.49	0.0188
Zfp469	zinc finger protein 469	1.49	0.0324
Tcte2	t-complex-associated testis expressed 2	1.49	0.0396
4933428P19Rik	RIKEN cDNA 4933428P19 gene	1.45	0.0482
Ttf1	transcription termination factor 1	1.44	0.0337
Bcl6	B-cell leukemia/lymphoma 6	1.44	0.0260
---	Transcribed locus	1.44	0.0280
Nup54	nucleoporin 54	1.44	0.0267
Asah3	N-acylsphingosine amidohydrolase (alkaline ceramidase) 3	1.42	0.0143
Rab2b	RAB2B, member RAS oncogene family	1.42	0.0087
1700065I16Rik	gasdermin domain containing 2 /// RIKEN		
4933426G20Rik	cDNA 4933426G20 gene /// RIKEN cDNA		
/// Gsdmdc2 ///	1700065I16 gene /// similar to Gasdermin		
LOC665769	domain containing protein RGD1359449	1.41	0.0363
C8b	complement component 8, beta subunit	1.40	0.0058
Gucy1b3	guanylate cyclase 1, soluble, beta 3	1.40	0.0143
Aqp3	aquaporin 3	1.40	0.0074
Cyp2b10	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10	1.39	0.0127
Ptar1	protein prenyltransferase alpha subunit repeat containing 1	1.39	0.0431
Zfp248	zinc finger protein 248	1.38	0.0421
Fancb	Fanconi anemia, complementation group B	1.38	0.0148
Elf2	E74-like factor 2	1.38	0.0208
---	Transcribed locus	1.37	0.0358
LOC100047530	oxysterol binding protein-like 10 /// similar to oxysterol-binding protein-like protein		
/// Osbp110	OSBPL10	1.37	0.0047
Tnrc15	trinucleotide repeat containing 15	1.37	0.0422
Heatr5b	HEAT repeat containing 5B	1.36	0.0080
4930550L24Rik	RIKEN cDNA 4930550L24 gene	1.36	0.0123
Trdn	triadin	1.36	0.0024

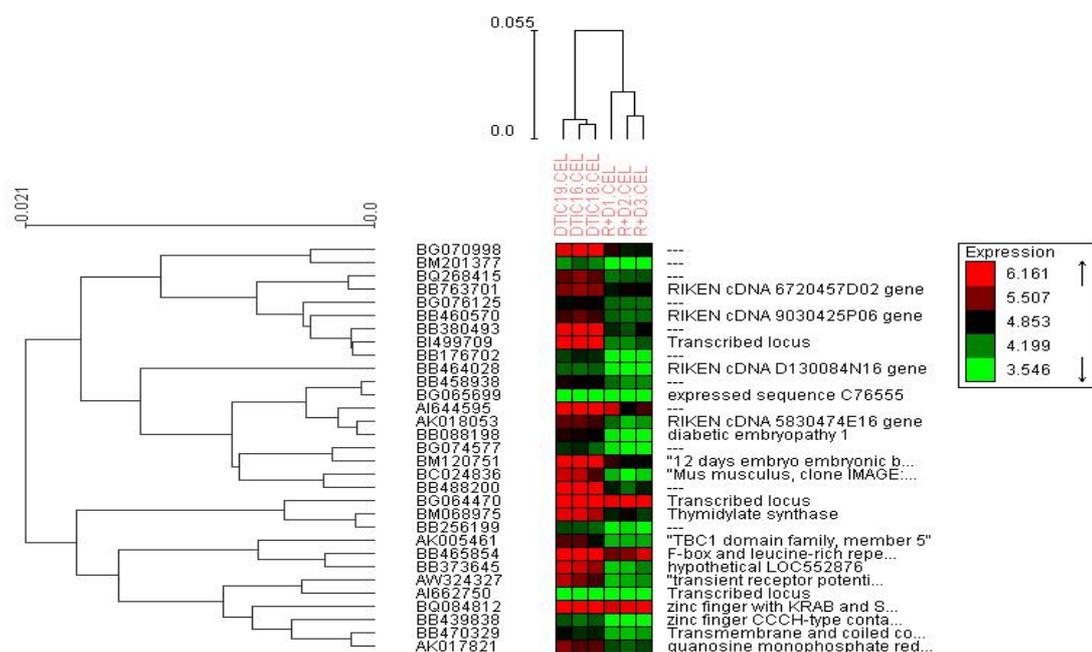


**Figura 21. Agrupamento hierárquico das amostras e dos genes diferencialmente expressos em tumores de camundongos tratados com PBS (controle) e R-954 +Dacarbazina (R+D).** As amostras foram agrupadas segundo o padrão de expressão gênica através da correlação de Pearson pelo algoritmo SOM (Self-organizing map), disponível no programa MeV (MultiExperiment Viewer).

**Tabela 6.** Genes diferencialmente expressos quando comparado animais do grupo controle (tratados com PBS) e animais tratados concomitantemente com o quimioterápico Dacarbazina (DTIC) e R-954 (Controle x R+D).

<b>Símbolo</b>	<b>Nome do gene</b>	<b>FC</b>	<b>P</b>
Gmpr2	guanosine monophosphate reductase 2	-1.48	0.0265
Itpkb	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B	-1.46	0.0241
Cugbp1	CUG triplet repeat, RNA binding protein 1	-1.40	0.0461
Phxr5	per-hexamer repeat gene 5	-1.38	0.0121
D14ErtD725e	DNA segment, Chr 14, ERATO Doi 725, expressed	-1.37	0.0274
Cnot10	CCR4-NOT transcription complex, subunit 10	-1.35	0.0173
9030607L02Rik	RIKEN cDNA 9030607L02 gene	-1.35	0.0460
Pdss2	prenyl (solanesyl) diphosphate synthase, subunit 2	-1.32	0.0373
LOC100045189 /// LOC630930 /// LOC677262	Y box protein 1 /// similar to nuclease sensitive element binding protein 1 /// similar to transcription factor EF1(A)	-1.31	0.0139
Prdm16	PR domain containing 16	-1.30	0.0042
Saps3	SAPS domain family, member 3	-1.27	0.0019
Cxcl3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	6.50	0.0323
Ppbb	pro-platelet basic protein	4.23	0.0050
Serpine1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	3.90	0.0125
Srgn	Serglycin	3.21	0.0497
Hba-a1 /// Hba-a2	hemoglobin alpha, adult chain 1 /// hemoglobin alpha, adult chain 2	3.19	0.0286
Alas2	aminolevulinic acid synthase 2, erythroid	3.00	0.0204
Ctgf	connective tissue growth factor	2.91	0.0099
Tagln	Transgelin	2.23	0.0482
Mmp13	matrix metalloproteinase 13	2.18	0.0279
AW548124 /// LOC100048505	expressed sequence AW548124 /// similar to Expressed sequence AW548124	1.81	0.0390
Hba-a1 /// Hba-a2	hemoglobin alpha, adult chain 1 /// hemoglobin alpha, adult chain 2	1.77	0.0238
Tpm2	tropomyosin 2, beta	1.72	0.0459
Hba-a1 /// Hba-a2	hemoglobin alpha, adult chain 1 /// hemoglobin alpha, adult chain 2	1.72	0.0246
Arrdc4	arrestin domain containing 4	1.63	0.0235
Gpr176	G protein-coupled receptor 176	1.62	0.0171
1190002H23Rik	RIKEN cDNA 1190002H23 gene	1.60	0.0263
Plal1a	phospholipase A1 member A	1.58	0.0439
Bcl11a	B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)	1.57	0.0396
F10	coagulation factor X	1.49	0.0189
Artn	Artemin	1.48	0.0251

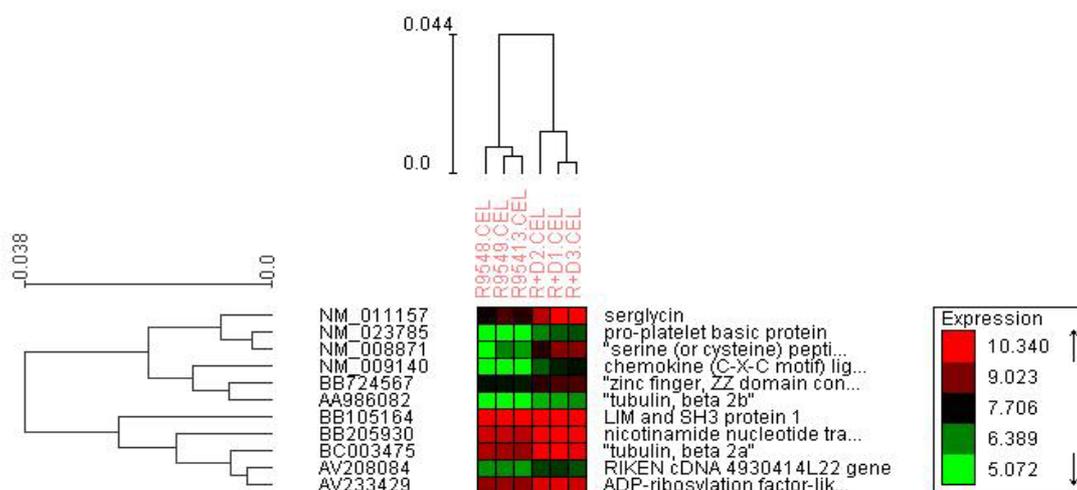
Lbp	lipopolysaccharide binding protein	1.47	0.0124
LOC100047324 ///	sestrin 1 /// similar to Sesn1 protein	1.46	0.0413
Sesn1			
Cd300lf ///	CD300 antigen like family member F /// similar to CD300 antigen like family	1.45	0.0155
LOC100047115	member F		
Igf2bp1	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1	1.45	0.0444
Tob2	transducer of ERBB2, 2	1.45	0.0310
Aldh1a3	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A3	1.44	0.0253
4930414L22Rik	RIKEN cDNA 4930414L22 gene	1.41	0.0113
Scara5	scavenger receptor class A, member 5 (putative)	1.41	0.0367
Jam2	junction adhesion molecule 2	1.40	0.0214
Slc5a7	solute carrier family 5 (choline transporter), member 7	1.39	0.0109
Cdh13	cadherin 13	1.38	0.0279
Creb3l1	cAMP responsive element binding protein 3-like 1	1.38	0.0234
Gpr56	G protein-coupled receptor 56	1.36	0.0238
Hsd11b1	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	1.35	0.0086
Glipr2	GLI pathogenesis-related 2	1.35	0.0353
Abcc3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	1.34	0.0104
Cyp4f18 ///	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 18 /// similar to cytochrome	1.34	0.0160
LOC100044439	P450 CYP4F18		
Ptpdc1	protein tyrosine phosphatase domain containing 1	1.34	0.0393
Ccr7	chemokine (C-C motif) receptor 7	1.33	0.0242
Ihpk2	inositol hexaphosphate kinase 2	1.33	0.0346
Ttn	titin	1.32	0.0071
Wfikkn2	WAP, follistatin/kazal, immunoglobulin, kunitz and netrin domain containing 2	1.32	0.0123
Rab27b	RAB27b, member RAS oncogene family	1.31	0.0379
Rph3a	rabphilin 3A	1.31	0.0112
2010002N04Rik	RIKEN cDNA 2010002N04 gene	1.31	0.0099
Pdcd1lg2	programmed cell death 1 ligand 2	1.31	0.0100
Spata13	spermatogenesis associated 13	1.29	0.0041



**Figura 22. Agrupamento hierárquico das amostras e dos genes diferencialmente expressos em tumores de camundongos tratados com DTIC e R-954+Dacarbazina (R+D).** As amostras foram agrupadas segundo o padrão de expressão gênica através da correlação de Pearson pelo algoritmo SOM (Self-organizing map), disponível no programa MeV (MultiExperiment Viewer).

**Tabela 7.** Genes diferencialmente expressos quando comparado animais tratados com DTIC e animais tratados concomitantemente com Dacarbazina (DTIC) e com o antagonista R-954 (DTIC x R+D).

Símbolo	Nome do gene	FC	P
Fbxl7	F-box and leucine-rich repeat protein 7	-3.89	0.0047
LOC552876	hypothetical LOC552876	-3.87	0.0014
---	Mus musculus, clone IMAGE:5356448, mRNA	-3.85	0.0043
Dep1	diabetic embryopathy 1	-3.16	0.0134
Trpc2	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 2	-2.94	0.0143
Tyms	Thymidylate synthase	-2.39	0.0040
5830474E16Rik	RIKEN cDNA 5830474E16 gene	-2.36	0.0136
Tbc1d5	TBC1 domain family, member 5	-2.33	0.0197
Zc3h15	zinc finger CCCH-type containing 15	-2.16	0.0032
Zkscan3	zinc finger with KRAB and SCAN domains 3	-1.98	0.0032
Gmpr2	guanosine monophosphate reductase 2	-1.95	0.0023
9030425P06Rik	RIKEN cDNA 9030425P06 gene	-1.91	0.0080
D130084N16Rik	RIKEN cDNA D130084N16 gene	-1.80	0.0059
Tmcc1	Transmembrane and coiled coil domains 1	-1.72	0.0023
6720457D02Rik	RIKEN cDNA 6720457D02 gene	-1.65	0.0016



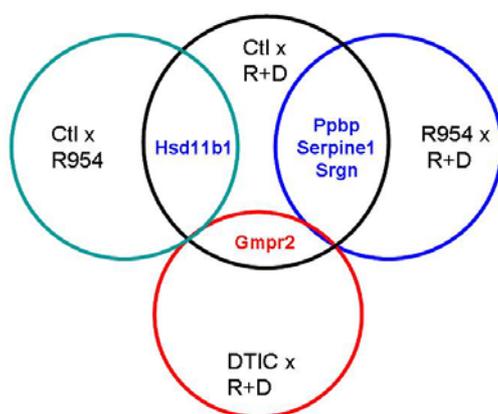
**Figura 23. Agrupamento hierárquico das amostras e dos genes diferencialmente expressos em tumores de camundongos tratados com R-954 comparados a R-954 +Dacarbazina (R+D).** As amostras foram agrupadas segundo o padrão de expressão gênica através da correlação de Pearson pelo algoritmo SOM (Self-organizing map), disponível no programa MeV (MultiExperiment Viewer).

**Tabela 8.** Genes diferencialmente expressos quando comparado animais tratados com R-954 e animais tratados concomitantemente com o quimioterápico Dacarbazina (DTIC) e com o antagonista R-954 (R-954 x R+D).

Símbolo	Descrição do gene	FC	P
Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	9.06	0.0023
Serpine1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	7.86	0.0113
Ppbp	pro-platelet basic protein	4.35	0.0090
Srgn	Serglycin	4.22	0.0118
Tubb2b	tubulin, beta 2b	2.16	0.0116
Lasp1	LIM and SH3 protein 1	2.02	0.0031
Zzz3	zinc finger, ZZ domain containing 3	1.82	0.0164
Tubb2a	tubulin, beta 2 <sup>a</sup>	1.80	0.0019
4930414L22Rik	RIKEN cDNA 4930414L22 gene	1.78	0.0042
Nnt	nicotinamide nucleotide transhydrogenase	1.74	0.0025
Arl8b	ADP-ribosylation factor-like 8B	1.67	0.0100

Cinco genes foram identificados como diferencialmente expressos em duas comparações simultaneamente, como mostra a figura 24. O gene Gmpr2 - Guanosine monophosphate reductase 2 – foi encontrado com expressão reduzida nas comparações Controle x R+D e DTIC x R+D; os genes: Ppbp - Pro-platelet basic

protein; Srgn – Serglycin e Serpine1 - Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1- foram encontrados com expressão aumentada nas comparações Controle x R-954 e R-954 x R+D e o gene Hsd11b1 - Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1 – também foi encontrado superexpresso nas comparações Controle x DTIC e Controle x R+D.



Gene	FC	FC
Gmpr2	Ctl x R+D -1.48	DTIC x R+D -1.95
Hsd11b1	Ctl x DTIC 1.33	Ctl x R+D 1.35
Ppbp	Ctl x R+D 4.23	R-954 x R+D 4.35
Srgn	Ctl x R+D 3.21	R-954 x R+D 4.22
Serpine1	Ctl x R+D 3.90	R-954 x R+D 7.86

**Figura 24. Diagrama de Venn dos genes diferencialmente expressos encontrados em comum entre duas ou mais análises.** O gene Gmpr2-Guanosine monophosphate reductase 2 – foi encontrado com expressão reduzida nas comparações Controle x R+D e DTIC x R+D; os genes: Ppbp - Pro-platelet basic protein; Srgn – Serglycin e Serpine1 - Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1- foram encontrados com expressão aumentada nas comparações Controle x R-954 e R-954 x R+D e o gene Hsd11b1 - Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1 – também foi encontrado superexpresso nas comparações Controle x DTIC e Controle x R+D. A tabela ao lado apresenta os valores de *Fold Change* desses genes obtidos em cada análise.

Na tabela 9 são destacados alguns genes diferencialmente expressos cujas funções biológicas são de interesse do nosso grupo de pesquisa e podem contribuir para a compreensão de mecanismos-chave envolvidos na progressão tumoral e na resistência/falha dos tratamentos quimioterápicos. Como os genes envolvidos no funcionamento do sistema imune, no processo de angiogênese, nos processos de

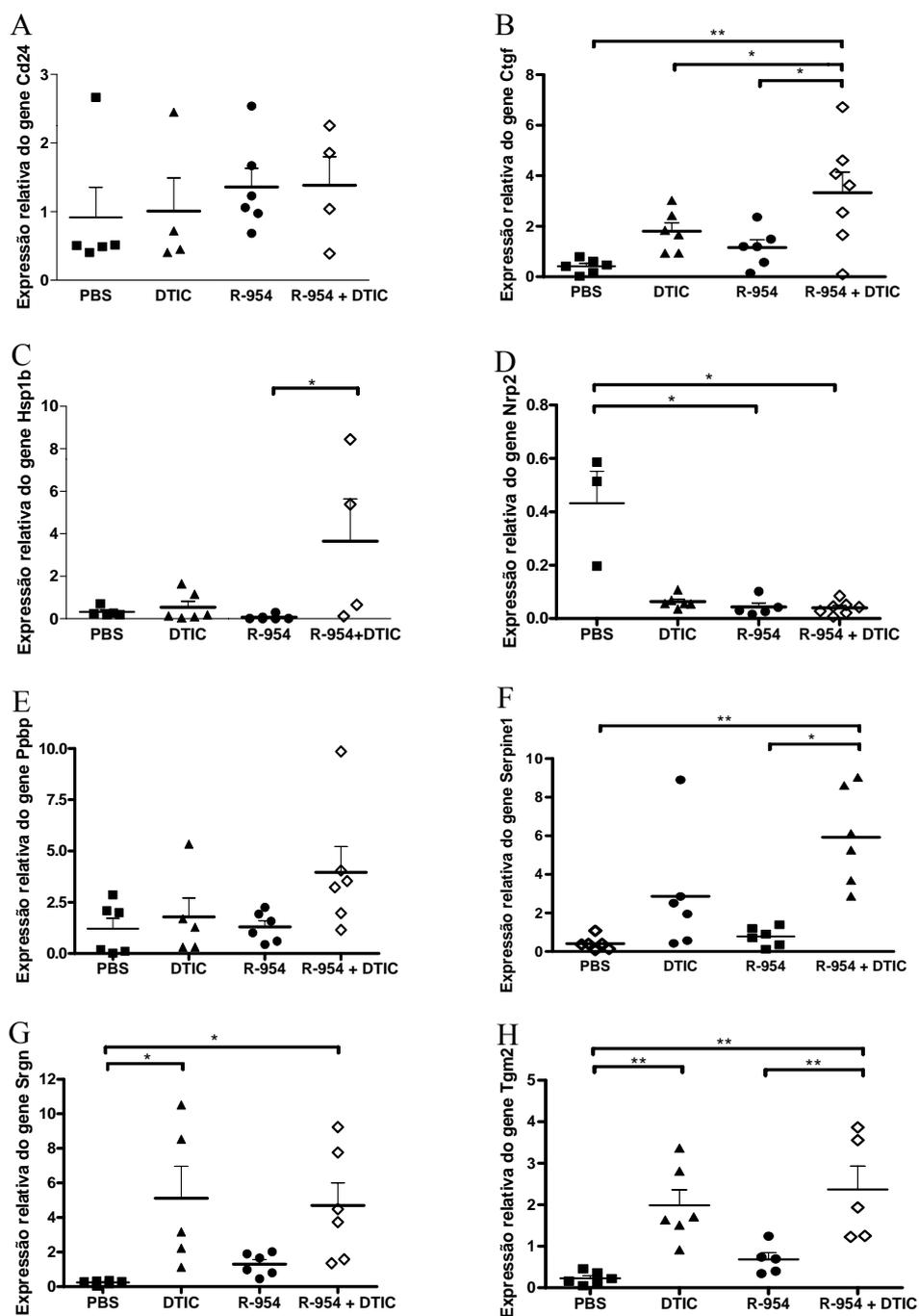
invasão e metástase, nos mecanismos de ação de drogas, proliferação, morte e adesão celular, entre outros.

#### 4.5 VALIDAÇÃO DE RESULTADOS DOS MICROARRANJOS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS POR RT-PCR EM TEMPO REAL.

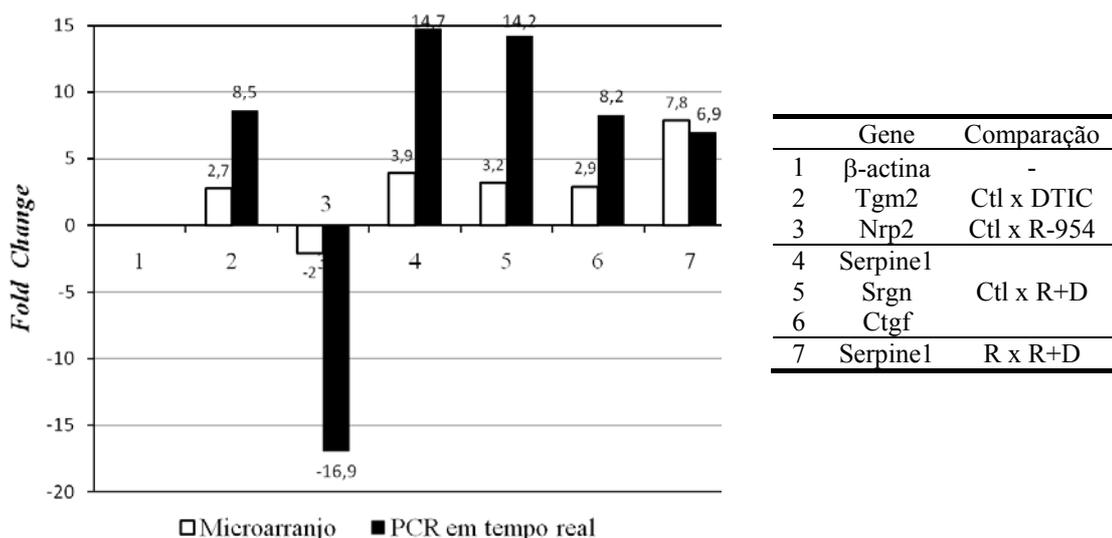
Para validação dos dados obtidos no experimento de microarranjo de oligonucleotídeos, foram escolhidos 8 genes de interesse identificados como diferencialmente expressos para quantificação relativa da expressão gênica por RT-PCR em tempo real. Foram testadas as mesmas amostras de melanoma murino utilizadas no experimento de microarranjo, porém o número de amostras foi ampliado de 3 para até 7 por grupo. Os ensaios foram feitos em duplicata e a expressão do gene da b-actina foi utilizado como normalizador. Os genes avaliados foram: antígeno CD24a; Fator de crescimento do tecido conjuntivo (*Connective tissue growth factor* – Ctgf); Proteína de choque térmico 1B (*Heat shock protein 1B* – Hsp1b); Neuropilina 2 (*Neuropilin 2* – Nrp2); Proteína básica pró-plaqueta ou ligante 7 de quimiocina (pro-platelet basic protein - Ppbp); Serglicina (Serglycin – Srgn); Inibidor de serino (cisteíno)- peptidase [Serine (or cysteine) peptidase inhibitor - Serpine1] e Transglutaminase-2 (Tgm2).

**Tabela 9.** Genes diferencialmente expressos cujas funções biológicas são relevantes para a compreensão de mecanismos-chave envolvidos na progressão tumoral e na resistência/falha dos tratamentos quimioterápicos.

<b>Sistema imune</b>	<b>Angiogênese</b>	<b>Invasão e metástase</b>	<b>Mecanismos de ação de drogas</b>	<b>Outros (proliferação, morte e adesão celular)</b>
CD24a	Neuropilin 2	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor (Serpine1)	Heat shock protein 1B	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1
Linker for activation of T cells	Matrix metallopeptidase 13		Thymidylate synthase	Protein kinase C, beta 1
Platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, alpha1 subunit		G protein-coupled receptor 56	Cytochrome P450	Inositol hexaphosphate kinase 2
Fc receptor-like A (Fcrla)	Connective tissue growth factor		Guanosine monophosphate reductase 2	B-cell CLL/lymphoma 11A
Colony stimulating factor 2 receptor	Thrombospondin 1		Lysosomal-associated protein transmembrane 4B	
CXC chemokine ligand 7 ou Pro-platelet basic protein				Serglycin
Chemokine (C-C motif) receptor 7				LIM and SH3 Protein 1
Chemokine (C-X-C motif) ligand 3				Aquaporin 3
Junction adhesion molecule 2		Transgelin		Bcl-6
	Transglutaminase-2			
		Cadherin 13		CD24a
	LIM e SH3 Protein 1			



**Figura 25.** Análise da expressão relativa por RT-PCR em tempo real dos genes: A) CD24a; B) Fator de crescimento do tecido conjuntivo (Ctgf); C) Proteína de choque térmico 1B (Hsp1b); D) Neuropilina 2 (Nrp2); E) Proteína básica pró-plaqueta (Pbbp); F) Serglicina (Srgn); G) Inibidor de serino (cisteíno)-peptidase (Serpine1) e H) Transglutaminase-2 (Tgm2). A expressão relativa de cada gene foi calculada usando a equação:  $(E_{alvo})^{\Delta CT_{alvo}} / (E_{normalizador})^{\Delta CT_{normalizador}}$ . A barra central mostra a média de 3-7 fragmentos tumorais analisados por grupo e a barra menor o erro padrão da média. A análise estatística foi realizada pelo teste *One Way ANOVA* ou *Kruskal-Wallis* (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ).



**Figura 26. Análise comparativa da diferença de expressão (*fold change*) de genes selecionados do microarranjo avaliados por PCR em tempo real.** As diferenças de expressão gênica determinadas por microarranjo e por PCR em tempo real são indicadas pelas barras brancas e pretas, respectivamente, e os valores absolutos de *fold change* são indicados na parte superior das barras. A tabela apresenta os genes analisados, indicados por números no gráfico, e as comparações a que se referem os *fold changes*, onde Ctl refere-se ao controle (PBS); DTIC ao tratamento com dacarbazina; R-954 ao tratamento com R-954 e R+D ao tratamento com dacarbazina e R-954 concomitantemente. Os dados são expressos em relação a  $\beta$ -actina (normalizador) que não apresenta diferença de expressão entre as amostras (*fold change* = 0). Todas as comparações apresentam  $p < 0,05$ . (*Fold change* - número de vezes que um gene difere em nível de expressão entre duas amostras em comparação).

A análise da expressão dos genes CD24a e Ppbp (ou Cxcl-7) não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos pela análise de PCR em tempo real (figuras 25A e 26E), não validando, portanto os achados do microarranjo. O gene Ctgf apresentou-se hiperexpresso no tratamento R-954+DTIC comparado aos tratamentos simples com DTIC ou R-954 e com o controle (figura 25B). O gene Hsp1b apresentou-se hiperexpresso no tratamento R-954+DTIC comparado ao tratamento com DTIC (figura 25C). O gene neuropilina-2 apresentou-se hipoexpresso no tratamento com R-954 e R-954+DTIC comparados ao controle

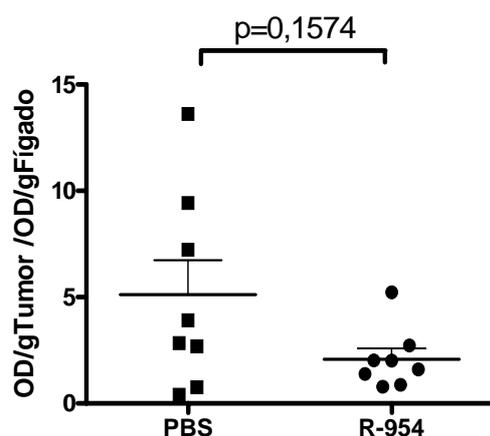
(figura 25D). O gene *Serpine1* apresentou-se hiperexpresso no tratamento R-954+DTIC comparado ao controle e ao tratamento somente com R-954 (figura 25E). O gene serglicina apresentou-se hiperexpresso no tratamento R-954+DTIC e DTIC sozinho quando comparados ao controle (figura 25F). O gene transglutaminase-2 apresentou-se hiperexpresso no tratamento R-954+DTIC e DTIC sozinho quando comparados ao controle e também se apresentou hiperexpresso no tratamento R-954+DTIC comparado ao tratamento somente com R-954 (figura 25G).

Do total de 8 genes avaliados por RT-PCR em tempo real, a análise da expressão de 5 deles foi concordante com os resultados obtidos no microarranjo de DNA. A expressão relativa dos genes *Ctgf*, *neuropilina-2*, *serglicina*, *Serpine1* e *transglutaminase-2*, determinadas por PCR em tempo real, confirmou algumas das relações de hiper ou hipoexpressão desses genes entre determinados grupos de tratamento resultantes da análise do microarranjo (figura 26) e ainda mostraram outras relações não identificadas no microarranjo (figuras 25 e 26). A figura 26 apresenta uma comparação dos *fold changes* obtidos por meio dos dois tipos de análise.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES NA PERMEABILIDADE VASCULAR INTRATUMORAL EM CAMUNDONGOS COM IMPLANTE DE MELANOMA TRATADOS COM R-954.

As cininas são peptídeos envolvidos na modulação da permeabilidade vascular, através de seus receptores B1 e B2. A presença de alterações na

permeabilidade vascular intratumoral no nosso modelo foi verificada por meio da avaliação do “*uptake*” do corante azul de Evans pelo tumor. Os animais foram tratados diariamente com PBS (controle) ou R-954 durante 12 dias, desde um dia antes da implantação das células de melanoma B16-F10. Não foi observada diferença estatística no crescimento e massa tumoral dos camundongos tratados com PBS e R-954 (dados não mostrados). No 12º dia foi injetado intravenosamente o corante azul de Evans e permitido que este percorresse toda a corrente sanguínea e penetrasse nos tecidos. Após a perfusão sanguínea com solução fisiológica, os tumores foram excisados, bem como um tecido não tumoral controle da perfusão, nesse caso o fígado, suas massas foram medidas e o corante foi extraído. A medida do extravasamento do corante azul de Evans no tumor foi calculada pela razão entre a quantidade de azul de Evans (medida em espectrofotômetro - O.D.) por grama de tumor e a quantidade de azul de Evans por grama de fígado, utilizado para corrigir eventuais diferenças na qualidade da perfusão sanguínea entre os animais. A medida de permeabilidade vascular tumoral foi estatisticamente igual entre os camundongos tratados com R-954 e PBS ( $p= 0,15$ ). A figura 27 apresenta um gráfico representativo de 2 experimentos.



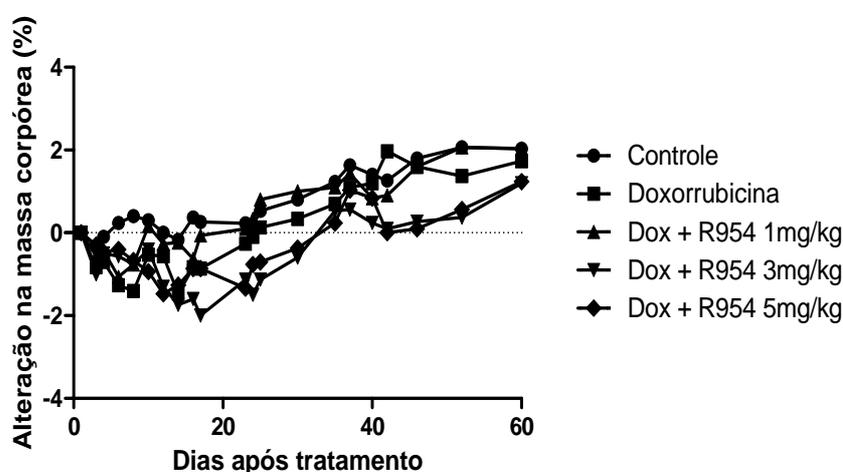
**Figura 27. O tratamento com R-954 não alterou a permeabilidade vascular intratumoral em camundongos com melanoma B16-F10.** 8 Camundongos C57BL/6 foram tratados diariamente com R-954 (1mg/kg s.c.) desde 24 horas antes da implantação tumoral (dia -1) até 12 dias depois quando foi avaliada a permeabilidade vascular intratumoral. Os animais do grupo controle (8) receberam uma injeção diária de PBS (s.c.). A implantação tumoral foi realizada pela injeção subcutânea de  $5 \times 10^5$  células B16-F10 no flanco direito de cada animal. O extravasamento do corante azul de Evans foi dado pela razão entre a quantidade de corante (O.D.) por grama de tumor e a quantidade de corante por grama de fígado. Os pontos representam a média aritmética de 8 tumores  $\pm$  erro padrão da média. A análise estatística foi realizada com teste T de *Student*.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES NA DISTRIBUIÇÃO DA DROGA FLUORESCENTE DOXORRUBICINA NO MICROAMBIENTE DE TUMORES SÓLIDOS EM FUNÇÃO DO TRATAMENTO COM OS ANTAGONISTAS R-954 E R-715.

Uma das razões pela qual os tumores não respondem a quimioterapia esta relacionada a baixa penetração das drogas no microambiente tumoral, permitindo a rápida repopulação do tumor. Nesse contexto, os receptores de bradicinina são conhecidos por mediar alterações na função vascular que poderiam por consequência

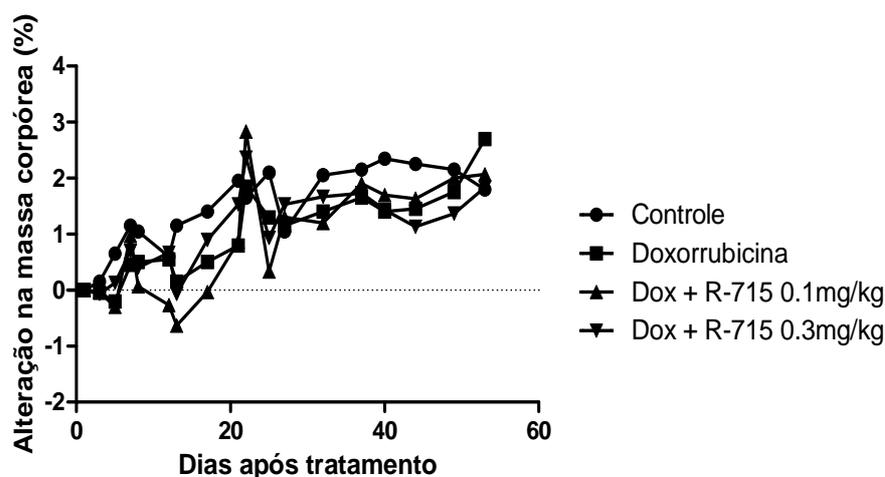
modificar a distribuição/penetração de drogas no microambiente tumoral. Utilizamos nesse modelo a droga fluorescente doxorrubicina para analisar esses parâmetros.

Para avaliar alterações na distribuição de doxorrubicina no microambiente tumoral em resposta a ação dos antagonistas de BKRI, R-954 e R-715, inicialmente foi avaliada a toxicidade da combinação entre essas drogas “in vivo”.



**Figura 28. Ensaio de toxicidade “in vivo” de doxorrubicina associada ao antagonista R-954.** Camundongos BALB/c foram tratados previamente com PBS (s.c) ou R-954 nas doses de 1, 3 e 5mg/kg (s.c.) e 2 horas depois com doxorrubicina (dox) 32mg/kg (i.v) ou não receberam nenhuma droga (controle). Os pontos representam a média de 4 camundongos (as barras de erro foram omitidas para melhor visualização). Teste estatístico Kruskal-Wallis seguido do múltiplo teste de Dunn.

A administração combinada das drogas R-954 ou R-715 com o quimioterápico doxorrubicina não se mostrou tóxico nas doses testadas como mostram as figuras 28 e 29 respectivamente, visto que não causaram redução significativa da massa corpórea dos camundongos comparado ao tratamento com doxorrubicina sozinha.

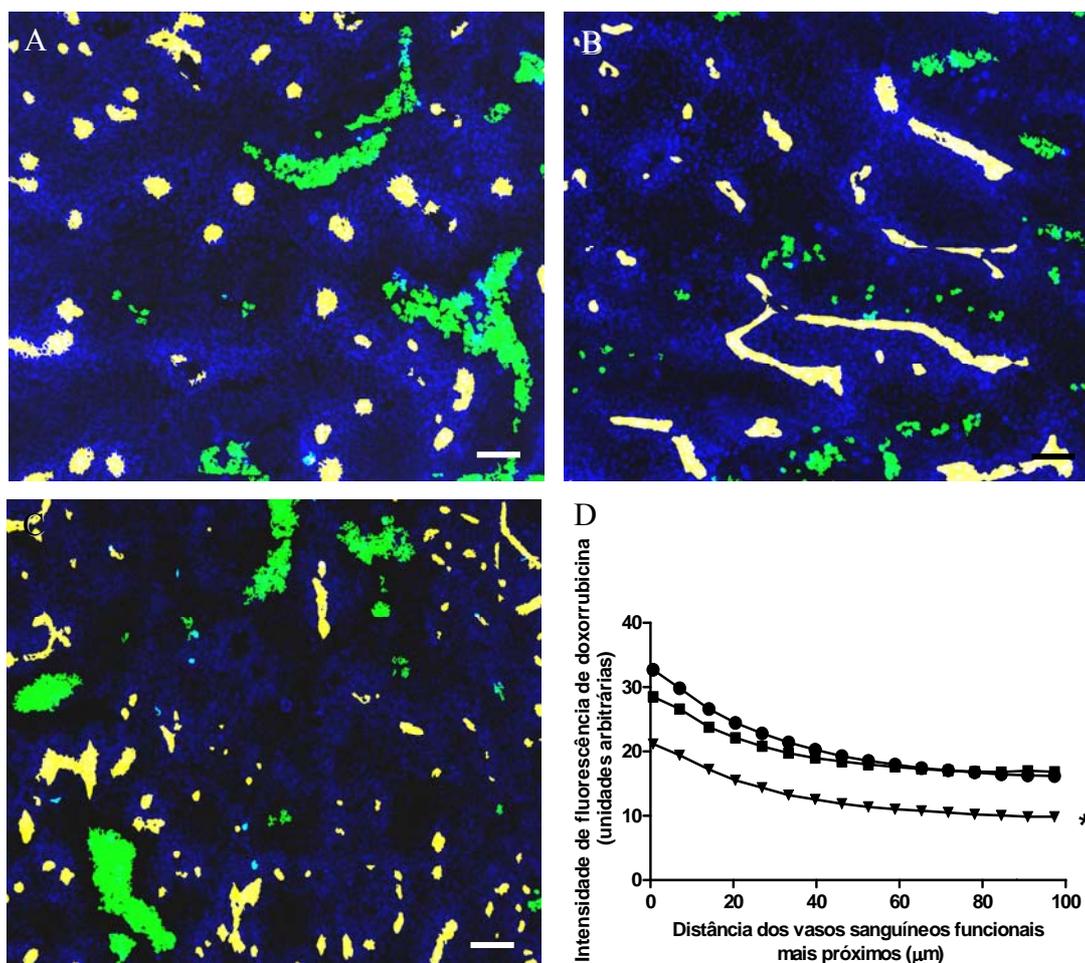


**Figura 29. Ensaio de toxicidade “in vivo” de doxorubicina associada ao antagonista R-715.** Camundongos BALB/c foram tratados previamente com PBS (i.p) ou R-715 (i.p.) nas doses de 0,1 e 0,3mg/kg e 2 horas depois com doxorubicina (dox) 32mg/kg (i.v) ou não receberam nenhuma droga (controle). Os pontos representam a média de 4 camundongos (as barras de erro foram omitidas para melhor visualização). Foi realizado o teste estatístico Kruskal-Wallis seguido do múltiplo teste de Dunn.

A distribuição/penetração de doxorubicina no microambiente tumoral foi então avaliada nos melanomas B16-F10 após duas horas do tratamento com os antagonistas R-954 e R-715, em relação aos vasos sanguíneos funcionais - Dioc-7 (marcador de perfusão) positivos.

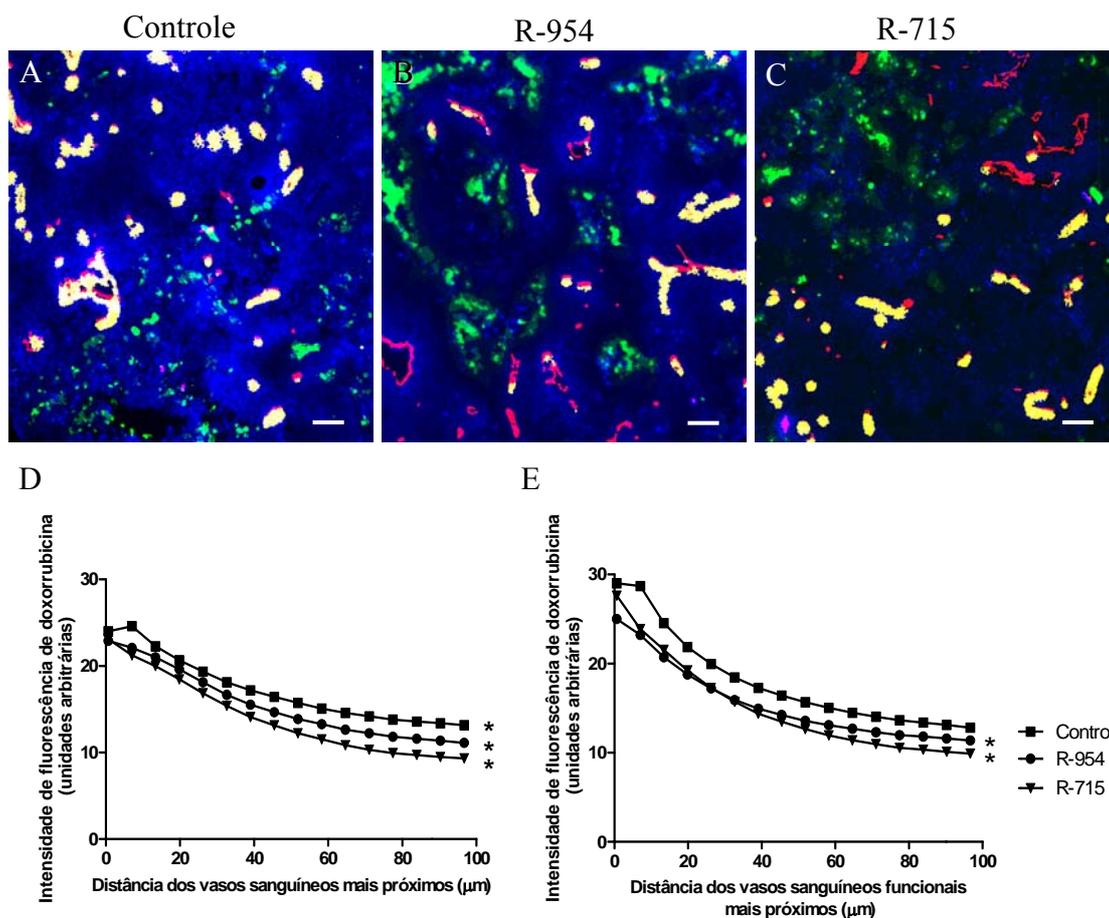
A figura 30 mostra qualitativa e quantitativamente a distribuição de doxorubicina em relação aos vasos sanguíneos no microambiente de melanomas B16-F10 de camundongos tratados com R-954 (B) ou R715 (C). Em todos os grupos a intensidade de doxorubicina tende a ser mais elevada próximo aos vasos sanguíneos e diminui à medida que aumenta a distância dos mesmos, como esperado. Nos tumores B16-F10 a distribuição de doxorubicina mostrou-se semelhante entre os grupos controle e R-954 e os tumores tratados com o antagonista R-715 apresentaram menor intensidade de fluorescência ao longo de toda a curva

comparada ao controle e ao antagonista R-954, ou seja, o antagonista R-715 reduziu a taxa de perfusão de doxorubicina no tumor. Para maior clareza dos resultados as barras de erro foram omitidas nessa figura e nas subsequentes.



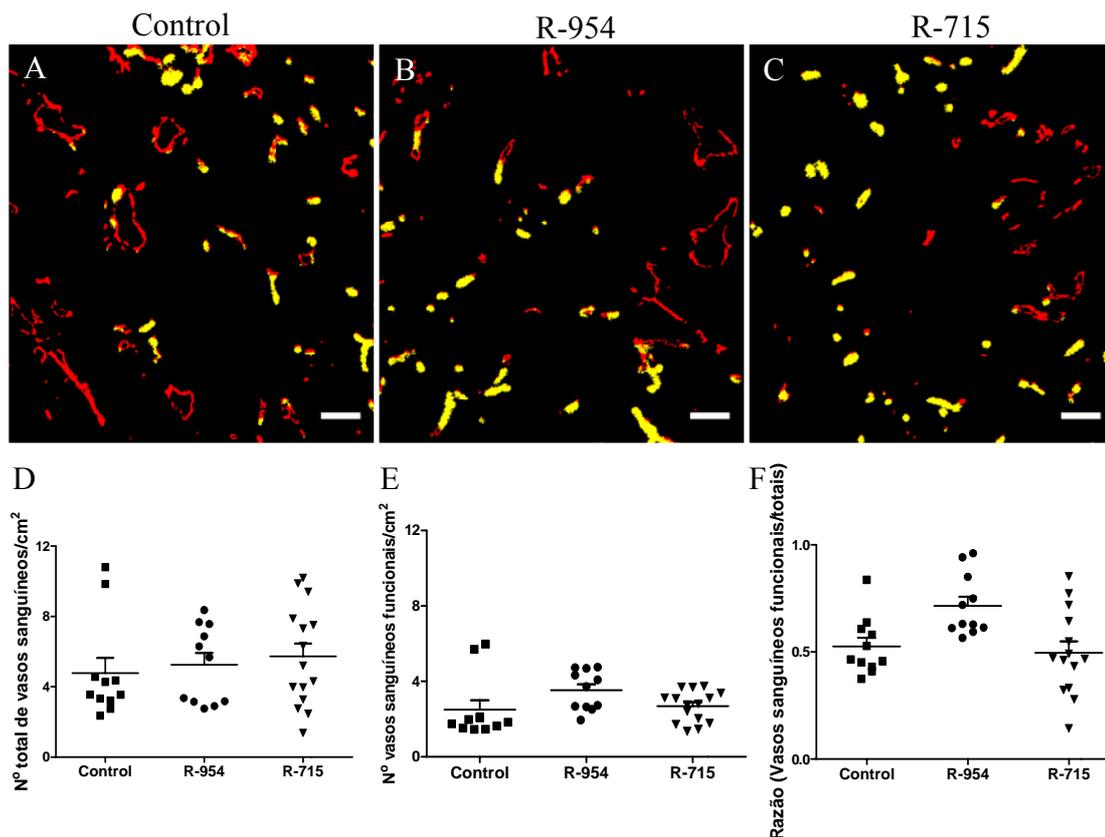
**Figura 30. Distribuição de doxorubicina em relação aos vasos sanguíneos funcionais em tumores B16-F10 (melanoma) tratados com os antagonistas de BKRI R-954 ou R-715 2h antes da injeção de doxorubicina.** A, B e C – Imagens compostas representativas mostrando a distribuição de doxorubicina (azul) em relação aos vasos sanguíneos marcados com o marcador de perfusão DIOC-7 (amarelo), vasos ditos funcionais, em seções de tumores B16-F10 de camundongos tratados com PBS como controle (A), R-954 (B) ou R-715 (C). O verde representa regiões de hipóxia (anticorpo anti-EF5). Barra = 100 μm. D - O gráfico mostra os valores das médias de intensidade de fluorescência de doxorubicina em função da distância dos vasos sanguíneos funcionais mais próximos (■, controle; ●, R-954; ▼, R-715). Os pontos representam a média de 6-8 tumores analisados em 3 diferentes cortes. Foi realizado o teste estatístico Kruskal-Wallis seguido do múltiplo teste de Dunn (\*  $p < 0,001$ ).

Após avaliar o efeito agudo dos antagonistas de BKR1 na distribuição de doxorrubicina no microambiente do tumor, foi analisado também o seu efeito crônico, onde os antagonistas foram administrados diariamente nos camundongos com melanoma e a última dose foi administrada 2 horas antes da injeção de doxorrubicina.



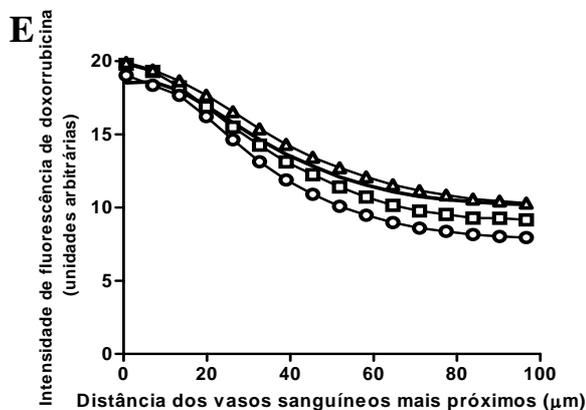
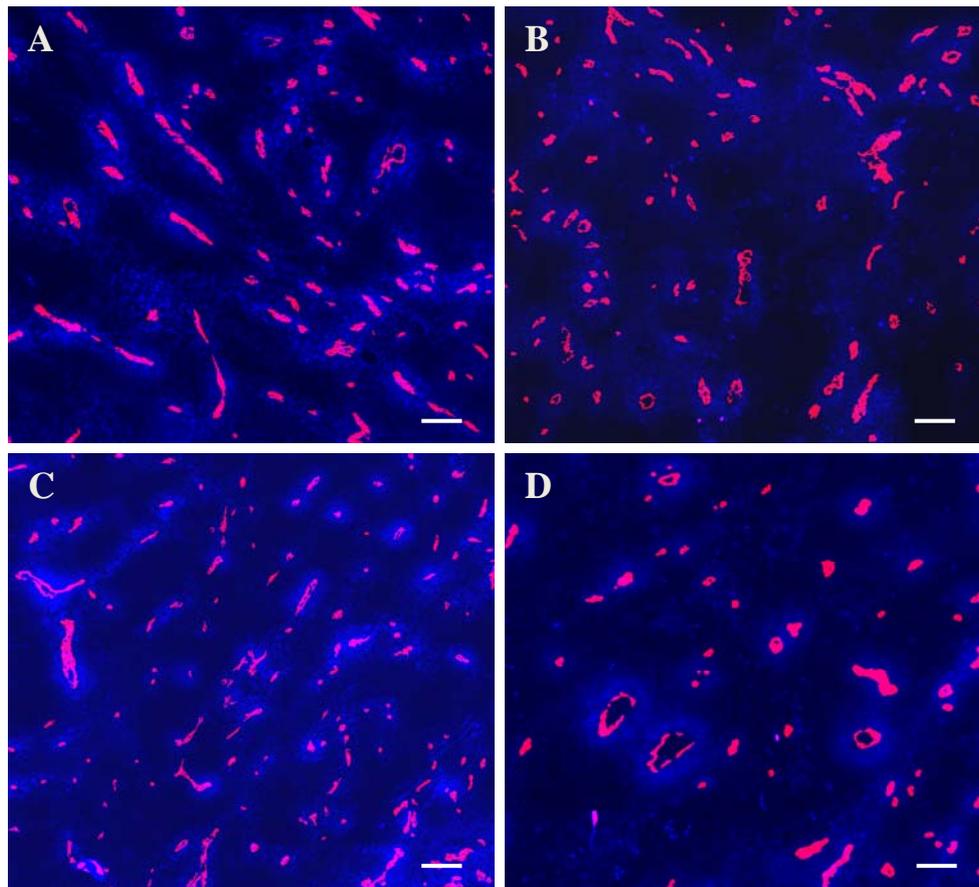
**Figura 31. Distribuição de doxorrubicina em relação aos vasos sanguíneos em tumores B16-F10 tratados diariamente (efeito crônico) com os antagonistas de BKRI R-954 ou R-715.** A, B e C – Imagens compostas representativas mostrando a distribuição de doxorrubicina (azul) em relação aos vasos sanguíneos funcionais, marcados com DiOC-7 (co-localização da marcação com o anticorpo anti-CD31/Cy3 e do marcador de perfusão Dioc-7 – em amarelo), e totais marcados com anticorpo anti-CD31 (vermelho) em secções de tumores B16-F10 de camundongos tratados com PBS, como controle (A), R-954 (B) ou R-715 (C). O verde representa regiões de hipóxia. Barra = 100 μm. D e E - Os gráficos mostram os valores das médias de intensidade de fluorescência de doxorrubicina em função da distância dos vasos sanguíneos totais mais próximos (D) ou funcionais (E) (■, controle; ●, R-954; ▼, R-715). A análise estatística foi realizada com o teste Kruskal-Wallis seguido do múltiplo teste de Dunn (\* p<0,001).

As imagens da figura 31 apresentam a distribuição de doxorubicina em relação aos vasos funcionais e totais, onde se pode observar uma menor intensidade/perfusão de doxorubicina nos tumores tratados com R-715 e R-954, respectivamente, comparados ao controle. Esses resultados foram confirmados pela quantificação de doxorubicina tanto em relação aos vasos sanguíneos funcionais quanto em relação aos vasos totais, como mostram os gráficos 31D e 31E. O tratamento crônico (diário) com os antagonistas de BKR1 não alterou a densidade vascular total dos tumores (figura 32).



**Figura 32. Densidade microvascular em tumores B16-F10 tratados diariamente (efeito crônico) com os antagonistas de BKRI R-954 ou R-715.** Imagens compostas dos vasos sanguíneos mostrando a co-localização da marcação com o anticorpo anti-CD31/Cy3 e do marcador de perfusão Dioc-7 (amarelo) ou a marcação com o anticorpo anti-CD31/Cy3 (vermelho) de secções de tumores B16-F10 tratados diariamente com PBS, como controle (A), R-954 (B) ou R-715 (C). Barra = 100  $\mu$ m. D – Quantificação da densidade vascular tumoral total (número de vasos sanguíneos totais/cm<sup>2</sup> de área tumoral). E - Quantificação da densidade dos vasos tumorais funcionais (número de vasos sanguíneos perfundidos por Dioc-7/cm<sup>2</sup> de área tumoral). F – Razão entre o número de vasos sanguíneos funcionais e totais. A barra mostra a média  $\pm$  erro padrão da média de 11-15 fragmentos tumorais analisados em cada grupo. Teste estatístico One-Way ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

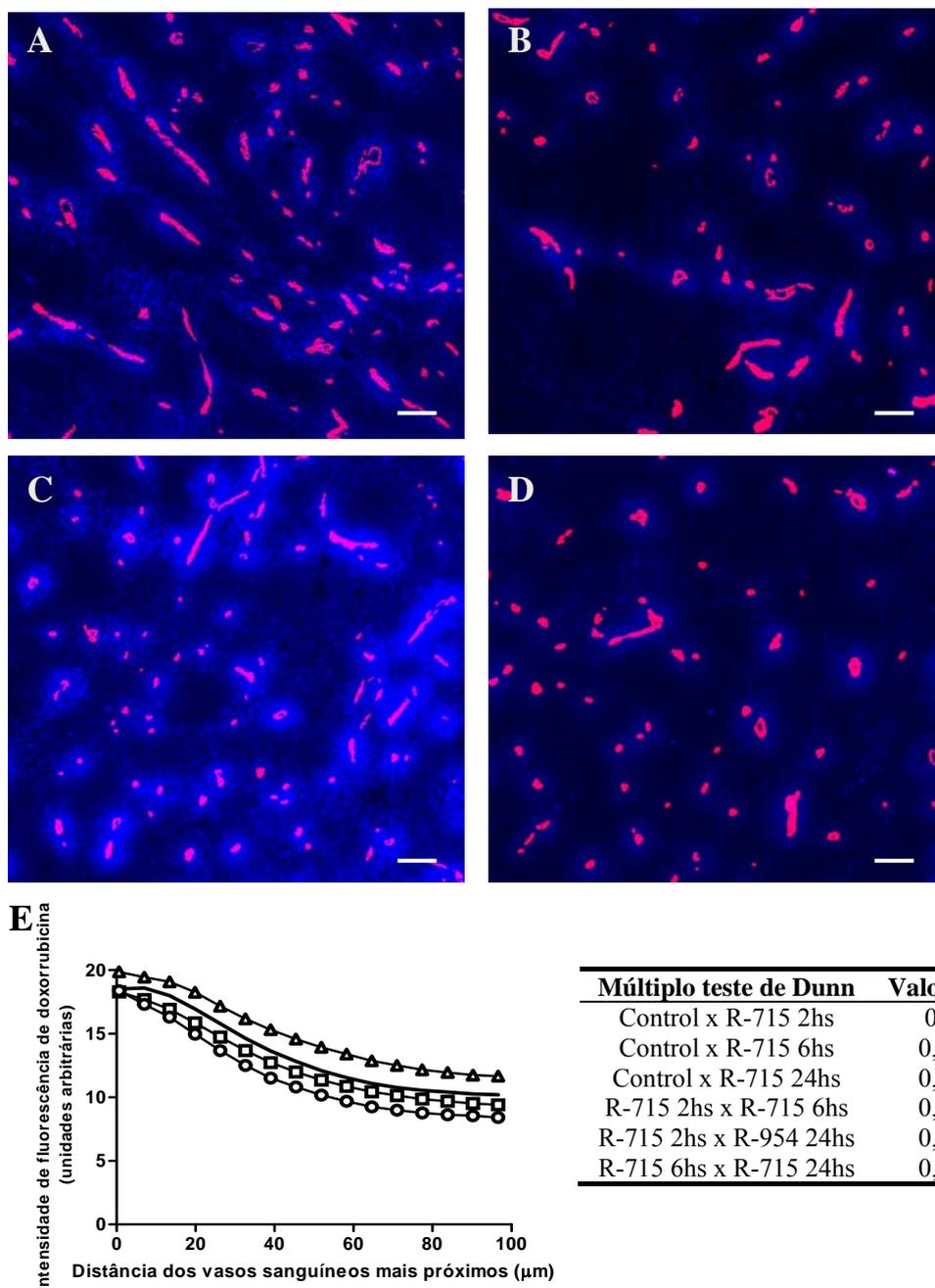
Após avaliar o efeito crônico dos antagonistas de BKR1 na distribuição de doxorrubicina no tumor quando a última dose de antagonista foi administrada 2hs antes da injeção de doxorrubicina, realizamos uma cinética de tratamento onde analisamos os tumores após 2hs (como no experimento anterior), 6hs e 24hs da administração dos antagonistas.



Múltiplo teste de Dunn	Valor de P
Control x R-954 2hs	0,01
Control x R-954 6hs	>0,05
Control x R-954 24hs	0,001
R-954 2hs x R-954 6hs	0,001
R-954 2hs x R-954 24hs	0,001
R-954 6hs x R-954 24hs	0,001

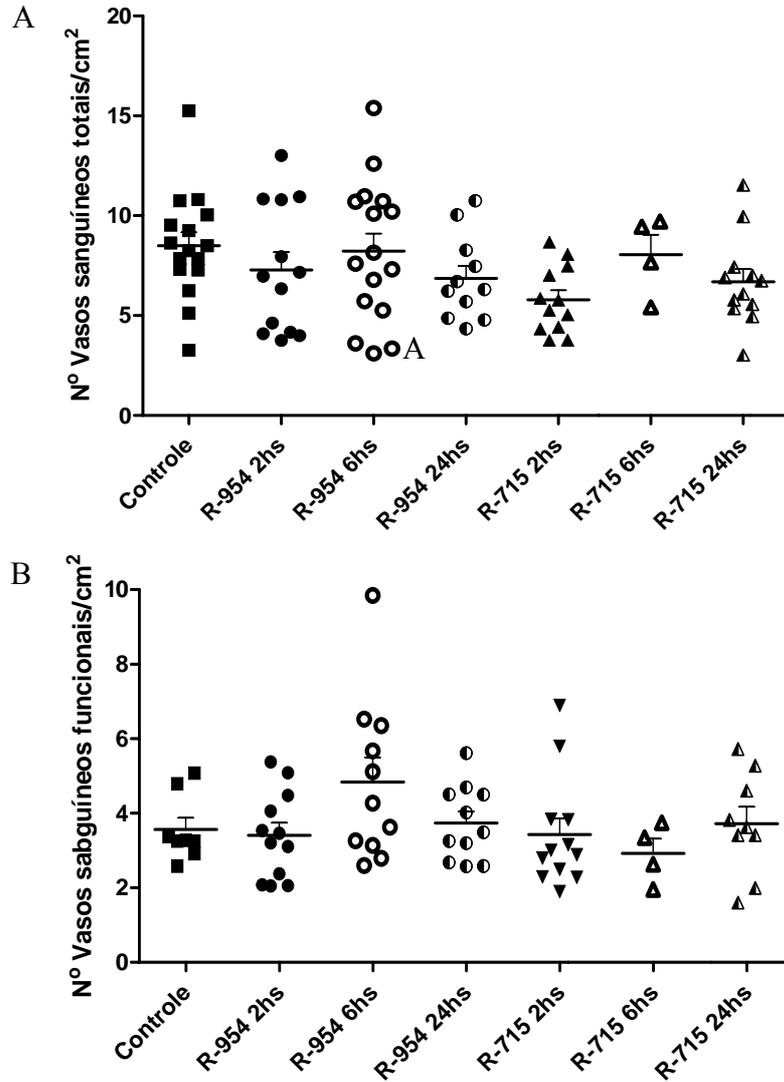
**Figura 33. Distribuição de doxorubicina em relação aos vasos sanguíneos em tumores B16-F10 tratados diariamente (efeito crônico) com o antagonista de BKRI R-954 após 2, 6 e 24hs do tratamento.** A-D) Imagens compostas mostrando a distribuição de doxorubicina (azul) em relação aos vasos sanguíneos totais (vermelho), em secções de tumores B16-F10 de camundongos tratados com PBS, como controle (A), R-954 após 2hs (B), R-954 após 6hs (C) ou R-954 após 24hs (D). Barra = 100  $\mu\text{m}$ . E) Médias de intensidade de fluorescência de doxorubicina em função da distância dos vasos sanguíneos totais mais próximos (—, controle;  $\square$ , R-954 2hs;  $\triangle$ , R-954 6hs;  $\circ$ , R-954 24hs). A análise estatística foi realizada com o teste Kruskal-Wallis seguido do múltiplo teste de Dunn (os valores de “p” são apresentados na tabela).

A figura 33 apresenta a distribuição de doxorubicina em relação aos vasos sanguíneos em tumores tratados cronicamente com R-954 onde se pode observar uma menor intensidade de doxorubicina nos tumores tratados com R-954 após 2 (figura 33B) e 24hs (figura 33D) comparados ao controle (figura 33A) e aos tratados com R-954 após 6hs. A quantificação desses dados apresentada no gráfico 33E mostra que 2hs de tratamento com R-954 piora a distribuição de doxorubicina no tumor (confirmando resultado anterior), após 6hs de tratamento ocorre uma melhora dessa distribuição e após 24hs a intensidade de doxorubicina volta a reduzir.



**Figura 34. Distribuição de doxorubicina em relação aos vasos sanguíneos em tumores B16-F10 tratados diariamente (efeito crônico) com o antagonista de BKRI R-715 após 2, 6 e 24hs do tratamento.** A-D) Imagens compostas mostrando a distribuição de doxorubicina (azul) em relação aos vasos sanguíneos totais (vermelho), em secções de tumores B16-F10 de camundongos tratados com PBS, como controle (A), R-715 após 2hs (B), R-715 após 6hs (C) ou R-715 após 24hs (D). Barra = 100  $\mu$ m. E) Médias de intensidade de fluorescência de doxorubicina em função da distância dos vasos sanguíneos totais mais próximos (—, controle;  $\square$ , R-715 2hs;  $\triangle$ , R-715 6hs;  $\circ$ , R-715 24hs). A análise estatística foi realizada com o teste Kruskal-Wallis seguido do múltiplo teste de Dunn (os valores de “p” são apresentados na tabela).

A cinética observada nos tumores tratados com R-715 é semelhante a observada com R-954. A intensidade de doxorubicina reduz após 2hs de tratamento (comparado ao controle), aumenta após 6hs (neste caso, superando o controle) e volta a reduzir após 24hs, como apresentado na figura 34. Indicando uma janela de ação do antagonista R-715 após 6hs de tratamento.



**Figura 35. Densidade microvascular em tumores B16-F10 tratados diariamente (efeito crônico) com os antagonistas de BKRI R-954 ou R-715 após 2, 6 e 24hs do tratamento.** A) Quantificação da densidade vascular tumoral total (número de vasos sanguíneos totais/cm<sup>2</sup> de área tumoral). B) Quantificação da densidade dos vasos sanguíneos funcionais (número de vasos sanguíneos perfundidos por Dioc-7/cm<sup>2</sup> de área tumoral). A barra mostra a média ± erro padrão da média de 4-12 fragmentos tumorais analisados em cada grupo. Teste estatístico One-Way ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

O tratamento crônico com os antagonistas de BKR1 não alterou a densidade vascular total dos tumores nem a densidade dos vasos ditos funcionais, após 2, 6 ou 24hs do tratamento com os antagonistas (figura 35).

## 5 DISCUSSÃO

Um expressivo conjunto de evidências demonstra a importância da composição do microambiente tumoral no estabelecimento e desenvolvimento de cânceres. A compreensão da interação entre as células tumorais, transformadas geneticamente, e as células do hospedeiro que infiltram o tumor, como células inflamatórias e endoteliais, constituem um importante passo para um melhor entendimento dos mecanismos da doença e por consequência o desenvolvimento de terapias anticâncer mais efetivas. Nesse contexto, as células inflamatórias do microambiente tumoral parecem ter um papel bastante relevante. Embora essas células, tais como macrófagos, granulócitos e neutrófilos, possam atuar suprimindo o desenvolvimento tumoral, sugere-se que o seu papel preponderante seja na promoção do crescimento tumoral por meio de vários mecanismos, dentre eles a liberação de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e cininas (BISACCHI et al., 2003; POLLARD, 2004).

Diversos relatos na literatura têm indicado que as cininas e seus receptores estão envolvidos na progressão de vários tipos de cânceres (CALIXTO et al., 2004; LEEB-LUNDBERG et al., 2005; STEWART et al., 2005). O potencial das cininas de estimular a proliferação de certos tipos celulares, aumentar a permeabilidade vascular, estimular a angiogênese e induzir inflamação, leva instintivamente a proposição de que elas podem contribuir para o comportamento biológico de tumores. De fato, os receptores de bradicinina subtipos 1 (BKR1) e 2 (BKR2) têm sido implicados na progressão de cânceres como o carcinoma de próstata, o

carcinoma pulmonar, o carcinoma renal e o carcinoma mamário (WU et al., 2002; LEEB-LUNDBERG et al., 2005; STEWART et al., 2005; MOLINA et al., 2009).

Resultados prévios do nosso grupo mostraram um atraso substancial no estabelecimento do melanoma murino linhagem TM5, co-injetadas com células TM5 apoptóticas, em camundongos nocautes para BKR1. Nesse estudo a reação inflamatória desencadeada no local de implantação tumoral contribuiu para o estabelecimento do melanoma e a intensidade dessa resposta inflamatória foi diminuída em animais nocautes para BKR1, sugerindo que a sinalização resultante da ativação do BKR1 possa ser importante durante o tratamento de pacientes com quimioterápicos, onde também há presença de células apoptóticas (CORREA et al., 2005).

A fim de analisar o papel das vias dependentes de BKR1 na progressão do melanoma murino B16-F10, uma linhagem de melanoma metastático, avaliamos o desenvolvimento desses tumores em camundongos nocautes para o gene BKR1. Nossos resultados demonstraram um atraso significativo no surgimento e crescimento tumoral nos animais nocautes para BKR1. O atraso observado no desenvolvimento tumoral nesses animais foi menos expressivo que o encontrado por Correa e colaboradores (2005) utilizando a linhagem TM5. Porém, esses experimentos não podem ser comparados diretamente, não apenas por que a linhagem B16-F10 é considerada mais agressiva que a TM5, mas também por que no experimento de Correa foram inoculadas células apoptóticas em associação as células TM5 viáveis. Dessa forma, demonstramos a relevância da via de sinalização de BKR1 na progressão do melanoma.

O efeito do tratamento com DTIC foi avaliado em camundongos do tipo selvagem e nocautes para BKRI com melanoma B16-F10. O objetivo foi verificar se a ausência de BKRI nas células do hospedeiro no microambiente tumoral poderia interferir na resposta ao tratamento com DTIC, de maneira que o processo inflamatório, tanto resultante do desenvolvimento do tumor quanto da própria ação do quimioterápico, fosse menos intenso, resultando na inibição do crescimento tumoral. O tratamento com DTIC não alterou a dinâmica de aparecimento e crescimento dos tumores, entretanto reduziu significativamente a sobrevida dos animais nocautes para BKRI, mas não dos animais selvagens. Esses resultados sugerem um possível efeito tóxico do quimioterápico nos animais nocautes, já que a redução da sobrevida não foi acompanhada por um substancial aumento da massa tumoral nesses animais, comparado aos do tipo selvagem. Apesar da toxicidade de DTIC na ausência de tumor não ter sido avaliada nesses camundongos, de fato, os camundongos nocautes para BKRI apresentam diversas alterações fisiológicas que podem estar envolvidas em uma maior sensibilidade sistêmica a esse quimioterápico. Dentre estas alterações, a desregulação da homeostase cardiovascular pode ser de maior relevância, tendo em vista que diversos quimioterápicos apresentam efeitos cardiotóxicos (PESQUERO et al, 2000; YEH e BICKFORD, 2009).

Tendo sido estabelecida a participação de BKRI na progressão do melanoma B16-F10, a utilização de antagonistas desse receptor surge como uma alternativa terapêutica e/ou exploratória. Têm sido descrito que antagonistas de receptores de bradicinina podem agir diretamente na célula tumoral levando-a à apoptose, bem como inibir a angiogênese, a inflamação e a ação de metaloproteases em tumores (MORBIDELLI et al., 1998; STEWART et al., 2002). Antagonistas de BKRI são

particularmente atrativos, já que esse receptor não é constitutivamente expresso, mas induzido em situações específicas como injúria tecidual e inflamação (UENO e OHISHI, 2003; BLAUKAT, 2003). Além disso, foi demonstrado que esses compostos apresentam baixa toxicidade, diferentemente da maioria dos quimioterápicos (STEWART et al., 2002).

Estudos recentes do nosso laboratório mostraram que a utilização do antagonista de BKRI R-715 resultou em um retardo no aparecimento do tumor (melanoma B16-F10) e crescimento mais lento quando implantados na pata de camundongos C57Bl/6. Neste trabalho utilizamos o antagonista de BKR1 R-954, que foi desenvolvido a partir de modificações químicas no antagonista peptídico de segunda geração R-715 de maneira a torná-lo mais resistente à ação de proteases, obtendo-se assim uma molécula com maior meia-vida no soro (NEUGEBAUER et al., 2002).

No nosso modelo, o tratamento com o antagonista R-954 não foi capaz de alterar a cinética de crescimento tumoral. E a análise quantitativa do microambiente tumoral após 10 e 13 dias de implantação das células B16-F10 e tratamento diário com R-954 não mostrou diferenças em relação à área necrótica, área hemorrágica e área vascular/número de estruturas vasculares em função do tratamento com R-954.

Em outros modelos o antagonista R-954 tem-se mostrado eficiente mesmo com a administração de doses menores por via intraperitoneal (i.p), intravenosa (i.v) ou subcutânea. Em modelo de diabetes tipo 1 induzida por estreptozotocina tem sido relatada a utilização de doses entre 50µg e 1,6mg/Kg i.p de R-954 (GABRA e SIROIS, 2002; GABRA e SIROIS, 2003a; GABRA e SIROIS, 2003b) e 300µg/kg intravenoso (SIMARD et al., 2002) em camundongos e de 2mg/kg subcutâneo em

ratos (LAWSON et al., 2005a; LAWSON et al., 2005b). Em modelos de inflamação pulmonar tem sido utilizada a dose de 100µg/kg tanto i.p quanto i.v (ERIC et al., 2003; GAMA LANDGRAF et al., 2003). E em modelos de injúria isquêmica renal e diabetes autoimune espontânea tem sido utilizada a dose de 200µg/kg i.p (GABRA e SIROIS, 2005; WANG et al., 2008).

A dose de 1mg/Kg de camundongo e a via subcutânea de administração foram determinadas com base em estudos farmacocinéticos e pré-clínicos realizados pelo Dr. Pierre Sirois (comunicação pessoal). Em modelo de camundongo atímico com tumor de próstata a dose de 1mg/Kg s.c de R-954 foi capaz de controlar o crescimento tumoral, inclusive parte desses resultados foram a base para o depósito da patente sobre a utilização de antagonistas B1 para o controle da dor neuropática associada a tumores e controle de crescimento de tumores. No entanto, esses modelos apresentam diferenças importantes quanto à expressão de BKRI1, que serão discutidas adiante. Desta maneira, uma crítica importante a esse trabalho é a falta de um estudo de dose-resposta nas condições experimentais testadas aqui.

Estudos revelaram que em ratos Wistar a utilização de uma dose de 25mg/Kg resultou em uma meia-vida de 16hs desses compostos no soro, o que poderia estar comprometendo a nossa avaliação, dado que utilizamos uma única dose a cada 24hs. Dessa maneira, avaliamos a utilização de mini-bombas osmóticas implantadas subcutâneamente para a liberação contínua do antagonista R-954 (anexo 3). Entretanto, não foi observada diferença significativa no crescimento tumoral de camundongos comparando-se a administração contínua de R-954 (bombas osmóticas) e a administração intermitente (injeções diárias). Sugerindo que a

ausência de retardo no crescimento tumoral em resposta ao tratamento com R-954 provavelmente não se correlaciona com a meia-vida desse composto no soro.

A utilização do antagonista de BKR1 desArg<sup>10</sup>-Hoe140 (1mg/Kg/dia) também não foi capaz de suprimir o crescimento tumoral em camundongos com sarcoma S-180. Em contraposição, o antagonista de BKR2 Hoe140 inibiu o crescimento tumoral, a angiogênese e a permeabilidade vascular nesse modelo (ISHIHARA et al., 2001; ISHIHARA et al., 2002). Entretanto, no nosso modelo suportamos a importância do BKR1 no desenvolvimento do melanoma em função dos resultados obtidos com os camundongos nocautes para BKR1. Apesar de não descartarmos a participação do BKR2, já que esta não foi avaliada.

Stewart e colaboradores têm demonstrado a inibição do crescimento tumoral, da angiogênese e da ação de metaloproteases em modelos de tumores de próstata PC-3 e pulmão (*small-cell lung cancer* – SCLC) através da administração de antagonistas de bradicinina, como o B-9870. Entretanto, esse inibidor não é específico do BKR1 ou BKR2, ele estimula a apoptose das células tumorais através de um mecanismo novo conhecido como “*biased agonist*”, pelo qual inibe a via G<sub>αq11</sub> e estimula a via G<sub>α12,13</sub>, vias que desencadeiam os efeitos de BKR1 e BKR2. Essa ação desbalanceada estimula a atividade da caspase-3 que leva as células à morte (STEWART et al., 2002). Os cânceres de próstata e SCLC têm origem neuroendócrina e expressam receptores para uma diversidade de neuropeptídeos. As cininas são fatores de crescimento para esses tumores, que expressam ambos os receptores de bradicinina em sua superfície (STEWART et al., 2003; STEWART et al., 2005). Devido essas características esse modelo se diferencia bastante do que nós estudamos nesse trabalho, pois a linhagem de melanoma murino B16-F10 não

expressa o BKR1 quando em condições padrão de cultivo *in vitro*, e mesmo quando implantadas em camundongos do tipo selvagem nós não fomos capazes de detectar células B16-F10 expressando BKR1 (dados prévios ainda não publicados), entretanto, este resultado pode variar quanto às condições de cultura das células tumorais e mesmo em diferentes fases do crescimento do tumor. Ainda nesse contexto, o agonista de BKR1 des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina não induziu proliferação ou morte das células B16-F10 *in vitro* após 24 e 48 horas de tratamento (anexo 1). E o índice mitótico *in vivo* das células B16-F10 implantadas em camundongos tratados com R-954 também não se alterou (anexo 2). Estes dados sugerem, portanto, que o antagonista R-954 não exerce efeito direto nas células B16-F10, pela ausência de BKR1 nessas células. Dessa maneira, caracteriza-se que buscamos avaliar a influência da via de BKR1 evocada pelas células do hospedeiro que infiltram o tumor, como células endoteliais e células inflamatórias e que influenciam na progressão do tumor. Nesse contexto, Stewart e colaboradores descreveram também antagonistas, como B-10238, que não apresentaram potencial citotóxico contra as células tumorais *in vitro*, mas foram capazes de prevenir o crescimento tumoral em camundongos. Sugerindo que esses antagonistas atuem inibindo a angiogênese e/ou inflamação (STEWART et al., 1999). Entretanto, o potencial desses antagonistas não tem sido explorado.

Além de poder atuar inibindo a angiogênese e a inflamação, os antagonistas de BKR1 e BKR2 também são conhecidos por inibir a permeabilidade vascular em alguns modelos, o que poderia acarretar em alterações no crescimento tumoral, devido o ineficiente aporte de nutrientes, oxigênio e fatores de crescimento.

No nosso modelo, o tratamento crônico com o antagonista R-954 em camundongos com implante tumoral não alterou a permeabilidade vascular intratumoral, como avaliado pelo ensaio de permeabilidade vascular de albumina com o corante azul de Evans. Resultado semelhante foi encontrado por Ishihara e colaboradores que demonstraram que o antagonista de BKR1, desArg10-Hoe140, não causou alteração na permeabilidade vascular em sarcomas, mas o antagonista do BKR2, FR173657, reduziu significativamente a permeabilidade vascular (ISHIHARA et al., 2002). É possível, portanto que também no nosso modelo a permeabilidade vascular intratumoral seja controlada principalmente pelo BKR2 e/ou por outros mediadores. Entretanto, é importante notar que a análise foi feita após 12 dias de desenvolvimento tumoral sob tratamento com R954, portanto não se pode afirmar sobre o efeito agudo de R-954, nem na fase avascular do tumor, no início do desenvolvimento tumoral, quando a permeabilidade vascular parece ser um fenômeno extremamente importante.

Em modelo de diabetes tipo 1 induzida por estreptozotocina a administração aguda de R-954 foi capaz de inibir o aumento da permeabilidade vascular em vários órgãos (SIMARD et al., 2002; LAWSON et al., 2005a; LAWSON et al., 2005b). Em modelo de glioma em ratos foi observado aumento da permeabilidade da barreira hemato-tumoral pelos agonistas de BKRI, Sar-[D-Phe8]des-Arg9BK (CARDOSO et al., 2004) e Cereport (EMERICH et al., 2001), levando a um aumento do *delivery* de agentes quimioterápicos.

Resultados prévios do nosso grupo mostraram que o tratamento diário de camundongos com implante de melanoma B16-F10 com o antagonista do BKR1 R-715 i.p aumentou a permeabilidade vascular intratumoral medida pelo

extravasamento do corante azul de Evans no 12º dia de implantação tumoral, consistente com o aumento detectado da expressão de VEGF (ANDRADE et al.,2007).

As disparidades observadas entre os resultados obtidos como os antagonistas R-715 e R-954 no nosso modelo, onde o primeiro aumentou a permeabilidade vascular intratumoral e o segundo não, são extremamente complexas de analisar, dado que o antagonista R-954 apresenta maior meia vida no soro. Entretanto, pode se tratar justamente de uma dinâmica temporal de eventos, onde na avaliação da permeabilidade vascular após 2hs da última injeção de R-715 observou-se esse aumento de permeabilidade, porém no mesmo periodo de tempo (2hs) podemos já estar observando uma normalização da permeabilidade vascular, pós aumento, com o antagonista R-954.

Experimentos que avaliam a permeabilidade vascular podem servir como uma medida indireta da pressão intersticial. Skliarenko e colaboradores (2006) detectaram flutuações na pressão intersticial de fluídos (*Interstitial Fluid Pressure - IFP*) em tumores injetados na perna de camundongos medida após o tratamento com o agente desorganizador vascular (*Vascular disrupting agent*) ZD6126 ao longo do tempo (1, 3, 24, 48 e 72 horas), onde houve uma redução da IFP após 1 hora de tratamento seguido de uma recuperação para próximo dos níveis pré-tratamento após 3 horas e um segundo declínio mais tardio. Sugere-se que essas flutuações reflitam diferenças no balanço de fatores fisiológicos que juntos determinam a magnitude da IFP em tumores individuais. Dessa forma, R-954 pode estar alterando esses parâmetros em momentos que não foram medidos

Avaliamos em seguida se os antagonistas R-715 e R-954 seriam capazes de modificar a distribuição/penetração de drogas no microambiente tumoral. A permeabilidade vascular aumentada em função do tratamento com R-715 poderia melhorar a penetração de agentes quimioterápicos no tumor. De fato, as barreiras fisiológicas do microambiente tumoral, caracterizadas pela malformação da vasculatura, que é responsável em parte pelas regiões hipóxicas, acidófilas e aumento da pressão intersticial de fluidos (CAIRNS et al., 2006) são uma das razões pela qual ocorre baixa penetração das drogas no microambiente tumoral, permitindo a rápida repopulação do tumor e por consequência falha no tratamento (TRÉDAN et al., 2007). Portanto, a resposta tumoral aos quimioterápicos depende não apenas da sensibilidade intrínseca dessas células, mas também da quantidade de droga que as alcança (PRIMEAU et al., 2005).

Alguns trabalhos demonstram a baixa penetração de quimioterápicos que se ligam ao DNA, tais como a doxorrubicina e a dacarbazina (utilizada nesse trabalho), devido provavelmente ao rápido consumo dessas drogas pelas células perivasculares (LANKELMA et al., 1999, TUNGGAL et al., 1999 e PRIMEAU et al., 2005).

A droga fluorescente doxorrubicina foi utilizada para avaliar a penetração/distribuição de droga no microambiente do melanoma B16-F10 em resposta aos tratamentos agudo e crônico com os antagonistas de BKRI R-954 e R-715.

A metodologia utilizada calcula a partir de imagens bidimensionais dos tumores a distância dos vasos sanguíneos tumorais marcados com anti-CD31/FITC à droga fluorescente. Como já mostrado pelo grupo do Dr. Tannock (PRIMEAU et al., 2005), observamos também um gradiente de doxorrubicina a partir dos vasos

sanguíneos. A análise bidimensional das imagens de um tumor que é tridimensional é uma limitação dessa técnica, especialmente em regiões mais distantes dos vasos sanguíneos. Para minimizar essa limitação e para reduzir a influência do “barulho” da fluorescência não-específica utilizamos os dados de distâncias até 100 $\mu$ m dos vasos sanguíneos.

O tratamento agudo (dose única 2hs antes da avaliação da distribuição de doxorubicina) com R-954 (3mg/Kg s.c) não alterou significativamente o padrão de distribuição de doxorubicina, entretanto os tumores tratados com o antagonista R-715 (0,5mg/kg i.p) apresentaram menor penetração de doxorubicina. O tratamento crônico (diário) com os antagonistas R-715 e R-954, avaliados após 2hs da última dose, resultou em menor taxa de perfusão de doxorubicina com ambos os tratamentos, comparado ao controle. Além disso, a densidade vascular tumoral analisada nesse experimento mostrou que não ocorreram alterações no número de vasos sanguíneos, funcionais ou totais, em decorrência do tratamento crônico com esses antagonistas.

Avaliamos também a penetração de doxorubicina em resposta ao tratamento crônico com os antagonistas em diferentes tempos após a última dose; 2hs (como avaliado anteriormente), 6hs e 24hs depois. A intensidade de doxorubicina diminuiu após 2hs de tratamento com ambos os antagonistas, aumentou após 6hs (superando o controle no caso do R-715) e voltou a reduzir após 24hs. Indicando uma janela de ação do antagonista R-715 após 6hs de tratamento. O tratamento crônico com os antagonistas de BKR1 não alterou a densidade vascular total dos tumores nem a densidade dos vasos ditos funcionais, após 2hs, 6hs ou 24hs da última dose de antagonistas.

Já em tumores EMT6 (sarcoma mamário murino) após 2 horas de tratamento com os antagonistas foi possível observar um aumento da perfusão de doxorubicina no microambiente tumoral.

Observamos, portanto, efeitos opostos nesses dois tumores quanto a perfusão de doxorubicina em resposta a ação dos antagonistas R-715 e R-954. Essa diferença não está relacionada à quantidade de vasos sanguíneos, dado que apenas 2 horas de ação não são suficientes para alterar esse parâmetro. Será necessária uma investigação mais profunda. Diferenças na composição do microambiente tumoral entre esses dois tumores, em especial a presença e quantidade de células BKR1 positivas tumorais e/ou do hospedeiro provavelmente serão determinantes. Sabemos que as células B16-F10 não expressam BKR1, entretanto isso não foi determinado quanto ao tumor EMT6. Diversas características intrínsecas dos tumores, como tipo e abundância da vasculatura sanguínea e linfática, densidade celular (ou empacotamento) e composição da matriz extracelular, que pode sequestrar mais ou menos as drogas, são fatores que influenciam a distribuição de drogas no microambiente do tumor (DI PAOLO e BOCCI, 2007)

Apesar de não termos observado inibição do crescimento tumoral em resposta ao tratamento com R-954 quando administrado sozinho, buscamos avaliar um possível efeito no microambiente tumoral quando este foi administrado em associação ao quimioterápico dacarbazina. Tendo em vista que existem diversos relatos na literatura de agentes que não apresentaram ou apresentaram pouca atividade quando administrados sozinhos, mas que em associação a agentes quimioterápicos aumentaram sua eficácia, como interferon, interleucina-2, tamoxifen e outros (YANG e CHAPMAN, 2009).

No entanto, o principal motivo advém dos achados de Correa e colaboradores (2005) que demonstraram que a presença de células tumorais apoptóticas juntamente com células tumorais viáveis resultou em um crescimento tumoral vigoroso em camundongos do tipo selvagem, porém em camundongos nocautes para BKR1 ocorreu uma inibição desse crescimento. Além disso, a presença das células apoptóticas correlacionou-se com um infiltrado leucocitário transiente, composto principalmente por neutrófilos e macrófagos. Sugere-se que a apoptose das células tumorais causada por quimioterápicos como DTIC resultaria no recrutamento de leucócitos expressando BKR1 que infiltrariam o tumor e promoveriam a sua retomada de crescimento entre os ciclos de quimioterapia. Nesse sentido um antagonista de BKR1 poderia impedir esse fenômeno.

Utilizamos o antagonista R-954 em um protocolo preventivo onde o tratamento foi iniciado 1 dia antes do implante das células tumorais e seguiu-se diariamente até o fim do experimento e o quimioterápico DTIC foi administrado a cada 3 dias após o implante tumoral. Buscamos com esse protocolo preventivo avaliar o equivalente à adjuvância em quimioterapia em pacientes. O tumor primário é geralmente removido cirurgicamente com sucesso, no entanto são as metástases as grandes responsáveis pela alta letalidade do melanoma. Sabe-se que após a intervenção cirúrgica uma grande quantidade de células tumorais é liberada na corrente sanguínea podendo dar origem a doença metastática ou algumas dessas células podem permanecer no local do tumor primário e dar origem a recidivas locais. Portanto, esse é o contexto que acreditamos que o antagonista R-954 pode ser útil numa futura aplicação terapêutica, isto é, ser administrado em adjuvância à

quimioterapia pós remoção cirúrgica, no sentido de evitar recidivas locais e metástases.

Protocolos terapêuticos têm sido mais amplamente testados que os protocolos preventivos, entretanto nos casos de modelos experimentais de metástases estes protocolos têm sido bastante explorados, como em modelos de metástases ósseas de câncer de mama (PLUIJM et al., 2005; DAUBINÉ et al., 2007) e metástases pulmonares de osteosarcoma (PRADELLI et al., 2009). Apesar do modelo adotado nesse estudo não ser um modelo clássico de metástase, optamos por utilizá-lo por possibilitar a obtenção de resultados com mais rapidez. Além disso, modelos animais de metástase que recapitem todas as etapas da cascata metastática, e se assemelhem à realidade clínica, são raros. Podemos citar o modelo no qual células de câncer de mama 4T1 implantadas na glândula mamária de camundongos imunocompetente espontaneamente metastatizam para ossos, pulmões e fígado (HIRAGA et al., 2004) e o modelo recentemente publicado de metástase espontânea de melanoma humano para o sistema nervoso central (CRUZ-MUNOZ et al., 2008).

De fato, o tratamento com o antagonista R-954 concomitante com o quimioterápico dacarbazina aumentou significativamente a sobrevivência dos camundongos com implante de melanoma, quando comparado ao controle e também quando comparado aos animais tratados somente com o antagonista R-954, apesar de não ter inibido o crescimento tumoral.

A redução da dor poderia ser um mecanismo envolvido nesse aumento de sobrevivência dos animais, uma vez que BKR1 é um receptor que atua no controle da sensação de dor aguda e crônica. O tratamento com antagonistas de BKR1 foi capaz de reduzir a dor aguda induzida por formalina, glutamato e capsaicina e também a

dor crônica induzida pelo adjuvante completo de Freund em modelos animais (CALIXTO et al., 2004). Além disso, o tratamento sistêmico de camundongos com os antagonistas R-715 e R-954 bloqueou a hiperalgesia resultante da diabetes induzida por estreptozotocina (GABRA e SIROIS, 2003 a,b). Apesar desse possível efeito analgésico não ter sido avaliado diretamente no nosso modelo, nenhum gene envolvido em mecanismos de sensação de dor foi identificado como diferencialmente expresso.

Não há nenhum relato na literatura de combinação de antagonista seletivo de BKR1 com quimioterápicos. O antagonista peptídico de bradicinina B-9870 (CU201) quando combinado com quimioterápicos como; doxorubicina, etoposídeo, cisplatina, vinorelbina e paclitaxel produziu efeito aditivo na inibição do crescimento de câncer de pulmão de pequenas células (CHAN et al., 2002). Entretanto, foi demonstrado que esse antagonista atua por um mecanismo chamado “*biased agonist*”, isto é, apresenta ações antagonistas e parcialmente agonistas tanto de BKR1 quanto de BKR2 (MORISSETTE et al., 2007).

Por outro lado, muitos regimes combinados testados em pacientes com melanoma têm associado DTIC com agentes imunológicos (como interleucina-2, interferon), hormônios (como tamoxifen) ou novos agentes biológicos (como sorafenib, oligonucleotídeo antisenso bcl-2, anticorpos anti- $\alpha v \beta 3$ , anti-CTLA-4) (PHILIP e FLAHERTY, 2000; MINOR ET AL., 2005; GOGAS et al., 2006; FLAHERTY, 2006; YANG e CHAPMAN, 2009). Por exemplo, em um estudo randomizado, 101 pacientes com melanoma foram tratados com DTIC combinado à Sorafenib, um inibidor tirosino-kinase que tem atividade contra VEGFR e BRAF, e observou-se uma taxa de resposta 2 vezes maior, uma mediana de sobrevida livre de

doença também 2 vezes maior e 50% de aumento na sobrevida livre de progressão (MCDERMOTT et al., 2008). Segundo Yang e Chapman (2009), regimes quimioterápicos combinados podem induzir melhores respostas em pacientes que DTIC sozinho, entretanto estudos maiores, com pelo menos 400 pacientes, seriam necessários para detectar benefícios relacionados à sobrevida global. Além disso, muitos desses tratamentos combinados têm sido associados à maior toxicidade (PHILIP e FLAHERTY, 2000), fato que não foi observado na combinação de R-954 e DTIC.

Foram realizados experimentos de microarranjos de oligonucleotídeos, a fim de obter sugestões sobre os mecanismos responsáveis pelo fenômeno de aumento da sobrevida dos camundongos com melanoma no tratamento combinado DTIC + R-954 e determinar alguns genes envolvidos nos mecanismos de falha terapêutica relacionada ao quimioterápico DTIC e sua parcial reversão com a adição do antagonista R-954.

Diversos microarranjos de DNA já foram realizados com células e tecidos de melanoma, com diferentes objetivos, como a identificação de novos marcadores tumorais, de candidados à imunoterapia ou terapia anti-angiogênica (KIM et al., 2002; EHLERS e HARBOUR, 2005) proposição de novas classificações tumorais (ALIZADEH et al, 2005); análise de mudanças na expressão gênica causadas por drogas como o sulfato de dextran (droga anti-metastática) (TAKAGI et al., 2005) e a Campotecina (MORANDI et al., 2006); além de possibilitar uma melhor compreensão das vias de sinalização envolvidas na progressão dos vários tipos de melanoma (SUNG e SIMON, 2004; NAMBIAR et al., 2005; BODZIOCH et al., 2005).

Escolhemos a utilização dos chips da Affymetrix pela baixa taxa de resultados não confiáveis ou ruins, cerca de 5-10% comparado a 30% nos chips de cDNA (REIMERS, 2005) e também pela praticidade e rapidez dos experimentos. Utilizamos apenas 3 microarranjos por grupo experimental, já que a literatura indica que em casos de estudos exploratórios com o objetivo de encontrar grandes diferenças entre as condições testadas esse número é geralmente adequado (REIMERS, 2005). Além disso, os genes diferencialmente expressos de interesse foram ou serão validados por PCR em tempo real.

A análise dos dados obtidos a partir das hibridizações demonstrou a qualidade dos mesmos através da avaliação dos controles de qualidade internos do chip da Affymetrix e da matriz de correlação de Pearson, dentre outras ferramentas, possibilitando a seleção dos genes diferencialmente expressos entre as condições testadas. Por meio da matriz de correlação de Pearson foi possível observar que as intensidades de fluorescências são extremamente parecidas entre os chips, sugerindo, portanto, um padrão de expressão gênica semelhante. Não esperávamos diferenças extremas entre os grupos, pois todos os camundongos foram implantados com o mesmo tipo de célula (B16-F10) na mesma quantidade e submetidos a exatamente o mesmo procedimento, exceto o tipo de tratamento, portanto, esse tipo de experimento gera resultados bem diferentes daqueles que comparam tumores com suas contrapartes normais (não transformadas geneticamente), por exemplo.

Existem diversas estratégias para a normalização dos resultados de microarranjo das plataformas da Affymetrix, como MAS5 (MicroArray Suite v.5), dChip (LI e HUNG WONG, 2001), RMA e GC-RMA, entretanto a literatura apresenta que os dados normalizados pelo método RMA mostram uma distribuição

de densidade mais simétrica (DO e CHOI, 2006), sendo a estratégia mais indicada (REIMERS, 2005) e portanto a utilizada por nós. Entretanto, a normalização pelo método RMA torna a avaliação dos controles de qualidade difícil, portanto para esse fim utilizamos o método MAS5.

Para a identificação dos genes diferencialmente expressos (DEGs) os grupos experimentais foram comparados 2 a 2, bem como a normalização, e foram utilizados 2 métodos estatísticos distintos, o teste bayesiano Limma (WETTENHALL e SMYTH, 2004) e teste  $t$ , e considerados apenas os DEGs encontrados em comum nos dois testes para maior credibilidade nos dados. Vale ressaltar, no entanto, que o nível de concordância entre os resultados obtidos a partir dos 2 métodos foi bastante elevado. Optamos por realizar o teste Limma em adição ao teste  $t$ , utilizado rotineiramente, devido o pequeno número de arranjos hibridizados por grupo experimental, 3. Dados da literatura mostram que nesses casos o teste Limma, quando comparado a outros testes estatísticos, apresentou melhor desempenho com menor taxa de falsos positivos (NADON e SHOEMAKER, 2002; MURIE et al., 2009).

Foram identificados 188 DEGs com os algoritmos Limma e Teste  $t$  (simultaneamente) que apresentaram valor de  $p < 0,05$ , desse total, 87 apresentaram um *fold change*  $\geq 1,5$ , considerando-se todas as possíveis comparações entre os 4 grupos experimentais (Controle x DTIC; Controle x R954; Controle x R+D; DTIC x R+D; R954 x R+D).

Dentre os DEGs selecionados, diversos deles apresentam funções e participam de processos importantes no desenvolvimento tumoral e na resistência/falha dos tratamentos quimioterápicos, como os genes envolvidos no

funcionamento do sistema imune, no processo de angiogênese, nos processos de invasão e metástase, nos mecanismos de ação de drogas, proliferação, morte e adesão celular. Alguns desses DEGs foram destacados na tabela 9. Algumas das funções a que estas proteínas estão envolvidas são apresentadas abaixo:

- Metaloprotease de matriz 13 (MMP-13) é uma enzima proteolítica importante nos processos de invasão e metástase (LEEMAN et al., 2002).
- CD24a é uma molécula de superfície celular do tipo mucina, envolvida no “Rolling” de células tumorais. Tem sido envolvida no crescimento e migração de gliomas (SENNER et al., 1999, FRIEDERICHS et al, 2000).
- Acetilhidrolases do fator ativador plaquetário (PAF) são as principais enzimas inativadoras de PAF. PAF é um mediador lipídico pró-inflamatório e angiogênico. A inativação de PAF afeta a vascularização e inibi o crescimento tumoral (ARAI, 2002; BULGER et al., 2003; DOUBLIER et al, 2007).
- O fator de crescimento do tecido conjuntivo (*Conective tissue grow factor - Ctgf*) é uma proteína da matriz extracelular que funciona como bioestoque de fatores angiogênicos como o VEGF. Ctgf modula adesão, migração, proliferação, quimiotaxia, apoptose, deposição de matriz e angiogênese (De WINTER et al., 2008) .
- Neuropilinas-2 são glicoproteínas de membrana que interagem com semaforinas de classe 3 e com VEGF, participando da regulação da angiogênese. O bloqueio de Nrp2 reduziu o número de metástases linfáticas (CAUNT et al., 2008).

- Quimiocinas CXCL-3 e CXCL-7 e o receptor de CXCL-7. CXCL3 (Gro- $\beta$ , GRO2, MIP-2 $\alpha$ ) controla a migração e adesão de monócitos. Ambas medeiam seus efeitos nas células-alvo por interagir com o receptor CXCR2 (receptor de IL-8) presente em neutrófilos (STRIETER et al, 2006; RAMAN et al., 2007). Quimiocinas CXC também são importantes reguladores da angiogênese e do recrutamento de linfócitos. Quimiocinas como Gro- $\gamma$  e Gro- $\beta$  e CXCL-7 (*pro-platelet basic protein - PPBP*) podem induzir quimiotaxia de neutrófilos e migração e proliferação de células endoteliais. A perda de CXCL2 inibiu o crescimento tumoral e a angiogênese em um modelo murino de câncer de pulmão (VICARI e CAUX, 2002).
- Serpine1 é um inibidor de serino-protease também conhecido como PAI-1, que inibi o complexo do ativador de plasminogênio (urokinase plasminogen activator -uPA). PAI-1 pode modular a adesão, migração e apoptose celular e tem papel crítico nos processos de invasão e metástase (BAJOU et al., 1998; PALMIERI et al., 2002; LADER et al., 2004);
- O receptor 56 acoplado a proteína G (G protein-coupled receptor 56 -Gpr56) é regulado negativamente em melanoma metastático, em parte devido à inibição do crescimento tumoral (HUANG et al., 2008). Gpcr56 foi encontrado interagindo com transglutaminase-2, que tem papel na supressão tumoral (XU e HYNES, 2007).
- Conector para a ativação de células T (linker for activation of T cells) é uma proteína de membrana que se torna fosforilada em resíduos conservados de tirosina envolvidos no complexo TCR-CD3 da superfície de linfócitos T, permitindo a ativação de diversas vias intracelulares (AGUADO et al., 2006).

- A enzima timidilato sintase (TS) é essencial na síntese de 2-deoxitimidina-5-monofosfato, um precursor da síntese de DNA. Alvo da droga 5-fluoruracil (análogo de pirimidina - inibidor de TS) (RUSTUM, 2004, DANEMBERG, 2004).
- A enzima Guanosine monofosfato redutase 2 converte GMP (guanosina monofosfato) em IMP (inosina monofosfato) na síntese de purinas.
- Quimerina 1 participa da sinalização do receptor de célula T (CALOCA, et al., 2007).
- Colony stimulating factor 2 receptor, beta – O fator estimulador de colônia-granulócito macrófago (GM-CSF), citocina que funciona como fator de crescimento para leucócitos. É secretado por leucócitos, células endoteliais e fibroblastos. GM-CSF estimula as células troncas a produzirem granulócitos e monócitos.
- A molécula de adesão juncional 2 (JAM2) tem sido relatada no endotélio de arteríolas em tumores e em sítio de inflamação (LIANG et al., 2002).
- A caderina 13 tem sido associada à angiogênese e progressão tumoral (KIM et al., 2005).
- Trangelina é uma proteína de ligação a actina, presente em vasos sanguíneos e fibroblastos. Evidências recentes sugerem que transgelina atua como supressor de MMP9, inibindo a angiogênese, invasão e metástase (HUANG et al., 2008).
- LIM e SH3 Protein 1 (LASP-1) foi identificada em biblioteca de linfonodos axilares metastáticos. Foi encontrada superexpressa em carcinomas de ovário e de mama (GRUNEWALD et al., 2007, GRUNEWALD et al., 2008) .

Nosso grupo está interessado de maneira especial em alterações no microambiente tumoral relevantes nos fenômenos envolvidos na falha de tratamentos e resistência a drogas e angiogênese, com ênfase na participação das células do hospedeiro nesses processos e na progressão tumoral. É importante salientar que o tumor é formado, não apenas por células transformadas geneticamente (no nosso modelo experimental as células B16-F10 de melanoma murino), mas também por células do hospedeiro que são recrutadas para dentro do tumor e passam a compor o seu microambiente, como células endoteliais, formando a rede vascular, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e fibroblastos dentre outros. Apesar de essas células representarem apenas uma pequena fração da massa tumoral, elas podem influenciar de forma importante a progressão do tumor.

Oito genes identificados no microarranjo como diferencialmente expressos foram avaliados pela metodologia de RT-PCR em tempo real. O gene da  $\beta$ -actina foi utilizado nesse estudo como normalizador dos valores de expressão diferencial. Em adição, está sendo realizada análise com o gene RPLPO (*large ribosomal protein*) como normalizador (não apresentada nessa tese).

A expressão relativa dos genes Ctgf, neuropilina-2, serglicina, HSP1b, Serpine1 e transglutaminase-2, determinadas por PCR em tempo real, confirmou algumas das relações de hiper ou hipoexpressão desses genes entre determinados grupos de tratamento resultantes da análise do microarranjo. De maneira geral, foram observados valores de *fold change* mais elevados nas análises de RT-PCR em tempo real, provavelmente devido à maior sensibilidade dessa técnica comparada a de microarranjos de DNA. Além disso, na avaliação por RT-PCR em tempo real o

número de tumores avaliados aumentou para 6 ou 7 em cada grupo experimental quando comparado à 3 no microarranjo, aumentando significativamente a confiança dos resultados e influenciando nos valores de *fold change*.

O gene neuropilina-2 apresentou-se hipoexpresso no tratamento com R-954 e R-954+DTIC comparados ao controle. Neuropilina-2 é um receptor expresso por células endoteliais que interage com semaforinas de classe 3 e com VEGF participando da regulação da angiogênese. Apesar do gene Neuropilina-2 estar hipoexpresso nesses tratamentos, não se verificou uma redução na densidade vascular, indicando que uma intrincada rede de reguladores angiogênicos deve estar atuando contrabalanceando esse efeito (no caso dessa hipoexpressão resultar também numa redução da quantidade de proteína). Neuropilina-2 também é expressa em cânceres como adenocarcinoma pancreático, pulmonar, neuroblastoma e osteosarcoma (STATON et al., 2007). Portanto, no nosso modelo R-954 pode estar inibindo a expressão de neuropilina-2 presente nos vasos tumorais e/ou no próprio tumor. Wey e colaboradores (2005) demonstraram que a inibição de neuropilina-1 por RNA de interferência aumenta a sensibilidade de células de câncer pancreático à quimioterapia. Talvez no nosso modelo R-954 esteja inibindo a expressão de neuropilina-2 sensibilizando as células de melanoma a ação do quimioterápico dacarbazina, podendo ser, portanto, um dos responsáveis pelo aumento de sobrevivência dos camundongos tratados com R-954 e dacarbazina concomitantemente. Serão necessários mais experimentos para investigar essa hipótese. Não há nenhum relato na literatura descrevendo algum tipo de interação entre BKR1 e neuropilinas, o que torna esse achado extremamente relevante.

O gene *Ctgf* apresentou-se hiperexpresso no tratamento R-954+DTIC comparado aos tratamentos simples com DTIC ou R-954 e com o controle. O fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) é uma proteína matricelular secretada cujas funções dependem de interações com outras moléculas. CTGF é pouco expresso em tecidos normais sendo hiperexpresso em certos cânceres e regeneração tecidual (CICHA et al., 2009). CTGF funciona também como bioestoque de fatores angiogênicos, como o VEGF. A sinalização de VEGF pode ser iniciada pela clivagem de CTGF por MMPs e CTGF aumenta a expressão de MMP-13 (TAN et al., 2009; HOFMEISTER et al., 2008). No nosso modelo MMP-13 também está hiperexpressa no tratamento R-954+DTIC, podendo atuar nessa via. Tem sido determinado também que CTGF confere resistência à quimioterapia em pacientes com câncer de mama (WANG et al., 2009). Portanto, a hiperexpressão de CTGF é provavelmente uma consequência não desejada do tratamento proposto aqui.

O gene *Serpine1* apresentou-se hiperexpresso no tratamento R-954+DTIC comparado ao controle e ao tratamento somente com R-954. *Serpine1* ou PAI-1 é um inibidor de serino-protease que inibi o complexo do ativador de plasminogênio e modula a degradação da matriz extracelular. Apesar de ser um inibidor de protease, PAI-1 tem papel crítico nos processos de invasão e metástase (LADER et al., 2004). Tem sido demonstrado que PAI-1 estimula a angiogênese, medeia à migração e adesão celular (BAJOU et al., 1998; PALMIERI et al., 2002). Além disso, células deficientes em PAI-1 apresentaram resistência a apoptose induzida por agentes quimioterápicos (KWAAN et al., 2000). No nosso modelo, a hiperexpressão de PAI-1 no tratamento R-954+DTIC pode estar contribuindo para a falha no controle do crescimento tumoral.

O gene serglicina apresentou-se hiperexpresso no tratamento R-954+DTIC e DTIC sozinho quando comparados ao controle. A função de serglicina não tem sido bem estudada, mas ela está envolvida na secreção e direcionamento de proteínas. Estudos recentes mostraram que serglicina tem papel no estoque de proteases e granzima B em mastócitos e na maturação de grânulos secretórios de mastócitos e linfócitos T citotóxicos (THEOCHARIS et al., 2006). Além disso, o gene serglicina foi encontrado superexpresso em linhagens celulares resistentes a quimioterápicos (BEYER-SEHLMAYER et al., 1999). Portanto, o gene serglicina é um excelente candidato para maior investigação, visto que provavelmente está implicado nos mecanismos de resistência à dacarbazina.

O gene transglutaminase-2 (TG2) apresentou-se hiperexpresso no tratamento R-954+DTIC e DTIC sozinho quando comparados ao controle e também se apresentou hiperexpresso no tratamento R-954+DTIC comparado ao tratamento somente com R-954. A enzima transglutaminase modifica proteínas pós-traducionalmente atuando em processos como adesão e migração celular, indução de apoptose, homeostase da matriz extracelular e angiogênese. Estudos sugerem que a expressão de TG2 no tumor decresce com a progressão tumoral, aumentando a desestabilização da matriz, favorecendo a angiogênese e invasão tumoral. Em contraste, em tumores metastáticos TG2 é frequentemente hiperexpressa (KOTSAKIS e GRIFFIN et al., 2007). Além disso, tem sido mostrado que TG2 é hiperexpressa em tumores quimioresistentes (VERMA e MEHTA et al., 2007), condizente com esse trabalho onde identificamos que o tratamento com dacarbazina também induziu a hiperexpressão de TG2.

O gene HSP1b (HSP70-1) apresentou-se hiperexpresso no tratamento R-954+DTIC comparado ao tratamento com DTIC no PCR em tempo real, entretanto no microarranjo encontrou-se hipoexpresso quando do tratamento com R-954 ou R-954+DTIC comparados ao controle. Serão desenhados novos iniciadores para avaliação por PCR em tempo real para confirmação dos resultados. As proteínas de choque térmico (HSPs) são chaperonas frequentemente encontradas superexpressas em diversos cânceres (SHERMAN e MULTHOFF, 2007). Como as HSP70 podem alterar muitas vias de apoptose, a sua hiperexpressão pode levar a aumento da resistência tumoral a agentes quimioterápicos (SOO et al., 2008), sendo portanto um interessante alvo a ser estudado no nosso modelo. Não tem sido descritas correlações entre receptores de bradicinina e HSPs.

A análise da expressão dos genes CD24a e Ppbp (ou Cxcl-7), apesar de manter a tendência no caso de Ppbp, também não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos pela análise de PCR em tempo real, não validando portanto os achados do microarranjo. Frequentemente observa-se discordância entre os dados de microarranjos e PCR em tempo real, mas raramente estes são discutidos na literatura. Entretanto, diversos fatores que influenciam a correlação entre os resultados de microarranjos e PCR em tempo real têm sido descritos por Morey e colaboradores (2006). A análise do PCR em tempo real e dos microarranjos apresentam várias peculiaridades que podem influenciar os resultados obtidos em cada método. No estudo de Morey a direção da mudança na expressão pelos dois métodos foi discordante em 27% das amostras, sendo que em quase 80% destas o FC foi menor que 1,4. Além disso, foi observada menor concordância entre os dois métodos entre genes hipoexpressos, comparados a hiperexpressos. Esse fato

pode ser devido aos efeitos da maior variabilidade associada com a redução na eficiência da reação encontrada nos resultados de PCR em tempo real em ciclos tardios, onde genes com baixo nível de expressão respondem (MOREY et al., 2006). Essa pode ser uma possível explicação para o caso do gene HSP1b que foi encontrado hipoexpresso nos microarranjos, porém esse resultado não foi validado por PCR em tempo real.

Os resultados obtidos no microarranjo de DNA são pontos de partida para estudar os mecanismos de resistência à dacarbazina, sua interação com a ação do antagonista R-954, bem como a ação individual de R-954 em melanoma. Outros genes extremamente interessantes como as quimiocinas CXCL-3 e CXCL-7 e o antígeno CD24a também serão avaliados futuramente, inclusive quanto a sua localização por hibridização *in situ*. Além disso, a hiper ou hipoexpressão dos genes aqui avaliados não necessariamente implicam em alterações na expressão proteica, portanto esses genes/proteínas serão também avaliados por *western blotting* e imunomarcação com anticorpos específicos.

Juntos esses resultados sugerem mecanismos pelos quais as complexas interações entre as células tumorais e células do hospedeiro, expressando BKR1, podem contribuir com a progressão tumoral e resistência aos quimioterápicos e a consequente falha dos tratamentos convencionais.

## 6 CONCLUSÃO

A via desencadeada por BKR1 desempenha papel relevante na progressão do melanoma murino B16-F10, como determinado pelos experimentos com camundongos nocautes para BKR1. Além disso, foi observado um aumento de sobrevivência de camundongos com tumor no tratamento combinado do antagonista de BKR1, R-954, com o quimioterápico dacarbazina; cujos mecanismos envolvidos nesse fenômeno ainda precisam ser melhor esclarecidos.

## 7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abdollahi A, Hlatky L, Huber P. Endostatin: The logic of antiangiogenic therapy. **Drug Resistance Updates** 2005 Feb-Apr; 8(1-2):59-74.
- Aguado E, Martínez-Florensa M, Aparicio P. Activation of T lymphocytes and the role of the adapter LAT. **Transpl Immunol.** 2006 Dec;17(1):23-6.
- Ahmed Z, Bicknell R. Angiogenic signalling pathways. **Methods Mol Biol.**2009; 467:3-24.
- Alizadeh A, Ross D, Perou C, van de Rijn M. Towards a novel classification of human malignancies based on gene expression patterns. **J Pathol.** 2005 Apr 6; 195(1):41-52.
- Andrade L, Pinheiro M, Nonogaki S, Nantel F., Battistini B, Sirois P, Chammas R. Bradykinin-dependent pathways are activated within tumor microenvironments – New targets for therapy. **4th International Conference on Tumor Microenvironment: Progression, Therapy & Prevention**, 06.-10.03.2007, Florence, Italy.
- Arai H, Koizumi H, Aoki J, Inoue K. Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH). **J Biochem.** 2002 May;131(5):635-40.
- Bajou K, Noël A, Gerard RD. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. **Nat Med.** 1998 Aug;4(8):923-8.
- Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. **J Clin Oncol** 2001;19:3635-48.
- Bergers G, Brekken R, McMahon G, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. **Nat Cell Biol.** 2000 Oct;2(10):737-44.
- Beyer-Sehlmeyer G, Hiddemann W, Wörmann B, Bertram J. Suppressive subtractive hybridisation reveals differential expression of serglycin, sorcin, bone marrow proteoglycan and prostate-tumour-inducing gene I (PTI-1) in drug-resistant and sensitive tumour cell lines of haematopoietic origin. **Eur J Cancer.** 1999 Nov;35(12):1735-42.

- Bhatia S, Tykodi S, Thompson JA. Treatment of metastatic melanoma: an overview. **Oncology** (Williston Park). 2009 May;23(6):488-96.
- Bisacchi D, Benelli R, Vanzetto C, Ferrari N, Tosetti F, Albini A. Anti-angiogenesis and angioprevention: mechanisms, problems and perspectives. **Cancer Detect Prev.** 2003; 27(3):229-238.
- Blankenstein T. The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system **Cur Opin Immunol** 2005; 17:180–186.
- Blaukat A. Structure and signalling pathways of kinin receptors. **Andrologia.** 2003 Feb; 35(1): 17-23
- Bock MG, Longmore J. **Bradykinin antagonists: new opportunities.** *Curr Opin Chem Biol.* 2000 Aug;4(4):401-6.
- Böckmann S, Paegelow I. Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. **J Leukoc Biol.** 2000 Nov;68(5):587-92.
- Bodzioch M, Dembinska-Kiec A, Hartwich J, et al. The Microarray Expression Analysis Identifies BAX as a Mediator of beta-Carotene Effects on Apoptosis. **Nutr Cancer.** 2005; 51(2):226-235.
- Boudreau N, Myers C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. **Breast Cancer Res** 2003 Mar; 5 (3):140-146
- Bulger EM, Gourlay D, Cuschieri J, Jelacic S, Staudenmeyer K, Garcia I, Maier RV. Platelet-activating factor acetylhydrolase inhibits alveolar macrophage activation in vivo. **Shock.** 2003 Jul;20(1):17-22.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde, INCA (Instituto Nacional de Câncer). Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2008: incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro; 2007.
- Broxterman HJ, Lankelma J, Hoekman K. Resistance to cytotoxic and anti-angiogenic anticancer agents: similarities and differences. **Drug Resist Updat.** 2003 Jun; 6(3):111-127.
- Buzaid A. Biochemotherapy for advanced melanoma. **Crit Rev Oncol Hematol.** 2002 Oct; 44(1):103-108.

- Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). **J Cell Mol Med.** 2005 Oct-Dec;9(4):777-94.
- Cairns R, Papandreou I, Denko N. Overcoming physiologic barriers to cancer treatment by molecularly targeting the tumor microenvironment. **Mol Cancer Res.** 2006 Feb; 4(2):61-70.
- Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **Br J Pharmacol.** 2004 Dec;143(7):803-18.
- Caloca MJ, Delgado P, Alarcón B, Bustelo XR. Role of chimaerins, a group of Rac-specific GTPase activating proteins, in T-cell receptor signaling. **Cell Signal.** 2008 Apr;20(4):758-70.
- Campbell D. The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. **Int J Biochem Cell Biol.** 2003 Jun; 35(6):784-791.
- Cassim B, Mody G, Bhoola K. Kallikrein cascade and cytokines in inflamed joints. **Pharmacol Ther.** 2002 Apr-May; 94(1-2):1-34.
- Cardoso RC, Lobão-Soares B, Bianchin MM et al. Enhancement of blood-tumor barrier permeability by Sar-[D-Phe8]des-Arg9BK, a metabolically resistant bradykinin B1 agonist, in a rat C6 glioma model. **BMC Neurosci.** 2004 Sep 30;5:38.
- Caunt M, Mak J, Liang WC, Stawicki S, et al. Blocking neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis. **Cancer Cell.** 2008 Apr;13(4):331-42.
- Chan DC, Gera L, Stewart JM, Helfrich B, Zhao TL, Feng WY, Chan KK, Covey JM, Bunn PA Jr. Bradykinin antagonist dimer, CU201, inhibits the growth of human lung cancer cell lines in vitro and in vivo and produces synergistic growth inhibition in combination with other antitumor agents. **Clin Cancer Res.** 2002 May;8(5):1280-7.
- Cicha I, Goppelt-Struebe M. Connective tissue growth factor: context-dependent functions and mechanisms of regulation. **Biofactors.** 2009 Mar-Apr;35(2):200-8.
- Clements J, Mukhtar A. Tissue kallikrein and the bradykinin B2 receptor are expressed in endometrial and prostate cancers. **Immunopharmacology.** 1997 Jun;36(2-3):217-20.

- Correa M, Machado JrJ, Carneiro CRW, Pesquero JB, Bader M, Travassos LR, Chammas R, Jasiulionis MG. Transient inflammatory response induced by apoptotic cells is an important mediator of melanoma cell engraftment and growth. **Int J Cancer**. 2005 Abr; 114(3): 356-63.
- Couture R, Girolami J. Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. **Eur J Pharmacol**. 2004 Oct 1; 500(1-3):467-485.
- Couture R, Harrisson M, Vianna R, Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. **Eur J Pharmacol**. 2001 Oct 19; 429(1-3):161-76.
- Curti BD, Urba WJ, Alvord WG et al. Interstitial pressure of subcutaneous nodules in melanoma and lymphoma patients: changes during treatment. **Cancer Res**. 1993 May 15;53(10 Suppl):2204-7.
- Danenberg PV. Pharmacogenomics of thymidylate synthase in cancer treatment. **Front Biosci**. 2004 Sep 1;9:2484-94.
- Daubin  F, Le Gall C, Gasser J, Green J, Cl zardin P. Antitumor effects of clinical dosing regimens of bisphosphonates in experimental breast cancer bone metastasis. **J Natl Cancer Inst**. 2007 Feb 21;99(4):322-30.
- Davis RS. Fc receptor-like molecules. **Annu Rev Immunol**. 2007;25:525-60.
- D'Incan M, Souteyrand P. Dacarbazine (D t c ne<sup> </sup>). **Ann Dermatol Venereol**. 2001. 128:517-25.
- De Palma M, Naldini L. Role of haematopoietic cells and endothelial progenitors in tumour angiogenesis. **Biochim Biophys Acta**. 2006 Aug; 1766(1):159-66.
- De Winter P, Leoni P, Abraham D. Connective tissue growth factor: Structure-function relationships of a mosaic, multifunctional protein. **Growth Factors**. 2008 Apr;26(2):80-91.
- Di Paolo A, Bocci G. Drug distribution in tumors: mechanisms, role in drug resistance, and methods for modification. **Curr Oncol Rep**. 2007 Mar;9(2):109-14.
- Dlamini Z, Raidoo D, Bhoola K. Visualisation of tissue kallikrein and kinin receptors in oesophageal carcinoma. **Immunopharmacol**. 1999 43:303-10.
- Do JH, Choi DK. Normalization of microarray data: single-labeled and dual-labeled arrays. **Mol Cells**. 2006 Dec 31;22(3):254-61.

- Doublier S, Ceretto M, Lupia E, Bravo S, Bussolati B, Camussi G. The proangiogenic phenotype of tumor-derived endothelial cells is reverted by the overexpression of platelet-activating factor acetylhydrolase. **Clin Cancer Res.** 2007 Oct 1;13(19):5710-8.
- Eggermont A, Kirkwood J. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years? **Eur J Cancer.** 2004 Aug; 40(12):1825-1836.
- Ehlers J, Harbour J. NBS1 expression as a prognostic marker in uveal melanoma. **Clin Cancer Res.** 2005 Mar 1; 11(5):1849-1853.
- Eichhorn M, Strieth S, Dellian M. Anti-vascular tumor therapy: recent advances, pitfalls and clinical perspectives. **Drug Resist Updat.** 2004 Apr; 7(2):125-38.
- Emanueli C, Salis MB, Stacca T, et al. Targeting kinin B (1) receptor for therapeutic neovascularization. **Circulation.** 2002;105:360–366.
- Emerich DF, Snodgrass P, Dean RL, et al. Bradykinin modulation of tumor vasculature: I. Activation of B2 receptors increases delivery of chemotherapeutic agents into solid peripheral tumors, enhancing their efficacy. **J Pharmacol Exp Ther.** 2001 Feb;296(2):623-31.
- Eric J, Gabra BH, Sirois P. Implication of the bradykinin receptors in antigen-induced pulmonary inflammation in mice. **Br J Pharmacol.** 2003 Apr; 138(8):1589-97.
- Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. **Nature.** 2005 Dec 15; 438(7070):967-74.
- Ferreira J, Beirith A, Mori M, Araujo R, Bader M, Pesquero J, Calixto J. Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B1 receptor knock-out mice. **J Neurosci.** 2005 Mar 2; 25(9):2405-12.
- Flaherty K. New molecular targets in melanoma. **Curr Opin Oncol.** 2004 Mar; 16(2):150-4.
- Flaherty KT. Chemotherapy and targeted therapy combinations in advanced melanoma. **Clin Cancer Res.** 2006 Apr 1;12(7 Pt 2):2366s-2370s.
- Folkman J. Angiogenesis. **Annu Rev Med.** 2006; 57:1-18.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth. **Ann Intern Med.** 1975 Jan; 82(1): 96-100.

- Friederichs J, Zeller Y, Hafezi-Moghadam A, Gröne HJ, Ley K, Altevogt P. The CD24/P-selectin binding pathway initiates lung arrest of human A125 adenocarcinoma cells. **Cancer Res.** 2000 Dec 1;60(23):6714-22.
- Fukumura D, Jain RK. Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize. **J Cell Biochem.** 2007 Jul 1;101(4):937-49.
- Gabra BH, Sirois P. Role of bradykinin B(1) receptors in diabetes-induced hyperalgesia in streptozotocin-treated mice. **Eur J Pharmacol.** 2002 Dec 20;457(2-3):115-24.
- Gabra BH, Sirois P. Beneficial effect of chronic treatment with the selective bradykinin B1 receptor antagonists, R-715 and R-954, in attenuating streptozotocin-diabetic thermal hyperalgesia in mice. **Peptides.** 2003 Aug;24(8):1131-9.
- Gabra BH, Sirois P. Kinin B1 receptor antagonists inhibit diabetes-induced hyperalgesia in mice. **Neuropeptides.** 2003 Feb;37(1):36-44.
- Gabra BH, Sirois P. Hyperalgesia in non-obese diabetic (NOD) mice: a role for the inducible bradykinin B1 receptor. **Eur J Pharmacol.** 2005 May 2;514(1):61-7.
- Gama Landgraf R, Sirois P, Jancar S. Differential modulation of murine lung inflammation by bradykinin B1 and B2 selective receptor antagonists. **Eur J Pharmacol.** 2003 Jan 26;460(1):75-83
- Gama Landgraf R, Jancar S, Steil A, Sirois P. Modulation of allergic and immune complex-induced lung inflammation by bradykinin receptor antagonists. **Inflamm Res.** 2004 Jan; 53(2):78-83.
- Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B. M., Irizarry, R. A. Affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. **Bioinformatics**, 3(20):307-315, 2004.
- Gentleman, R. C.; Carey, V. J.; Bates, D. M. et al.. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**, 5(10), 2004.
- Gogas HJ, Kirkwood JM, Sondak VK. Chemotherapy for metastatic melanoma: time for a change? **Cancer.** 2007 Feb 1;109(3):455-64.
- Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA, Bouck NP. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically

- and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1990 Sep; 87(17):6624-8.
- Greco S, Elia MG, Muscella A, Romano S, Storelli C, Marsigliante S. Bradykinin stimulates cell proliferation through an extracellular-regulated kinase 1 and 2-dependent mechanism in breast cancer cells in primary culture. **J Endocrinol**. 2005 Aug; 186(2):291-301.
- Grunewald TG, Kammerer U, Kapp M, Eck M, Dietl J, Butt E, Honig A. Nuclear localization and cytosolic overexpression of LASP-1 correlates with tumor size and nodal-positivity of human breast carcinoma. **BMC Cancer**. 2007 Oct 23;7:198.
- Grunewald TG, Butt E. The LIM and SH3 domain protein family: structural proteins or signal transducers or both? **Mol Cancer**. 2008 Apr 17;7:31.
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**. 1996 Aug 9; 86(3): 353-364.
- Hanahan D, Weinberg R. The Hallmarks of Cancer. **Cell** 2000 Jan; 100: 57–70.
- Harmey JH, Bouchier-Hayes D. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: implications for anti-angiogenic therapy. **Bioessays**. 2002 Mar; 24(3):280-3.
- Heldin CH, Rubin K, Pietras K, Ostman A. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. **Nat Rev Cancer**. 2004 Oct; 4(10):806-13.
- Hiraga T, Williams PJ, Ueda A, Tamura D, Yoneda T. Zoledronic acid inhibits visceral metastases in the 4T1/luc mouse breast cancer model. **Clin Cancer Res**. 2004 Jul 1;10(13):4559-67.
- Hofmeister V, Schrama D, Becker JC. Anti-cancer therapies targeting the tumor stroma. **Cancer Immunol Immunother**. 2008 Jan;57(1):1-17.
- Horlick RA, Ohlmeyer MH, Stroke IL, et al.. Small molecule antagonists of the bradykinin B1 receptor. **Immunopharmacology**. 1999 Sep;43(2-3):169-77.
- Huang Q, Huang Q, Chen W, Wang L, Lin W, Lin J, Lin X. Identification of transgelin as a potential novel biomarker for gastric adenocarcinoma based on proteomics technology. **J Cancer Res Clin Oncol**. 2008

- Huang Y, Fan J, Yang J, Zhu GZ. Characterization of GPR56 protein and its suppressed expression in human pancreatic cancer cells. **Mol Cell Biochem.** 2008 Jan;308(1-2):133-9
- Huxham LA, Kyle AH, Baker JH, Nykilchuk LK, Minchinton AI. Microregional effects of gemcitabine in HCT-116 xenografts. **Cancer Res** 2004;64:6537-41
- Ignjatovic T, Tan F, Brovkovich F, Skidgel R, Erdös E. Activation of bradykinin B1 receptor by ACE inhibitors. **Int Immunopharmacol** 2002; 2:1787-1793.
- Ikeda Y, Hayashi I, Kamoshita E, et al. Host stromal bradykinin B2 receptor signaling facilitates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. **Cancer Res.** 2004 Aug 1; 64(15):5178-85.
- Irizarry R, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay Y, Antonellis K, Scherf U, Speed T. Exploration, normalization, and summaries of high density array probe level data. **Biostatistics**, 2003 4:249-264.
- Ishihara K, Hayash I, Yamashina S, Majima M. A potential role of bradykinin in angiogenesis and growth of S-180 mouse tumors. **Jpn J Pharmacol.** 2001 Dec; 87(4): 318-326.
- Ishihara K, Kamata M, Hayashi I, Yamashina S, Majima M. Roles of bradykinin in vascular permeability and angiogenesis in solid tumor. **Int Immunopharmacol.** 2002 Mar; 2(4):499-509.
- Jain RK. Antiangiogenic therapy for cancer: current and emerging concepts. **Oncology (Williston Park)** 2005 Apr; 19(4 Suppl 3):7-16.
- Kim JS, Han J, Shim YM, Park J, Kim DH. Aberrant methylation of H-cadherin (CDH13) promoter is associated with tumor progression in primary nonsmall cell lung carcinoma. **Cancer.** 2005 Nov 1;104(9):1825-33.
- Kotsakis P, Griffin M. Tissue transglutaminase in tumour progression: friend or foe? **Amino Acids.** 2007 Aug;33(2):373-84.
- Kränkel N, Katare RG, Siragusa M, et al. Role of kinin B2 receptor signaling in the recruitment of circulating progenitor cells with neovascularization potential. **Circ Res.** 2008 Nov 21;103(11):1335-43.
- Kwaan HC, Wang J, Svoboda K, Declerck PJ. Plasminogen activator inhibitor 1 may promote tumour growth through inhibition of apoptosis. **Br J Cancer.** 2000 May;82(10):1702-8.

- Labrousse A, Ntayi C, Hornebeck W, Bernard P. Stromal reaction in cutaneous melanoma. **Crit Rev Oncol Hematol**. 2004 Mar; 49(3):269-275.
- Lader AS, Ramoni MF, Zetter BR, Kohane IS, Kwiatkowski DJ. Identification of a transcriptional profile associated with in vitro invasion in non-small cell lung cancer cell lines. **Cancer Biol Ther**. 2004 Jul;3(7):624-31.
- Landgraf RG, Sirois O, Jancar S. Differential modulation of murine lung inflammation by bradykinin B1 and B2 selective receptor antagonists. **Eur J Pharmacol**. 2003 460:75-83.
- Lankelma J, Dekker H, Luque FR, Luykx S, Hoekman K, van der Valk P, van Diest PJ, Pinedo HM. Doxorubicin gradients in human breast cancer. **Clin Cancer Res**. 1999 Jul;5(7):1703-7.
- Lawson SR, Gabra BH, Guérin B, Neugebauer W, Nantel F, Battistini B, Sirois P. Enhanced dermal and retinal vascular permeability in streptozotocin-induced type 1 diabetes in Wistar rats: blockade with a selective bradykinin B1 receptor antagonist. **Regul Pept**. 2005 Jan 15;124(1-3):221-4.
- Lawson SR, Gabra BH, Nantel F, Battistini B, Sirois P. Effects of a selective bradykinin B1 receptor antagonist on increased plasma extravasation in streptozotocin-induced diabetic rats: distinct vasculopathic profile of major key organs. **Eur J Pharmacol**. 2005 May 2;514(1):69-78.
- Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. **Pharmacol Rev**. 2005 Mar; 57(1):27-77.
- Leeman MF, Curran S, Murray GI. The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13. **Crit Rev Biochem Mol Biol**. 2002;37(3):149-66.
- Lev DC, Onn A, Melinkova VO, Miller C, Stone V, Ruiz M, McGary EC, Ananthaswamy HN, Price JE, Bar-Eli M. Exposure of melanoma cells to dacarbazine results in enhanced tumor growth and metastasis in vivo. **J Clin Oncol**. 2004 Jun(1); 22(11):2092-100.
- Lev DC, Onn A, Ruiz M, Mills L, McGary EC, Price JE, Bar-Eli M. Dacarbazine causes transcriptional up-regulation of interleukin 8 and vascular endothelial

- growth factor in melanoma cells: a possible escape mechanism from chemotherapy. **Mol Cancer Therapeutics**. 2003 Aug 2;753-63.
- Li C, Hung Wong W. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. **Genome Biol**. 2001; 2(8):RESEARCH0032.
- Liang TW, Chiu HH, Gurney A, et al. Vascular endothelial-junctional adhesion molecule (VE-JAM)/JAM 2 interacts with T, NK, and dendritic cells through JAM 3. **J Immunol**. 2002 Feb 15;168(4):1618-26.
- Ma WW, Adjei AA. Novel agents on the horizon for cancer therapy. **CA Cancer J Clin**. 2009 Mar-Apr;59(2):111-37.
- Maeda H, Fang J, Inutsuka T, Kitamoto Y. Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications. **Int Immunopharmacol**. 2003 Mar; 3(3):319-328.
- Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B1 receptors for kinins. **Pharmacol Rev**. 1998 Sep; 50(3): 357-86.
- Marceau F, Regoli D. Bradykinin receptor ligands: Therapeutic perspectives. **Nat Rev Drug Discov** 2004 Oct; 3:845-852.
- Marceau F, Sabourin T, Houle S, Fortin J, Petitclerc E, Molinaro G, Adam A. Kinin receptors: functional aspects. **Int Immunopharmacol**. 2002 Dec; 2(13-14):1729-1739.
- McDermott DF, Sosman JA, Gonzalez R, et al. Double-blind randomized phase II study of the combination of sorafenib and dacarbazine in patients with advanced melanoma: a report from the 11715 Study Group. **J Clin Oncol** 2008; 26:2178–85.
- Melnikova VO, Bar-Eli M. Inflammation and melanoma metastasis. **Pigment Cell Melanoma Res**. 2009 Jun;22(3):257-67.
- Minor DR, Madland MT, Kashani-Sabet M, Denny SR, Harvey WB. A retrospective study of biochemotherapy for metastatic melanoma: the importance of dose intensity. **Cancer Biother Radiopharm**. 2005 Oct;20(5):479-86.
- Mitchell MS. Chemotherapy for melanoma: the resultant of conflicting vectors. **J Clin Oncol**. 2004 Jun 1;22(11):2043-5.

- Molina L, Matus CE, Astroza A, et al. Stimulation of the bradykinin B(1) receptor induces the proliferation of estrogen-sensitive breast cancer cells and activates the ERK1/2 signaling pathway. **Breast Cancer Res Treat.** 2009 Jan 28.
- Morandi E, Zingaretti C, Chiozzotto D, et al.. A cDNA-microarray analysis of camptothecin resistance in glioblastoma cell lines. **Cancer Lett.** 2006 Jan 8;231(1):74-86.
- Morbideilli L, Parenti A, Giovannelli L, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. B1 receptor involvement in the effect of bradykinin on venular endothelial cell proliferation and potentiation of FGF-2 effects. **Br J Pharmacol.** 1998 Jul; 124(6): 1286-1292.
- Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. **J Pharmacol Sci.** 2005 Sep;99(1):6-38.
- Morissette G, Houle S, Gera L, Stewart JM, Marceau F. Antagonist, partial agonist and antiproliferative actions of B-9870 (CU201) as a function of the expression and density of the bradykinin B1 and B2 receptors. **Br J Pharmacol.** 2007 Feb;150(3):369-79.
- Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. **Nat Rev Cancer.** 2004 Nov;4(11):839-49.
- Murie C, Woody O, Lee AY, Nadon R. Comparison of small n statistical tests of differential expression applied to microarrays. **BMC Bioinformatics.** 2009 Feb 3;10:45.
- Nadon R, Shoemaker J. Statistical issues with microarrays: processing and analysis. **Trends Genet.** 2002 May;18(5):265-71.
- Naidoo S, Raidoo D, Mahabeer R, McLean M. Tumour metabolites regulate tissue kallikrein in human umbilical vein endothelial cells. **Biochim Biophys Acta.** 2004 May 3; 1691(2-3):117-127.
- Naidoo S, Raidoo DM. Tissue kallikrein and kinin receptor expression in an angiogenic co-culture neuroblastoma model. **Metab Brain Dis.** 2006 Sep;21(2-3):253-65.
- Nambiar S, Mirmohammadsadegh A, Doroudi R, Gustrau A, Marini A, Roeder G, Ruzicka T, Hengge U. Signaling networks in cutaneous melanoma metastasis

- identified by complementary DNA microarrays. **Arch Dermatol.** 2005 Feb; 141(2):165-173.
- Neugebauer W, Blais PA, Halle S, Filteau C, Regoli D, Gobeil F Jr. Kinin B1 receptor antagonists with multi-enzymatic resistance properties. **Can J Physiol Pharmacol.** 2002 Apr; 80(4):287-92.
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell.** 1997 Jan 24; 88(2):277-85.
- Pagès G, Milanini J, Richard DE, Berra E, Gothié E, Viñals F, Pouyssegur J. Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase cascade. **Ann N Y Acad Sci.** 2000 May;902:187-200.
- Palmieri D, Lee JW, Juliano RL, Church FC. Plasminogen activator inhibitor-1 and -3 increase cell adhesion and motility of MDA-MB-435 breast cancer cells. **J Biol Chem.** 2002 Oct 25;277(43):40950-7
- Parenti A, Morbidelli L, Ledda F, Granger HJ, Ziche M The bradykinin/B1 receptor promotes angiogenesis by up-regulation of endogenous FGF-2 in endothelium via the nitric oxide synthase pathway. **FASEB J.** 2001 Jun; 15(8): 1487-1489.
- Park C, Bissell M, Barcellos-Hoff M. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype **Mol Med Today** 2000; Aug; 6: 324-329.
- Pesquero J, Araujo R, Heppenstall P, et al.. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. **Proc Natl Acad Sci** 2000 Jul 5; 97(14):8140-8145.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.** 2001
- Philip PA, Flaherty LE. Biochemotherapy for melanoma. **Curr Oncol Rep.** 2000 Jul;2(4):314-21.
- van der Pluijm G, Que I, Sijmons B, Buijs JT, Löwik CW, Wetterwald A, Thalmann GN, Papapoulos SE, Cecchini MG. Interference with the microenvironmental support impairs the de novo formation of bone metastases in vivo. **Cancer Res.** 2005 Sep 1;65(17):7682-90.
- Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. **Nat Rev Cancer.** 2004 Jan;4(1):71-8.

- Pradelli E, Karimjee-Soilihi B, Michiels JF, et al Antagonism of chemokine receptor CXCR3 inhibits osteosarcoma metastasis to lungs. **Int J Cancer**. 2009 Jun 19.
- Prado G, Taylor L, Zhou X, Ricupero D, Mierke D, Polgar P. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. **J Cel Physiol** 2002; 193:275–286.
- Primeau AJ, Rendon A, Hedley D, Lilge L and Tannock IF. The distribution of the anticancer drug doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors. **Clin Cancer Res** 2005; 11 (24): 8782-8788.
- Raidoo DM, Sawant S, Mahabeer R, Bhoola KD. Kinin receptors are expressed in human astrocytic tumour cells. **Immunopharmacology**. 1999 Sep;43(2-3):255-63.
- Raman D, Baugher PJ, Thu YM, Richmond A. Role of chemokines in tumor growth. **Cancer Lett**. 2007 Oct 28;256(2):137-65
- Rak J, Yu JL, Klement G, Kerbel RS. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. **J Investig Dermatol Symp Proc**. 2000 Dec; 5(1):24-33.
- Regoli D, Jukic D, Gobeil F, Rhaleb NE. Receptors for bradykinin and related kinins: a critical analysis. **Can J Physiol Pharmacol**. 1993 Aug;71(8):556-67.
- Regoli D, Nsa Allogho S, Rizzi A, Gobeil FJ. Bradykinin receptors and their antagonists. **Eur J Pharmacol**. 1998 May 1; 348(1): 1-10.
- Reid J, Schrader AP, Morris BJ. No effect of kinins on DNA synthesis in LNCaP prostate cancer cells. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. 1994 21:729-33.
- Reimers M. Statistical analysis of microarray data. **Addict Biol**. 2005 Mar; 10(1):23-35.
- Rustum YM. Thymidylate synthase: a critical target in cancer therapy? **Front Biosci**. 2004 1;9:2467-73.
- Saeed AI, Sharov V., White J., et al.: TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. **Biotechniques**, 34:374-378, 2003.
- Salnikov AV, Heldin NE, Stuhr LB, Wiig H, Gerber H, Reed RK, Rubin K. Inhibition of carcinoma cell-derived VEGF reduces inflammatory characteristics in xenograft carcinoma. **Int J Cancer**. 2006 Dec 15; 119(12):2795-802.

- Sawant S, Snyman C, Bhoola K. Comparison of tissue kallikrein and kinin receptor expression in gastric ulcers and neoplasms. **Int Immunopharmacol**. 2001 1:2063-80.
- Senner V, Sturm A, Baur I, Schrell UH, Distel L, Paulus W. CD24 promotes invasion of glioma cells in vivo. **J Neuropathol Exp Neurol**. 1999 Aug;58(8):795-802.
- Sharma J, Al-Dhalmawi G. Bradykinin receptor antagonists: therapeutic implications. **IDrugs**. 2003 Jun; 6(6):581-6.
- Sharma JN. The kallikrein-kinin system: from mediator of inflammation to modulator of cardioprotection. **Inflammopharmacology**. 2005;12(5-6):591-6.
- Sherman M, Multhoff G. Heat shock proteins in cancer. **Ann N Y Acad Sci**. 2007 Oct;1113:192-201.
- Simard B, Gabra BH, Sirois P. Inhibitory effect of a novel bradykinin B1 receptor antagonist, R-954, on enhanced vascular permeability in type 1 diabetic mice. **Can J Physiol Pharmacol**. 2002 Dec;80(12):1203-7.
- Skliarenko JV, Lunt SJ, Gordon ML, Vitkin A, Milosevic M, Hill RP. Effects of the vascular disrupting agent ZD6126 on interstitial fluid pressure and cell survival in tumors. **Cancer Res**. 2006 Feb 15;66(4):2074-80.
- Smyth, G. K. Limma: linear models for microarray data. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. **Springer**, 397-420, 2005.
- Song J, Sainz I, Cosenza S, Isordia-Salas I, Bior A, Bradford H, Guo Y, Pixley R, Reddy E, Colman R. Inhibition of tumor angiogenesis in vivo by a monoclonal antibody targeted to domain 5 of high molecular weight kininogen. **Blood**. 2004 Oct 1; 104(7):2065-2072.
- Soo ET, Yip GW, Lwin ZM, Kumar SD, Bay BH. Heat shock proteins as novel therapeutic targets in cancer. **In Vivo**. 2008 May-Jun;22(3):311-5.
- Staton CA, Kumar I, Reed MW, Brown NJ. Neuropilins in physiological and pathological angiogenesis. **J Pathol**. 2007 Jul;212(3):237-48.
- Stewart J, Chan DC, Simkeviciene V, et al. Bradykinin antagonists as new drugs for prostate cancer. **Int Immunopharmacol**. 2002 Dec; 2(13-14):1781-1786.

- Stewart J. Bradykinin antagonists: discovery and development. **Peptides**. 2004 Mar; 25(3):527-532.
- Stewart JM, Gera L, Chan DC, York EJ, Simkeviciene V, Bunn PA Jr, Taraseviciene-Stewart L. Combination cancer chemotherapy with one compound: pluripotent bradykinin antagonists. **Peptides**. 2005 Aug;26(8):1288-91.
- Stewart JM, Gera L, York EJ, Chan DC, Bunn P. Bradykinin antagonists: present progress and future prospects. **Immunopharmacology**. 1999 Sep;43(2-3):155-61.
- Stewart JM. Bradykinin antagonists as anti-cancer agents. **Curr Pharm Des**.2003;9(25):2036-42.
- Strieter RM, Burdick MD, Mestas J, Gomperts B, Keane MP, Belperio JA. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. **Eur J Cancer**. 2006 Apr;42(6):768-78.
- Sung M, Simon R. Candidate epitope identification using peptide property models: application to cancer immunotherapy. **Methods**. 2004 Dec; 34(4):460-467.
- Takagi T, Sakakura C, Kin S, et al. A. Dextran sulfate suppresses cell adhesion and cell cycle progression of melanoma cells. **Anticancer Res**. 2005 Mar-Apr; 25(2A):895-902.
- Tan TW, Lai CH, Huang CY, Yang WH, Chen HT, Hsu HC, Fong YC, Tang CH. CTGF enhances migration and MMP-13 up-regulation via alphavbeta3 integrin, FAK, ERK, and NF-kappaB-dependent pathway in human chondrosarcoma cells. **J Cell Biochem**. 2009 May 15;107(2):345-56.
- Tannock IF. **The Basic Science of Oncology**. McGraw Hill, 4th edition, 2005.
- Taub JS, Guo R, Leeb-Lundberg LM, Madden JF, Daaka Y. Bradykinin receptor subtype 1 expression and function in prostate cancer. **Cancer Res**. 2003 May 1;63(9):2037-41.
- Teicher BA. Acute and chronic in vivo therapeutic resistance. **Biochem Pharmacol**. 2009 Jun 1;77(11):1665-73.
- Theocharis AD, Seidel C, Borset M, et al. Serglycin constitutively secreted by myeloma plasma cells is a potent inhibitor of bone mineralization in vitro. **J Biol Chem**. 2006 Nov 17;281(46):35116-28.

- Thirlwell C, Nathan P. Melanoma--part 2: management. **BMJ**. 2008 Dec 1;337:2488.
- Trédan O, Galmarini CM, Patel K and Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. **J Natl Cancer Inst** 2007; 99: 1441-54.
- Trédan O, Garbens AB, Lalani AS, Tannock IF. The hypoxia-activated ProDrug AQ4N penetrates deeply in tumor tissues and complements the limited distribution of mitoxantrone. **Cancer Res**. 2009 Feb 1;69(3):940-7.
- Tunggal JK, Cowan DS, Shaikh H, Tannock IF. Penetration of anticancer drugs through solid tissue: a factor that limits the effectiveness of chemotherapy for solid tumors. **Clin Cancer Res** 1999; 5:1583–6.
- Ueno A, Oh-ishi S. Roles for the kallikrein-kinin system in inflammatory exudation and pain: lessons from studies on kininogen-deficient rats. **J Pharmacol Sci**. 2003 Sep; 93(1):1-20.
- Verma A, Mehta K. Transglutaminase-mediated activation of nuclear transcription factor-kappaB in cancer cells: a new therapeutic opportunity. **Curr Cancer Drug Targets**. 2007 Sep;7(6):559-65.
- Vicari AP, Caux C. Chemokines in cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**. 2002 Apr;13(2):143-54
- Wang DZ, Chao L, Chao J. Cellular localization of bradykinin B1 receptor mRNA in the human kidney. **Immunopharmacology**. 1996 33:151-56.
- Wang FQ, So J, Reierstad S, Fishman DA. Vascular endothelial growth factor-regulated ovarian cancer invasion and migration involves expression and activation of matrix metalloproteinases. **Int J Cancer**. 2006 Feb 15; 118(4):879-88.
- Wang MY, Chen PS, Prakash E, Hsu HC, Huang HY, Lin MT, Chang KJ, Kuo ML. Connective tissue growth factor confers drug resistance in breast cancer through concomitant up-regulation of Bcl-xL and cIAP1. **Cancer Res**. 2009 Apr 15;69(8):3482-91.
- Wang PH, Campanholle G, Cenedeze MA, et al. Bradykinin B1 receptor antagonism is beneficial in renal ischemia-reperfusion injury. **PLoS ONE**.2008 Aug 25;3(8):e3050.
- Wettenhall JM, Smyth GK. limmaGUI: a graphical user interface for linear modeling of microarray data. **Bioinformatics**. 2004 Dec 12;20(18):3705-6.

- Wey JS, Gray MJ, Fan F, et al. Overexpression of neuropilin-1 promotes constitutive MAPK signalling and chemoresistance in pancreatic cancer cells. **Br J Cancer**. 2005 Jul 25;93(2):233-41.
- Wildiers H, Guetens G, De Boeck G, Verbeken E, Landuyt B, Landuyt W, de Bruijn EA, van Oosterom AT. Effect of antivasular endothelial growth factor treatment on the intratumoral uptake of CPT-11. **Br J Cancer**. 2003 Jun 16; 88 (12):1979-86.
- Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer. **Nat Med**. 2004 Jun; 10(6):649
- Wilson J, Balkwill F. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. **Semin Cancer Biol**. 2002 Apr; 12(2):113-120.
- Wu J, Akaike T, Hayashida K, Miyamoto Y, Nakagawa T, Miyakawa K, Müller-Esterl W, Maeda H. Identification of bradykinin receptors in clinical cancer specimens and murine tumor tissues. **Int J Cancer**. 2002 Mar 1;98(1):29-35.
- Wu J, Akaike T, Maeda H. Modulation of enhanced vascular permeability in tumors by a bradykinin antagonist, a cyclooxygenase inhibitor, and a nitric oxide scavenger. **Cancer Res**. 1998 Jan 1;58(1):159-65.
- Xu L, Hynes RO. GPR56 and TG2: possible roles in suppression of tumor growth by the microenvironment. **Cell Cycle**. 2007 Jan 15;6(2):160-5.
- Yang AS, Chapman PB. The history and future of chemotherapy for melanoma. **Hematol Oncol Clin North Am**. 2009 Jun; 23(3):583-97.
- Yeh ET, Bickford CL. Cardiovascular complications of cancer therapy: incidence, pathogenesis, diagnosis, and management. **J Am Coll Cardiol**. 2009 Jun 16;53(24):2231-47.

## ANEXO 1

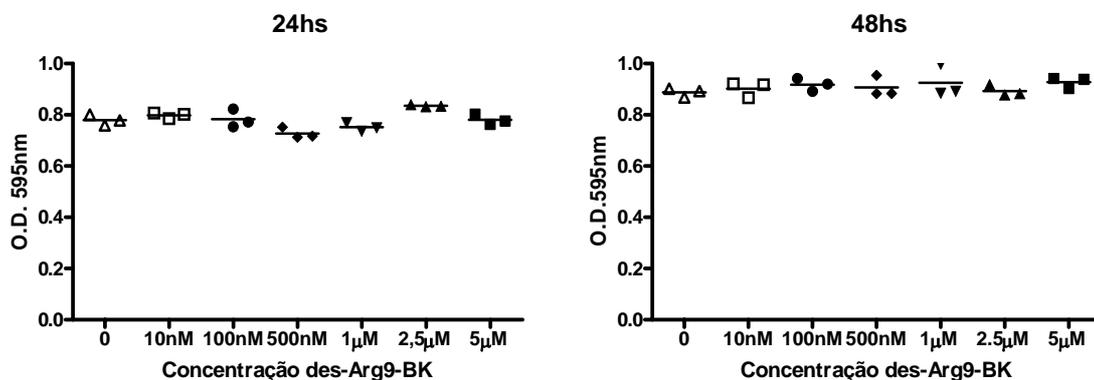
### ANÁLISE DA ATIVAÇÃO DA VIA DE BKR1 EM CÉLULAS B16-F10 *IN VITRO*.

Células de melanoma murino B16-F10 foram incubadas com concentrações crescentes do agonista de BKR1 des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina para determinar efeitos proliferativos ou citotóxicos resultantes da ativação dessa via nessas células *in vitro*.

#### **Ensaio de MTT**

O ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é um método quantitativo colorimétrico de determinação *in vitro* do número de células metabolicamente ativas. Foram plaqueadas  $5 \times 10^3$  células B16-F10 em placas de 96 poços e mantidas sob condições de cultura por 24 horas. Após o tratamento das células por 24 e 48 horas com concentrações crescentes do agonista de BKR1 des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina (0; 10nM; 100nM; 500nM; 1mM; 2,5mM; 5mM), foi adicionado ao meio de cultura 0,5 mg/mL de MTT. As células foram incubadas em estufa umedecida de CO<sub>2</sub>, a 37°C por 4 horas, e após esse período foi adicionado tampão de solubilização e incubadas por 15 horas em atmosfera umedecida a 37°C. Após esse período, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 595nm. Cada concentração de R-954 foi testada em triplicata.

## Resultado:



**Figura 36. Determinação da viabilidade de células B16-F10 após 24 e 48 horas de incubação com concentrações crescentes do agonista de BKR1 des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina pelo método de MTT. A densidade óptica obtida correlaciona-se diretamente com o número de células viáveis. Cada ponto representa média de ensaio realizado em triplicata. Este resultado é representativo de dois experimentos independentes.**

O número de células viáveis não se alterou significativamente na presença de des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina em nenhuma concentração testada, após 24 e 48 horas, como mostra a figura 36.

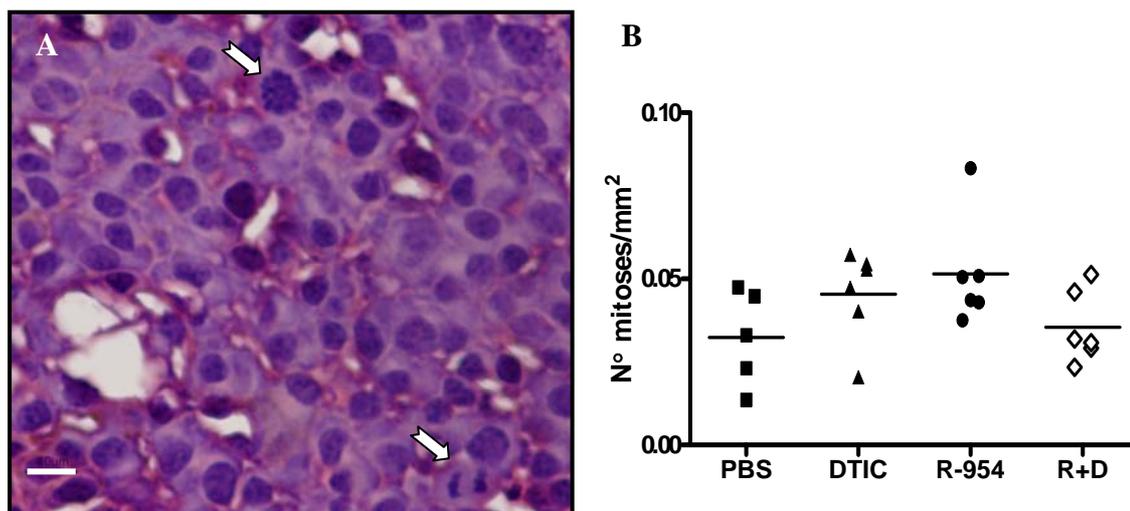
## ANEXO 2

### DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE MITÓTICO DE CÉLULAS B16-F10 IMPLANTADAS EM CAMUNDONGOS, SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM R-954, DTIC E R-954 COMBINADO À DTIC

A fim de analisar o índice mitótico das células tumorais no microambiente tumoral em camundongos tratados com R-954 e DTIC isoladamente ou em combinação, camundongos C57Bl/6 receberam o implante tumoral (B16-F10) e foram tratados diariamente com R-954, desde 24 horas antes do implante, e a cada três dias com DTIC. No 12º dia após a implantação tumoral os camundongos foram eutanizados, os tumores excisados e fixados para processamento histoquímico. A taxa de crescimento tumoral foi bastante semelhante em todos os grupos experimentais, assim como a massa dos tumores excisados ao final do experimento (dados não mostrados).

Os fragmentos tumorais foram observados ao microscópio de luz (Nikon Eclipse E600) para análise qualitativa e as imagens foram adquiridas com a câmera digital DXM 1200F (Nikon) e visualizadas pelo programa de análise de imagens Eclipse Net (Nikon) para a análise morfométrica. A massa tumoral total de cada fragmento foi analisada, totalizando cerca de 20 a 30 campos (micrografias) de cada espécime, de acordo com o tamanho do fragmento tumoral. Cada fragmento tumoral representa um tumor proveniente de um animal. As micrografias foram feitas em um aumento de 400x. Como os tumores apresentavam densidade celular bastante

semelhante, foi feita a contagem manual das figuras de mitose por unidade de área tumoral, apenas em áreas tumorais livres de necrose, com o auxílio de um retículo de pontos (“retículo A”) com área de 421,7cm<sup>2</sup> (espaço de referência). Os resultados foram expressos em número de figuras de mitose por mm<sup>2</sup> de área tumoral.



**Figura 37. Determinação do índice mitótico de células B16-F10 implantadas em camundongos, submetidos ao tratamento com R-954, DTIC e R-954 combinado à DTIC.** Tumores de camundongos tratados com PBS, R-954, DTIC e R-954 + DTIC foram processados e corados com hematoxilina e eosina. A) Micrografia de um fragmento tumoral proveniente de um animal tratado com R-954, como exemplo. As setas brancas indicam 2 figuras de mitoses. A micrografia foi feita num aumento de 400x e a barra equivale a 10µm. B) Índice mitótico expresso pelo número de figuras de mitose por mm<sup>2</sup> de área tumoral. As figuras de mitose presentes no microambiente tumoral foram contadas manualmente em cerca de 20 a 30 micrografias por fragmento tumoral. A barra mostra a média de 5-6 fragmentos tumorais analisados por grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste *One Way ANOVA* (p= 0,11).

Não foi constatada diferença estatística significativa no número de mitoses por área tumoral entre os camundongos controle e os camundongos tratados com R-954, DTIC ou tratados concomitantemente com R-954 e DTIC (figura 37).

## **ANEXO 3**

### **AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE TUMORES B16-F10 COM A UTILIZAÇÃO DE MINI-BOMBAS OSMÓTICAS PARA A ADMINISTRAÇÃO CONTÍNUA DO ANTAGONISTA R-954.**

Os camundongos com implante tumoral vinham sendo convencionalmente tratados com o antagonista peptídico R-954 por meio de injeções subcutâneas diárias de 1mg/kg. A fim de comparar o crescimento tumoral na vigência do tratamento com R-954 feita de modo convencional, isto é, por injeções diárias, com a infusão contínua de R-954, foram utilizadas mini bombas osmóticas preenchidas com R-954 ou PBS e implantadas nos camundongos.

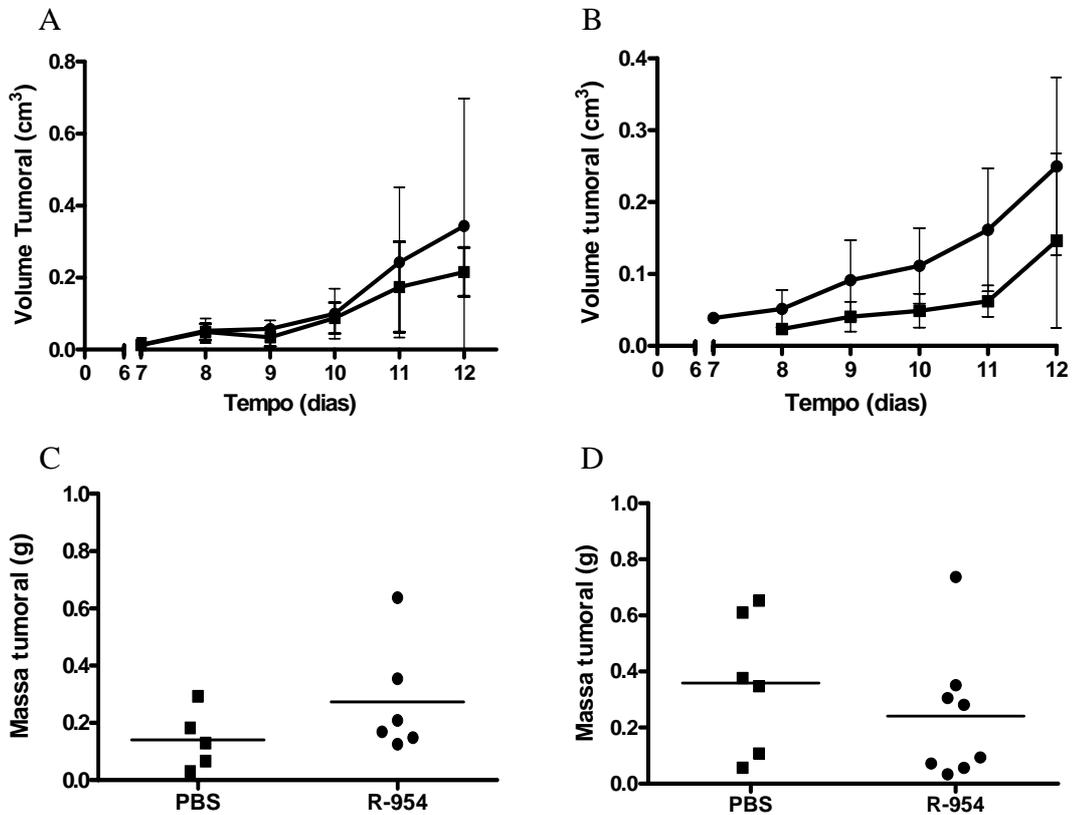
#### **Implante das mini-bombas osmóticas**

14 Camundongos C57BL/6 do tipo selvagem foram anestesiados (50mg/kg Cetamina e 10mg/Kg de Cloridrato de Xilazina i.p.). Após alguns minutos os pêlos da região dorsal dos camundongos foram raspados com aparelho de barbear no local da cirurgia. Foi feito um corte na pele da região dorsal de cada animal de cerca de 1cm com uma tesoura, em seguida, com auxílio de uma pinça a pele foi afastada de forma a separá-la do corpo do animal formando uma espécie de bolso onde a mini bomba osmótica contendo PBS ou R-954 (1mg/kg/dia) foi inserida. Foi utilizada a bomba osmótica modelo 2002 Alzet® (Durect, USA) com dimensões de 3cm x

0,7cm, capacidade para 14 dias e taxa de liberação de 0,5 $\mu$ L/h ( $\pm$ 0,02 $\mu$ L/h). As bombas osmóticas foram preenchidas de acordo com as instruções do fabricante. Após acomodar a bomba osmótica o corte foi suturado com 3 ou 4 pontos cirúrgicos isolados.

No dia seguinte ao implante cirúrgico da bomba osmótica foi feito o implante das células tumorais. Foi injetado subcutaneamente no flanco direito do animal 5x10<sup>5</sup> Células de melanoma B16-F10. O crescimento tumoral foi acompanhado e os animais foram eutanizados no 12º dia após o implante de células. O tumor de cada animal foi removido cirurgicamente para análise morfométrica. As bombas osmóticas foram removidas e o conteúdo residual de solução em cada uma foi medido para verificar se a taxa de liberação de solução foi a desejada.

## Resultado:



**Figura 38. Avaliação do crescimento tumoral com a utilização de mini-bombas osmóticas para administração contínua do antagonista R-954.** A e C) 6 camundongos C57BL/6 foram tratados com injeções diárias de R-954 (1mg/kg s.c.) desde 24 horas antes da implantação tumoral até 12 dias depois, quando foram eutanizados. B e D) Bombas osmóticas contendo PBS ou R-954 (1mg/kg/dia) foram implantadas subcutaneamente em 6 e 8 camundongos, respectivamente. No dia seguinte ao início do tratamento foi realizada a implantação tumoral pela injeção subcutânea de  $5 \times 10^5$  células B16-F10 no flanco direito de cada animal, em ambos os esquemas de tratamento. A e B) Taxa de crescimento tumoral. C e D) Massa dos tumores no 12º dia após a implantação tumoral. A análise estatística foi realizada com teste T de *Student*.

Não foi observada diferença significativa no crescimento e massa tumoral de camundongos comparando-se a administração contínua de R-954 (bombas osmóticas) e a administração intermitente (injeções diárias). O volume residual

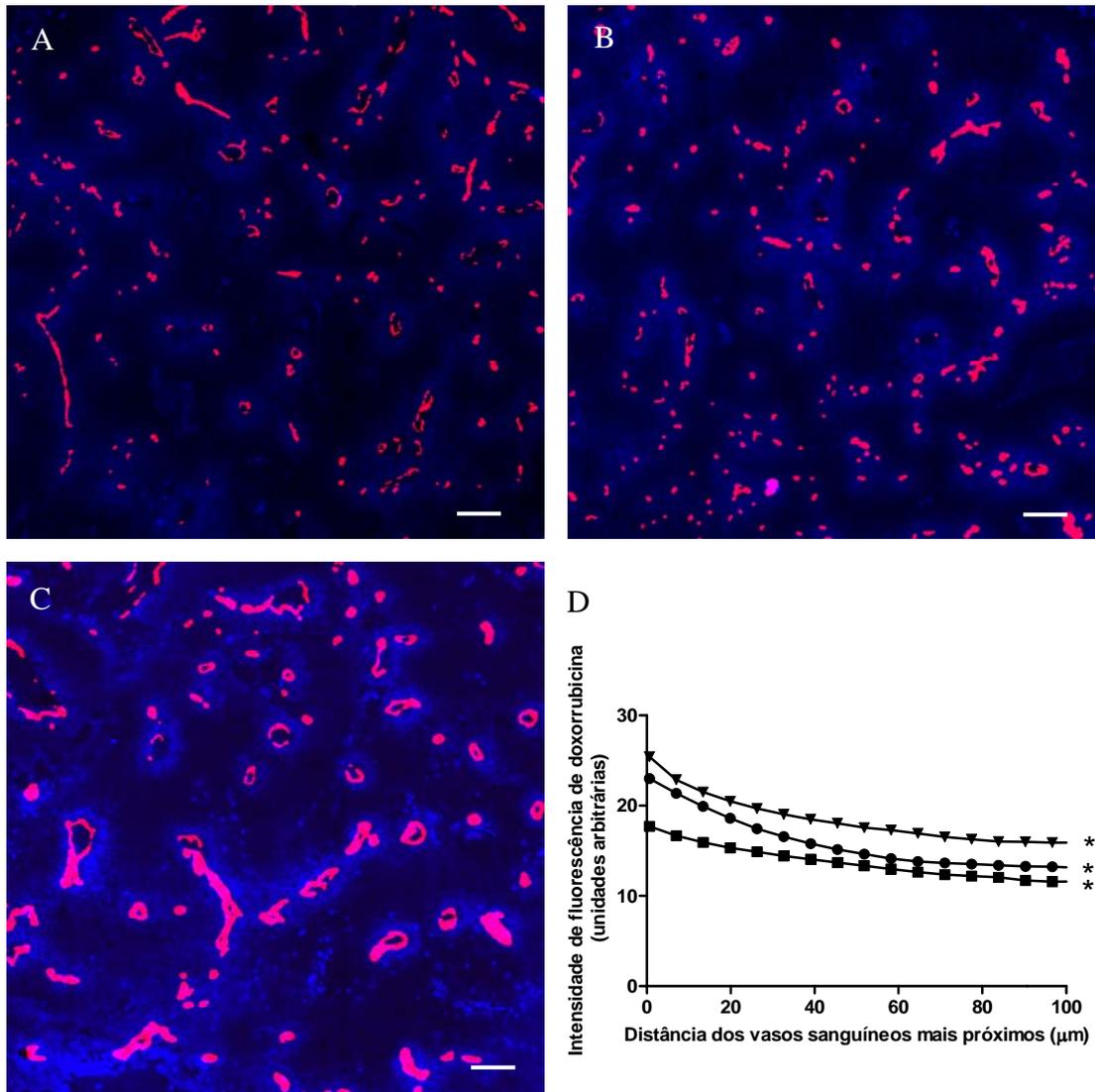
contido nas bombas osmóticas foi verificado após a retirada dos mesmos dos animais e foi condizente com o volume esperado, tendo em vista a duração do tratamento (12 dias), indicando que a taxa de liberação da solução foi a prevista (0,5µL/h). Portanto, a administração contínua de R-954, realizada por meio da implantação de bombas osmóticas, comparada à administração intermitente, por meio de injeções diárias, não alterou significativamente a taxa de crescimento tumoral.

## ANEXO 4

### AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES NA DISTRIBUIÇÃO DE DOXORRUBICINA NO MICROAMBIENTE DE SARCOMA EMT6 EM FUNÇÃO DO TRATAMENTO COM OS ANTAGONISTAS R-954 E R-715.

A distribuição de doxorubicina no microambiente tumoral foi avaliada em tumores EMT6 (sarcoma mamário murino) após duas horas do tratamento com os antagonistas do BKRI R-954 e R-715.

A figura 39 mostra qualitativa e quantitativamente a distribuição de doxorubicina em relação aos vasos sanguíneos no microambiente dos tumores EMT6 de camundongos tratados com R-954 (B) ou R715 (C). Utilizando parâmetros idênticos de amplificação do sinal e quantificação, observa-se que a intensidade de fluorescência de doxorubicina é mais elevada, ao longo de toda a curva, quando do tratamento tanto com R-954 quanto com R-715 comparando-se ao controle nos tumores EMT6, como mostra o gráfico D. Em todos os grupos, a intensidade de doxorubicina tende a ser mais elevada próximo aos vasos sanguíneos e diminui a medida que aumenta a distância dos mesmos, como esperado, porém essa redução é significativamente menos drástica no tratamento com R-715 quando comparado ao tratamento com R-954.



**Figura 39. Distribuição de doxorubicina em relação aos vasos sanguíneos em tumores EMT6 (sarcoma mamário) tratados com os antagonistas de BKRI R-954 ou R-715 2h antes da injeção de doxorubicina. A, B e C – Imagens compostas representativas mostrando a distribuição de doxorubicina (azul) em relação aos vasos sanguíneos marcados com anticorpo anti-CD31/Cy3 (vermelho) em secções de tumores EMT6 de camundongos tratados com PBS, como controle (A), R-954 (B) ou R-715 (C). Barra = 100μm. D - O gráfico mostra os valores das médias de intensidade de fluorescência de doxorubicina em função da distância dos vasos sanguíneos mais próximos (■, controle; ●, R-954; ▼, R-715). Os pontos representam a média de X tumores analisados em 3 diferentes cortes. Teste estatístico Kruskal-Wallis seguido do múltiplo teste de Dunn (\* p<0,001).**