

CRISTINA MARIA DE SOUZA

**EFEITOS DA PROTEÍNA RECOMBINANTE K<sub>int</sub>3-4 DO PLASMINOGÊNIO  
HUMANO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO TUMOR DE EHRlich**

Belo Horizonte  
Fevereiro de 2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG**  
**FACULDADE DE MEDICINA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**EFEITOS DA PROTEÍNA RECOMBINANTE Kint3-4 DO PLASMINOGÊNIO**  
**HUMANO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO TUMOR DE EHRlich**

Belo Horizonte  
Fevereiro de 2009

CRISTINA MARIA DE SOUZA

**EFEITOS DA PROTEÍNA RECOMBINANTE Kint3-4 DO PLASMINOGÊNIO  
HUMANO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO TUMOR DE EHRLICH**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Patologia.

**Área de Concentração:** Patologia Geral

**Orientador:** Prof. Geovanni Dantas Cassali

**Co-Orientador:** Prof. Jorge Luiz Pesquero

Belo Horizonte

2009

**Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Comparada e Laboratório de Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, com apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.**

## **DEDICATÓRIA**

A minha família:

Pai, Mãe, Marcelo e Simone, companheiros de todos os momentos.

Ao meu amor:

Janio, que durante este tempo sempre foi presente e compreensivo.

Ao meu grande amigo:

Enio Ferreira, que sempre acreditou em mim.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por iluminar o meu caminho e por estar tão perto em todos os momentos da vida.

Aos meus pais, pelo amor que tanto me conforta...

Ao Janio, pelo carinho, incentivo e paciência.

Ao professor Geovanni, pela oportunidade, confiança e pelos ensinamentos valiosos que me acompanharão durante toda a vida...

Ao professor Jorge Pesquero pela atenção, sugestões e colaboração nos experimentos.

À professora Mônica Ferreira pela amizade, experiência e ajuda sempre que solicitada.

Ao Enio... meu primeiro professor de Patologia. Amigo e companheiro... Obrigada por tudo!

Aos professores do Departamento de Patologia Geral pelos ensinamentos e convívio.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Comparada que participaram comigo de todos os momentos durante este trabalho.

Aos amigos que sempre torceram pela realização deste trabalho.

À CAPES, CNPQ e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

## Sumário

	Pag
1. – Introdução .....	15
1.1 - Proteína Recombinante Kint3-4 do Plasminogênio Humano.....	15
1.2 - Angiogênese e desenvolvimento tumoral.....	17
1.3 - Tumor Experimental.....	19
1.4 – Hipótese.....	20
2. – Objetivos .....	21
3. – Material e Métodos .....	22
3.1 - Construção gênica, expressão e purificação da Proteína Recombinante Kint3-4 do Plasminogênio Humano.....	22
3.2 – Animais.....	23
3.3 - Tumor Experimental de Ehrlich.....	24
3.3.1 - Preparo e inoculação das células tumorais.....	24
3.3.2 – Acompanhamento do crescimento tumoral.....	26
3.4 – Estudo histopatológico.....	26
3.5 – Estudo imuno-histoquímico.....	27
4.– Resultados .....	28
4.1 - Consumo de água, ração e acompanhamento do peso dos animais.....	28
4.2 - Crescimento do tumor de Ehrlich sólido.....	30
4.3 - Histomorfometria do tumor de Ehrlich sólido.....	33
4.4 – Avaliação imuno-histoquímica.....	35
4.5 – Metástase do tumor de Ehrlich sólido.....	38
5. – Discussão .....	41
6. – Conclusão.....	45
7. – Referências .....	46
8. – Anexos.....	52

## Lista de Tabelas e Gráficos

	Pag
<b>Tabela 1.:</b> Média e desvio padrão do consumo individual de água durante o período de crescimento tumoral nos três períodos experimentais.....	29
<b>Tabela 2.:</b> Média e desvio padrão do consumo individual de ração durante o período de crescimento tumoral nos três períodos experimentais.....	29
<b>Tabela 3.:</b> Média e desvio padrão do peso dos animais entre o início e o fim do período experimental, nos três períodos experimentais.....	29
<b>Tabela 4.:</b> Protocolo 1 (0-4° dia): média e desvio padrão das medidas do crescimento (mm) da pata com o tumor de Ehrlich sólido antes da inoculação tumoral (dia 0) ao dia do sacrifício dos animais (dia 06) nos dois grupos estudados.....	30
<b>Gráfico 1.:</b> Protocolo 1 (0-4° dia): curva de crescimento (mm) da pata com tumor de Ehrlich sólido antes da inoculação tumoral (dia 0) ao dia do sacrifício dos animais (dia 6) nos dois grupos estudados (*= $p < 0,05$ ).....	30
<b>Tabela 5.:</b> Protocolo 2 (0-10° dia): média e desvio padrão das medidas do crescimento (mm) da pata com o tumor de Ehrlich sólido antes da inoculação tumoral (dia 0) ao dia do sacrifício dos animais (dia 12) nos dois grupos estudados.....	31
<b>Gráfico 2.:</b> Protocolo 2 (0-10° dia): curva de crescimento (mm) da pata com tumor de Ehrlich sólido antes da inoculação tumoral (dia 0) ao dia do sacrifício dos animais (dia 12) nos diferentes grupos estudados (*= $p < 0,05$ ).....	31
<b>Tabela 6.:</b> Protocolo 3 (12-16° dia): média e desvio padrão das medidas do crescimento (mm) da pata com o tumor de Ehrlich sólido antes da inoculação tumoral (dia 0) ao dia do sacrifício dos animais (dia 18) nos dois grupos estudados.....	32
<b>Gráfico 3.:</b> Protocolo 3 (12-16° dia): curva de crescimento (mm) da pata com tumor de Ehrlich sólido antes da inoculação tumoral (dia 0) ao dia do sacrifício dos animais (dia 18) nos dois grupos estudados.....	32
<b>Tabela 7.:</b> Protocolo 1: média e desvio padrão das variáveis morfométricas do tumor de Ehrlich sólido nos dois grupos estudados.....	34
<b>Tabela 8.:</b> Protocolo 2: média e desvio padrão das variáveis morfométricas do tumor de Ehrlich sólido nos dois grupos estudados.....	34
<b>Tabela 9.:</b> Protocolo 3: média e desvio padrão das variáveis morfométricas do tumor de Ehrlich sólido nos dois grupos estudados.....	35

<b>Tabela 10.:</b> Média e desvio padrão do número de células positivas para o anticorpo CDC47 em 500 células contadas, nos três protocolos experimentais.....	38
<b>Tabela 11.:</b> Média e desvio padrão da densidade de microvasos expressa pelo marcador CD31 nos três protocolos experimentais.....	38
<b>Tabela 12.:</b> Protocolo 1: frequência relativa de metástases do tumor de Ehrlich sólido nos órgãos torácicos e abdominais e nos linfonodos poplíteos esquerdo e inguinais nos diferentes grupos estudados.....	39
<b>Tabela 13.:</b> Protocolo 2: frequência relativa de metástases do tumor de Ehrlich sólido nos órgãos torácicos e abdominais e nos linfonodos poplíteo esquerdo e inguinais nos diferentes grupos estudados.....	39
<b>Tabela 14.:</b> Protocolo 3: frequência relativa de metástases do tumor de Ehrlich sólido nos órgãos torácicos e abdominais e nos linfonodos poplíteo esquerdo e inguinais nos diferentes grupos estudados.....	39

## Lista de Figuras

	Pag
<b>Figura 1.</b> Estrutura proposta para o plasminogênio apresentando as regiões denominadas <i>Kringles</i> .....	16
<b>Figura 2.</b> Camundongo fêmea, tumor de Ehrlich sólido. Reação de imuno-histoquímica para a proteína CDC47/MCM-7 revelada ao DAB, 400×. 2a) Protocolo 1 (0-4° dia) animal controle; 2b) Protocolo 1, animal tratado; 2c) Protocolo 2 (0-10° dia) animal controle; 2d) Protocolo 2, animal tratado; 2e) Protocolo 3 (12-16° dia) animal controle; 2f) Protocolo 3, animal tratado. Imuno-marcação nuclear, onde pode ser observado uma menor porcentagem de células positivas em ambos os grupos tratados.....	36
<b>Figura 3.</b> Camundongo fêmea, tumor de Ehrlich sólido. Reação de imuno-histoquímica para a proteína CD31/ TLD-3A12 revelada ao DAB, 400×. 3a) Protocolo 1(0-4° dia) animal controle; 3b) Protocolo 1, animal tratado; 3c) Protocolo 2 (0-10° dia) animal controle; 3d) Protocolo 2, animal tratado; 3e) Protocolo 3 (12-16° dia) animal controle; 3f) Protocolo 3, animal tratado. Imuno-marcação citoplasmática, onde pode ser observado uma menor porcentagem de células positivas em ambos os grupos tratados.....	37
<b>Figura 4.</b> Camundongo fêmea, linfonodo poplíteo esquerdo, HE. Protocolo 1(0-4° dia), animal tratado 4a) 200x e 4b) 600x; Protocolo 2 (0-10° dia), animal tratado, 4c) 200x e 4d)600x ; Protocolo 3 (12-16° dia), animal tratado, 4e) 200x e 4f)600x. Formações de agrupamentos sólidos de células neoplásicas infiltradas na região subcapsular e formando grandes massas no interior do tecido linfóide.....	40

## Lista de Anexos

	Pag
<b>Anexo 1:</b> Resultado da análise bromatológica da ração comercial, segundo o fabricante, consumida pelos camundongos fêmeas durante o período experimental.....	52
<b>Anexo 2:</b> Composição mineral e vitamínica por quilo da ração comercial, segundo o fabricante, consumida pelos camundongos fêmeas durante o período experimental.....	52
<b>Anexo 3:</b> Artigo completo submetido a publicação.....	53
<b>Anexo 4:</b> Produções científicas relacionada a dissertação.....	68
<b>Anexo 5:</b> Produções científicas não relacionada à dissertação.....	69

## Lista de Abreviaturas

<b>FGF:</b> fator de crescimento de fibroblasto
<b>VEGF:</b> fator de crescimento endotelial vascular
<b>PDGF:</b> fator de crescimento derivado de fibroblasto
<b>HGF:</b> fator de crescimento de hepatócitos
<b>IGF-1:</b> fator de crescimento insulina-símile
<b>TGF-<math>\beta</math>:</b> fator de crescimento de transformação beta
<b>IL-8:</b> interleucina oito
<b>TGF-<math>\alpha</math>:</b> fator de crescimento de transformação alfa
<b>IL-4:</b> interleucina quatro
<b>PF-4:</b> fator ativador de plaquetas quatro
<b>DAB:</b> diaminobenzidina
<b>HE:</b> hematoxilina e eosina
<b>IHQ:</b> imuno-histoquímica
<b>MVC:</b> contagem microvascular
<b>MEC:</b> matriz extracelular

## RESUMO

A Proteína Kint 3-4, originária de uma recombinação genética do segmento K1-3 e K1-4 do plasminogênio humano, é reconhecida por sua potencialidade antiangiogênica e anti-inflamatória. O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da Proteína Kint3-4 no desenvolvimento neoplásico em camundongos Swiss previamente inoculados com células neoplásicas do tumor de Ehrlich. Foram avaliadas três diferentes modalidades de tratamento, no início, na progressão e após a estabilização do crescimento do tumor. Foram avaliados o crescimento tumoral, suas características histomorfológicas e imuno-histoquímicas para CDC47 (marcador de proliferação celular) e CD31 (marcador de vasos sanguíneos). Os animais tratados com a proteína Kint3-4, no início e durante a progressão neoplásica, apresentaram menor crescimento tumoral, com menores áreas de inflamação e neoplasia na avaliação histológica. Em todos os protocolos estabelecidos foram observados menor índice de proliferação das células neoplásicas e menor densidade de microvasos nos animais tratados com a proteína Kint3-4. O efeito da proteína recombinante Kint3-4 no controle da angiogênese tumoral e da proliferação das células neoplásicas, bem como a elucidação dos mecanismos moleculares associados abrem perspectivas de sua utilização na clínica como terapêutica antitumoral.

Palavras-chaves: angiogênese, proliferação celular, angiostatina, neoplasias.

## **ABSTRACT**

Kint3-4 protein, originated from a genetic recombination of K1-3 and K1-4 human plasminogen segments, is recognized for its antiangiogenic and anti-inflammation potentiality. This study aims to evaluate the effect of Kint3-4 protein in tumor development in Swiss mice previously inoculated with Ehrlich tumor cells. Three different protocols were evaluated at the beginning, progression and stabilization of tumor growth. We evaluated tumor growth, histomorphological and immunohistochemical characteristics for CDC47 (cellular proliferation marker) and CD31 (blood vessel marker). Animals treated with Kint3-4 protein at the beginning and during neoplastic progression, showed lower tumor growth, with smaller inflammation and tumor areas by histological evaluation. In all established protocols, lower rate of tumor cell proliferation and lower microvessel density was observed in animals treated with Kint3-4 protein. The participation of Kint3-4 recombinant protein in controlling tumor angiogenesis and malignant cell proliferation, as well as elucidation of molecular mechanisms of Kint3-4 protein would open prospects for its use in clinical and antiangiogenic therapy.

Keywords: angiogenesis, cell proliferation, angiostatin, neoplasm