



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Laila Ribeiro Fernandes

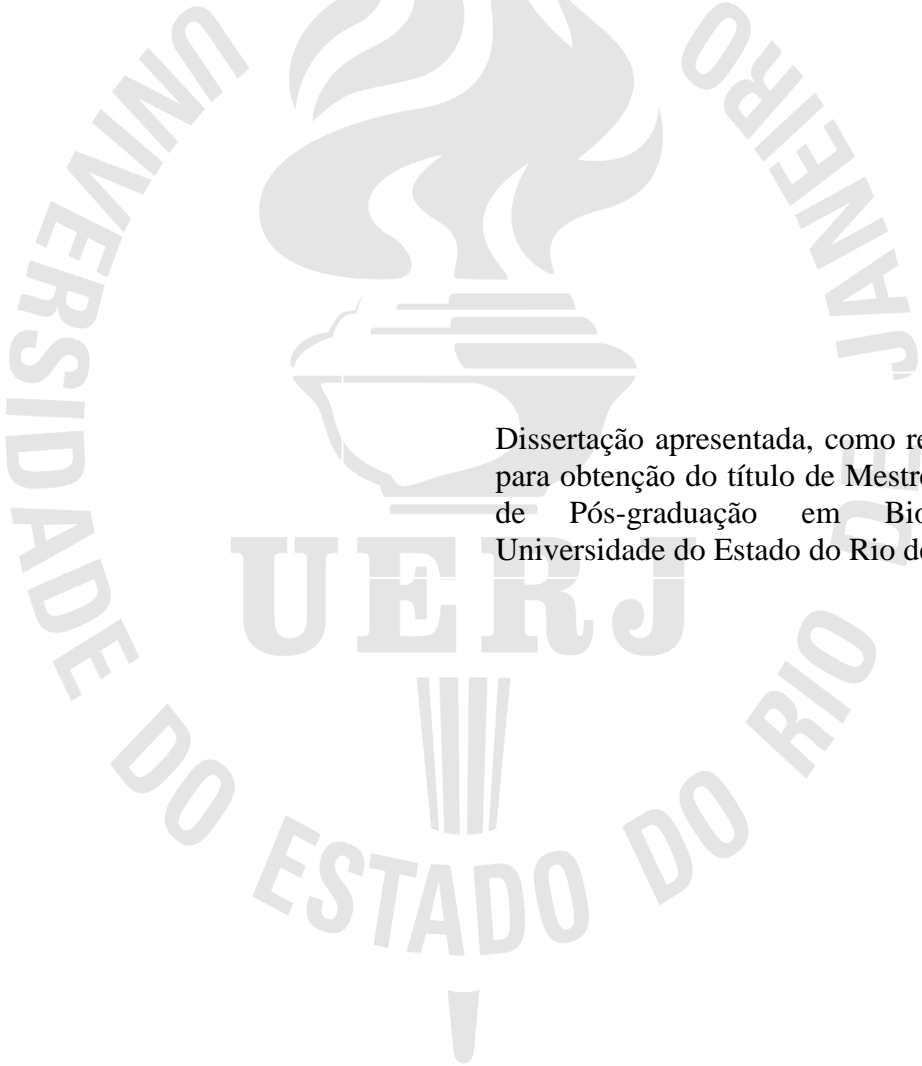
Estudo da adesão, sobrevivência e tubulogênese endotelial em modelo de células de glioma silenciadas para a expressão de Tenascina-C

Rio de Janeiro

2013

Laila Ribeiro Fernandes

**Estudo da adesão, sobrevivência e tubulogênese endotelial em modelo de células de glioma
silenciadas para a expressão de Tenascina-C**



Dissertação apresentada, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre, ao Programa
de Pós-graduação em Biociências, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Verônica Maria Morandi da Silva

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F363 Fernandes, Laila Ribeiro.

Estudo da adesão, sobrevivência e tubulogênese endotelial em modelo de células de glioma silenciadas para a expressão de Tenascina-C / Laila Ribeiro Fernandes. – 2013.
80 f.

Orientadora: Verônica Maria Morandi da Silva.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Endotélio - Teses. 2. Neovascularização - Teses. 3. Tenascina. 4. Células - Adesão - Teses. 5. Matriz Extracelular - Teses. 6. Glioma. 7. Anoikis. I. Silva, Verônica Morandi da. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 611.1:616.018.74

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Laila Ribeiro Fernandes

Estudo da adesão, sobrevivência e tubulogênese endotelial em modelo de células de glioma silenciadas para a expressão de Tenascina-C

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 14 de agosto de 2013.

Orientadora: Prof.^a Dra. Verônica Maria Morandi da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Prescilla Emy Nagao Ferreira
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Luiz Eurico Nasciutti
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Fabio de Almeida Mendes
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a toda minha família, meu porto seguro e minha referência, em especial aos meus pais Luiz Gomes e Elisabeth e minha irmã Michelle.

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar por ser minha fortaleza, minha renovação de fé e esperança, e por sempre me abrigar na sombra de suas asas.

Aos meus pais, Luiz Gomes e Elisabeth, por todo o esforço, dedicação, compreensão, carinho e pelo amor incondicional, que me ajudaram a chegar até aqui. Obrigada por serem meu auxílio sempre presente, e por mais do que terem me ensinado a comemorar cada vitória alcançada, terem me ensinado a me levantar diante das derrotas e provações.

A minha irmã Michelle, por sempre ser a palavra amiga e o conselho pontual. Por ser minha eterna companheira. Obrigada por despertar a risada escondida nos momentos em que eu mais preciso, pelas brincadeiras e conversas, e por estimular o meu amadurecimento, me ajudando a descobrir novos sonhos e horizontes.

Aos meus primos Vitor e Pedro por sempre alegrarem meu dia e me ajudarem a perceber como a felicidade está em cada pequeno gesto de amor. Ao meu tio Bafica pelas palavras de incentivo e pelo direcionamento que muitas vezes me foi dado, e claro pelas risadas garantidas ao seu lado. A minha avó Norma e as tias Luzia, Maria e tia Patricia, pelas orientações de todos os tipos e pelo suporte que continuamente me concedem.

Ao meu namorado Thiago por ter compreendido a minha ausência quando necessária, pela paciência, por ser meu amigo e companheiro, por me ajudar a enfrentar cada novo desafio confiante de que o melhor está por vir. Por ter estado ao meu lado vivendo e me ajudando a superar cada obstáculo, e vivendo e comemorando cada conquista.

As amigas Anna Flávia, Rafaella, Fabiana, Patricia, Luísa e Jaqueline pelas palavras de ânimo, pelos momentos de diversão e pelos sorrisos, que adicionaram leveza e cor às contrariedades da vida.

A minha orientadora Prof.^a Dra. Verônica Morandi pela atenção, paciência e por todos os ensinamentos adquiridos, que ajudaram a direcionar os meus passos no ambiente acadêmico, possibilitando o meu crescimento profissional.

A Prof.^a Dra. Camila Figueiredo pelas sugestões e por todo o suporte recebido ao longo do mestrado.

Ao Dr. Edward Helal pela motivação de todos os dias, por ter me auxiliado em muitas etapas e por sempre me lembrar de uma das principais características de um pesquisador: a persistência.

Ao Prof. Dr. Rodolpho Albano pela revisão deste trabalho.

A Prof.^a Dra. Ana Rossini pelo auxílio com o PCR em tempo real.

A Adelaide imensamente pela ajuda essencial e constante ao longo do mestrado. Pela companhia nos feriados, ou até altas horas no laboratório e também por madrugar quando era necessário.

A Vivi pela sua disposição infinita de ajudar e por toda a ajuda recebida, pela sua capacidade de alegrar o ambiente com seu otimismo contagiante, pelas conversas e pelos aprendizados.

A Aline pela assistência na bancada e fora dela, pelas sugestões e contribuições ao trabalho, pelos comentários bem-humorados, que nos divertem, e também pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Antonio enormemente pelo apoio experimental e pelas palavras que muitas vezes foram precisas para muitos momentos.

A Fernanda pela sua prontidão em ajudar e por sua organização militar que sempre me auxiliavam.

A kelliMiccoci pela ajuda ainda na monografia com as técnicas que foram necessárias para dar continuidade a este trabalho.

A Dra. Tercia Alves pelo desenvolvimento inicial e pelas contribuições ao trabalho.

Ao Chico, a Andreza, a Marcella Tavares e ao Guilherme pelo apoio técnico.

Ao Marcos temperini pelas culturas de HUVEC e por todo o suporte e incentivo na realização dos experimentos.

A tia Mariléa pela ajuda com os materiais e pelos brigadeiros maravilhosos nas festas do departamento.

As vizinhas e vizinhos de laboratório: Ceíça, Gabi, Bia, Andreia, Pamela, Gilson, Evelin, Claudia e Angela pelo auxílio recebido.

Aos secretários Marcos Aurélio e Vitor pelo auxílio com as questões burocráticas e pelos momentos de descontração.

Ao apoio financeiro da FAPERJ, CAPES e CNPQ.

E a todos aqueles que colaboraram de forma direta ou indireta para que esta dissertação fosse desenvolvida. Muito Obrigada!

Por vezes sentimos que aquilo que
fazemos não é senão uma gota de água
no mar. Mas o mar seria menor se lhe
faltasse uma gota.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

FERNANDES, Laila Ribeiro. *Estudo da adesão, sobrevivência e tubulogênese endotelial em modelo de células de glioma silenciadas para a expressão de Tenascina-C*. 2013. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Recentemente, nosso grupo demonstrou que a matriz extracelular de astrocitomas promove a seleção de células endoteliais altamente proliferativas, porém com reduzida capacidade tubulogênica, além de determinar a morte de uma segunda sub-população endotelial, por desaderência ou *anoikis*. Estratégias de simulação dos teores de tenascina-C (TN-C) e fibronectina (FN) nas matrizes de astrocitomas, realizados com ambas as proteínas purificadas na forma de substratos definidos, sugeriram que o balanço TN-C:FN estava relacionado com os fenótipos endoteliais observados. No entanto, este procedimento não permitia abordar a participação de outros componentes da matriz tumoral nativa neste processo. Com objetivo de estudar a modulação do fenótipo angiogênico das células endoteliais por matrizes de astrocitoma, realizamos o silenciamento da expressão de TN-C na linhagem de astrocitoma U-373 MG. O silenciamento foi confirmado por *western blotting*, PCR em tempo real e ELISA, que permitiram concluir que, no período pós-transfecção (120h) necessário para se obter matrizes tumorais nativas para ensaios funcionais com células endoteliais, as células U-373 MG mantiveram-se silenciadas em índices superiores a 90%. A diminuição de TN-C nas matrizes tumorais resultou em um pequeno ($\cong 18\%$, em média), porém significativo aumento na taxa de adesão endotelial. HUVECs incubadas com a matriz secretada por células silenciadas apresentaram uma redução de $\cong 35\%$ do número de núcleos picnóticos, quando comparadas a HUVECs incubadas com a matriz de células U-373 MG (selvagens ou transfectadas com siRNA controle). O silenciamento da expressão da TN-C na matriz nas células U-373 MG restaurou ainda o defeito tubulogênico das células endoteliais, que passaram a apresentar formação de tubos comparável à obtida quando HUVECs foram incubadas com sua matriz autóloga, rica em FN. Tais resultados apoiam observações anteriores do grupo, que já sugeriam que a maior proporção de FN na matriz autóloga, comparada a matriz do astrocitoma, seria o fator principal para a seleção dos fenótipos angiogênicos observados, demonstrando mais uma vez a importância do balanço FN:TN-C na regulação de processos angiogênicos. Dados anteriores sugeriam ainda que a sub-população endotelial que morre por *anoikis* após contato prolongado (24 horas) com matrizes de astrocitomas corresponde a células que já haviam entrado na fase S do ciclo celular, no início da incubação. A fim de nos aprofundarmos sobre a participação do ciclo celular neste processo, a expressão da proteína p27, um inibidor de quinases dependentes de ciclinas (CKI), também foi analisada. HUVECs incubadas com a matriz de astrocitoma apresentaram um aumento de 2 a 3 vezes na expressão de p27, quando comparada com HUVECs provenientes de sua matriz autóloga. No entanto, células endoteliais incubadas com matriz secretada por células U-373 MG silenciadas apresentaram um nível de expressão de p27 comparável ao das HUVECs incubadas com matriz secretada por células selvagens, indicando que a expressão de TN-C não modula, ou não está diretamente correlacionada à expressão da proteína p27. Este resultado sugere que outros componentes da matriz tumoral devam estar envolvidos na modulação do ciclo celular endotelial.

Palavras-chave: Angiogênese. Tenascina-C. Tubulogênese. Adesão. *Anoikis*. Glioma

ABSTRACT

FERNANDES, Laila Ribeiro *Study of endothelial adhesion, survival and tubulogenesis in model of glioma cells silenced for Tenascin-c expression.* 2013.80 f. Dissertação de (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

We have previously shown that extracellular matrices secreted by high-grade astrocitoma promotes the selection of highly proliferative and tubulogenesis-defective endothelial cells, while also leading to the death, by *anoikis*, of another endothelial subpopulation. The use of defined adhesion substrata containing various levels of tenascin-C (TN-C) and fibronectin (FN) allowed us to confirm that the balance between TN-C and FN was a major cause of the selection of both endothelial phenotypes. However, this strategy did not allow us to address the potential role of other molecular components present in tumor matrices. In the present work, we studied the effect of a matrix produced by U-373 MG cells previously silenced for TN-C expression in endothelial cell adhesion, survival and tubulogenic differentiation, as compared to the matrix secreted by wild-type astrocitoma cells. U-373 MG cells silencing was confirmed by Western blotting, real time RT-PCR and ELISA, and cells remained silenced ($\geq 90\%$) throughout the 120 hours period necessary for generating immobilized native matrices required for endothelial cell function assays. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) adhesion to the extracellular matrix secreted by astrocitoma cells silenced for TN-C expression was significantly increased by $\cong 18\%$, as compared to wild-type tumor matrix. The number of HUVECs exhibiting picnotic nuclei – a hallmark of advanced apoptosis – has also been significantly decreased by $\cong 35\%$, when endothelial cells were allowed to incubate with TN-C-depleted tumor matrix, as compared to the wild-type tumor matrix. Concerning angiogenic differentiation, endothelial cells incubated with the matrix produced by silenced U-373 cells were strongly attenuated for their tubulogenesis defect, as compared to HUVECs incubated with the TN-C-rich wild-type matrix. Thus, these data corroborated our previous observations that TN-C in astrocitoma matrices crucially interferes with endothelial cell differentiation. Besides adhesion, survival and tubulogenic differentiation, the responses of endothelial cells to astrocitomas matrices are also affected by cell cycle transitions. We have previously shown that endothelial cells undergoing *anoikis* had already transitioned through the S-phase of cell cycle at the moment of seeding. Thus, we decided to investigate the expression of p27 protein, an inhibitor of cyclin-dependent kinases (CKI) that has been already implicated in glioma angiogenesis. We found that HUVECs incubated with the matrix secreted by U-373 MG wild-type cells for 24 hours exhibited a 2 to 3-fold increase in p27 expression. In contrast to the other results discussed herein, these differences were not correlated with the expression of TN-C by U-373 MG cells, since the matrix produced by tumor cells silenced for TN-C did not alter the expression of p27 in endothelial cells. Overall, the present data suggest that, although TN-C in native tumor matrix does play a major role in endothelial cell angiogenic differentiation, other matrix components may act in concert with TN-C to modulate endothelial cell proliferation in tumor contexts.

Keywords: Angiogenesis. Tenascin-C. Tubulogenesis. Adhesion. *Anoikis*. Glioma

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Mecanismos de formação vascular.....	16
Figura 2 –	A hipótese da transição angiogênica.....	17
Figura 3 –	Comparação entre as características fenotípicas dos vasos sanguíneos normais e vasos sanguíneos tumorais.....	21
Figura 4 –	Funções exercidas pela matriz extracelular.....	23
Figura 5 –	Estágios de adesão celular e indução do estado intermediário de adesão por proteínas matricelulares.....	25
Figura 6 –	Representação da estrutura dos domínios da tenascina-C e da molécula de fibronectina.....	28
Figura 7 –	Aplicações do RNA de Interferência em sistemas de mamíferos.....	33
Figura 8 –	Esquema geral da estratégia experimental.....	46
Figura 9 –	Análise da expressão de TN-C por Western Blotting.....	48
Figura 10 –	Nível de expressão de mRNA para TN-C normalizado pelo nível de mRNA 18S.....	50
Figura 11 –	Detecção de TN-C por ELISA indireto.....	51
Figura 12 –	Adesão de células endoteliais sobre matrizes imobilizadas.....	53
Figura 13 –	Avaliação de núcleos endoteliais picnóticos após o contato com diferentes matrizes.....	54
Figura 14 –	Ensaio de diferenciação angiogênica <i>in vitro</i>	56
Figura 15 –	Análise da expressão da proteína p27 por Western blotting.....	57
Figura 16 –	Análise da expressão da proteína p27 em células endoteliais: efeito do silenciamento da TN-C.....	59
Figura A1 –	(Apêndice A) Nível de mRNA de TP53 nas células U-373 MG.....	78
Figura A2 –	(Apêndice B) Persistência do silenciamento da TN-C.....	79
Figura A3 –	(Apêndice C) Curva-Padrão de TN-C imobilizada em placas de poliestireno.....	80
Tabela 1 –	Classificação dos tumores astrocíticos segundo a organização mundial de saúde (OMS).....	30
Tabela 2 –	Sequências senso e anti-senso dos <i>primers</i> utilizados.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ l	Micro litro
BSA	Albumina sérica bovina
Cdk	Quinase dependente de ciclina
CKI	Inibidor de quinase dependente de ciclina
DAPI	4,6-diamino-2- fenilindol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM-F12 HAM	Meio de cultura para o crescimento da linhagemU-373 MG
dsRNA	Dupla-fita de RNA
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGTA	Ácido etileno glicol tetra-acético
EPC	Célula endotelial progenitora
FN	Fibronectina
GBM	Glioblastoma
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HIF-2 ^a	Fator de transcrição indutor de hipóxia 2-a
HUVEC	Célula endotelial de veia umbilical humana
M199	Meio de cultura para o crescimento das HUVECs
MEC	Matriz extracelular
mL	Mililitro
MTT	(3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazólio brometo)
Na ₃ VO ₄	Ortovanadato de sódio
NAF	Fluoreto de sódio
OPD	O-fenilenediamino
PBS	Salina tamponada com fosfato
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
RISC	Complexo de silenciamento induzido por rnaí
RNA	Ácido ribonucléico
<i>RNA18S5</i>	Gene da unidade ribossomal 18S5
RNAi	RNA de interferência

RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
siRNAs	Pequenos RNAs interferentes
SPARC	Proteína secretada, acídica e rica em cisteína
TBS	Salina tamponada com tris
<i>TNC</i>	Gene da TN-C
TN-C	Tenascina-C
TSP-1	Trombospondina-1
U373-MG	Linhagem de astrocitoma humano
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	METODOLOGIA	35
1.1	Cultivo celular	35
1.2	Transfecção com siRNA para TN-C	35
1.3	Ensaio indireto de imunoadsorção enzimática (ELISA) para detecção de TN-C secretada	36
1.4	Dosagem de proteína pelo método de Bradford	37
1.5	Extração de RNA	38
1.6	Quantificação do RNA	38
1.7	Síntese de cDNA	39
1.8	RT-PCR em tempo real	39
1.9	Ensaio de adesão celular sobre matriz	40
1.10	Ensaio de tubulogênese endotelial	42
1.11	Análise de proteínas por Eletroforese PAGE-SDS e <i>Western Blotting</i>	43
1.12	Quantificação da formação de núcleos picnóticos	44
1.13	Análise Estatística	45
2	RESULTADOS	47
3	DISCUSSÃO	60
	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	68
	REFERÊNCIAS	70
	APÊNDICE A - Nível de mRNA de TP53 nas células U-373 MG	78
	APÊNDICE B – Persistência do silenciamento da TN-C	79
	APÊNDICE C – Curva Padrão de TN-C imobilizada em placas de poliestireno	80

INTRODUÇÃO

O Endotélio

O endotélio constitui a camada celular mais interna dos vasos sanguíneos e linfáticos (Aird, 2007), que se distribui espacialmente (Aird, 2009), com uma área superficial estimada entre 4000 e 7000m² (Aird, 2004) e por sua natureza dinâmica (Hunting *et al*, 2005), capaz de sentir e responder ao seu microambiente (Aird, 2007). É de origem mesodérmica, surgindo a partir da diferenciação de hemangioblastos em angioblastos, e dos últimos em *células endoteliais* (Aird, 2007; Caolo *et al*, 2012).

As células endoteliais desempenham importantes papéis na regulação de muitas funções fisiológicas, entre elas estão o controle do tônus vasomotor, hemostasia, transporte de células sanguíneas e nutrientes, muitas vezes através de sistemas de transporte transcelulares específicos (Dejana, 2010), angiogênese, permeabilidade, função de barreira e resposta imune adaptativa e inata (Aird, 2007; Yano *et al*, 2007).

Morfologicamente, o endotélio no organismo adulto pode ser classificado em diferentes fenótipos de acordo com o seu conteúdo estrutural (Atkins *et al*, 2011) e a sua permeabilidade vascular (Risau, 1995) são eles: contínuo, o qual é subdividido em fenestrado e não fenestrado, e descontínuo ou sinusoidal (Atkins *et al*, 2011). Além disso, ele pode ser dividido em endotélio arterial ou venoso, com diferenças adicionais entre pequenos e grandes vasos (Dyer & Patterson, 2010). As artérias são recobertas por células de músculo liso, o que possibilita a sua contratilidade e a regulação do tônus vasomotor (Carmeliet, 2005; Aird, 2008).

Com relação aos marcadores endoteliais, existem poucos ou nenhum que sejam efetivamente específicos e uniformemente expressos no endotélio, considerando a sua elevada heterogeneidade (Aird, 2008). No entanto, entre as moléculas constitutivamente expressas podemos citar: PECAM-1 ou CD31, porém também é expressa em macrófagos (Aird, 2007), plaquetas e megacariócitos (Garlanda & Dejana, 1997), a trombomodulina, que também é encontrada em queratinócitos, trofoblastos e leucócitos, a VE-caderina, igualmente identificada em trofoblastos e células-tronco fetais (Aird, 2007) e os corpos de Weibel-Palade (Garlanda & Dejana, 1997), entre alguns outros. Um fato interessante observado é que as maiores dos marcadores estão presentes tanto em células endoteliais quanto em precursores

hematopoiéticos ou células sanguíneas maduras, o que reforça a idéia de um precursor embrionário comum (Garlanda & Dejana, 1997).

Considerando a função ancestral dos vasos de fornecer oxigênio, eles são equipados com sensores de O₂ e a formação de uma nova rede vascular também está sob o controle desses sensores (Carmeliet & Jain, 2011). Como exemplo podemos citar a prolil-hidroxilase domínio 2 (PHD2) e o fator indutor de hipóxia 2- alfa (HIF-2a), os quais permitem que o formato dos vasos seja ajustado para otimizar o fluxo sanguíneo (Carmeliet & Jain, 2011).

As células endoteliais possuem longas meias-vidas, sendo o tempo de renovação do endotélio medido em anos (Engerman *et al*, 1967). No estado basal 99% das células endoteliais encontram-se quiescentes (Hunting *et al*, 2005).

Os fenótipos endoteliais variam em estrutura e função, no tempo e espaço, e de acordo com o estado fisiológico ou patológico, o que traduz a sua heterogeneidade fenotípica (Aird, 2012; Triggle *et al*, 2012). A capacidade da célula endotelial de se modificar constantemente para atender as necessidades do tecido local, reflete a sua plasticidade (Atkins *et al*, 2011), se adaptando aos diferentes microambientes (Aird, 2012) e se diferenciando de acordo com as interações estabelecidas com eles, através de fatores solúveis, adesão célula-célula, síntese e organização das proteínas de matriz (Garlanda & Dejana, 1997).

Angiogênese

No desenvolvimento embrionário, a vasculogênese possibilita a formação *de novo* de células endoteliais a partir da diferenciação de células precursoras mesodermiais, as quais se diferenciam primeiramente em hemangioblastos, e em seguida em angioblastos (Heinke *et al*, 2012). Esses por sua vez se diferenciam em células endoteliais formando um plexo vascular primitivo (Heinke *et al*, 2012).

A partir do plexo vascular primitivo, novos vasos são formados e remodelados através de um processo denominado *sprouting* angiogênico ou angiogênese, o qual caracteriza o crescimento de novos vasos a partir de vasos pré-existentes (Carmeliet, 2005).

A angiogênese em um indivíduo adulto encontra-se ativa apenas em situações específicas, relacionada a tecidos e órgãos específicos, como os ovários, endométrio, placenta, e útero, durante o ciclo reprodutivo feminino e durante reparo tecidual, ocorrendo sob controle

fisiológico (Furuya *et al*, 2005; Spiegelaere *et al*, 2012). Com exceção desses, os demais órgãos apresentam uma reduzida taxa de renovação das células endoteliais, onde 99% encontram-se quiescentes sob condições fisiológicas, mantendo um estado anticoagulante, anti-trombótico e anti-inflamatório (Hunting *et al*, 2005).

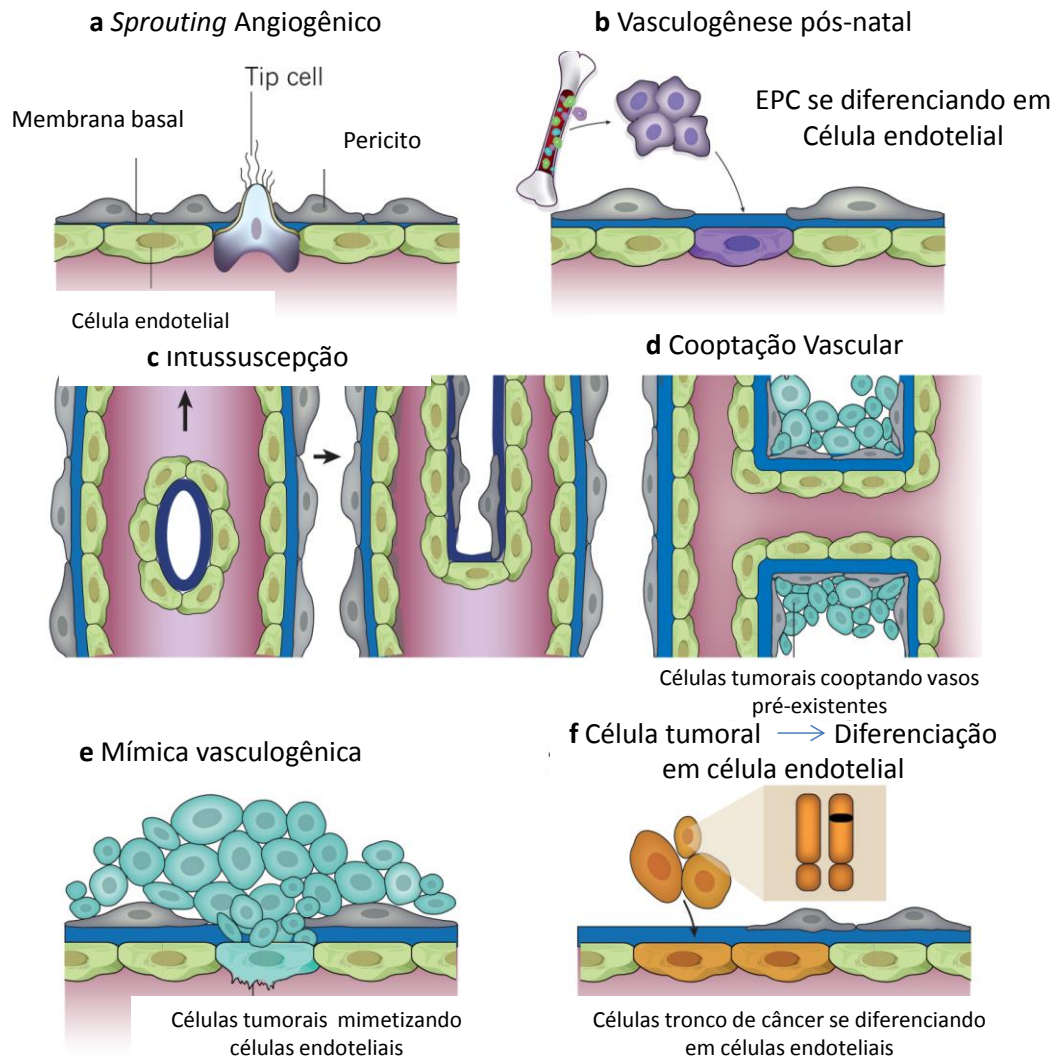
Mediante injúria um estado pró-coagulante e pró-inflamatório é adquirido, possibilitando o surgimento da angiogênese patológica, como observado nas situações de retinopatia diabética, artrite reumatoide, diabetes, doenças autoimunes, câncer, entre outras (Carmeliet, 2005; Furuya *et al*, 2005).

A hipótese de que o crescimento do tumor é dependente de angiogênese foi primeiramente proposta em 1971 por Judah Folkman (Folkman, 1971). No entanto, além da angiogênese (a) outras formas de formação e/ou expansão dos vasos sanguíneos existem nos tecidos, entre elas podemos citar: (b) vasculogênese pós-natal; (c) intussuscepção; (d) cooptação vascular; (e) mimetismo vascular; (f) transdiferenciação (revisto por Carmeliet & Jain, 2011; Hardee & Zagzag, 2012). A **Figura 1** ilustra todos os modos de vascularização sugeridos atualmente pela literatura. A progressão tumoral há algum tempo têm sido relacionada à transição da massa tumoral para uma fase dita angiogênica (*angiogenic switch*), o qual é finamente regulado por um balanço entre moléculas pró e anti-angiogênicas, que determina a resposta angiogênica final (Hillen & Griffioen, 2007).

A ativação do *switch* angiogênico possibilita a transição de um tumor dormente avascularizado para um tumor vascularizado e crescente (Baeriswyl & Christofori, 2009). Tal balanço encontra-se ilustrado na **Figura 2**.

O brotamento (*sprouting*) angiogênico é um processo que envolve distintas etapas desde ativação das células endoteliais por fatores pró-angiogênicos até a efetiva formação de um vaso maduro. A ativação inicial das células endoteliais ocorre através da ligação de diferentes fatores de crescimento aos seus receptores específicos. Tal ligação gera uma primeira resposta de degradação da matriz extracelular (MEC) e membrana basal, adjacentes às células endoteliais, por proteases. Dessa forma, a migração e a proliferação através da MEC são facilitadas. A polarização característica da célula endotelial permite a criação de um lúmen com a formação de um vaso imaturo. Por fim, a estabilização e maturação do vaso ocorrem através do recrutamento de células murais e pela síntese de uma nova membrana basal e MEC (Furuya *et al*, 2005; Hillen & Griffioen, 2007).

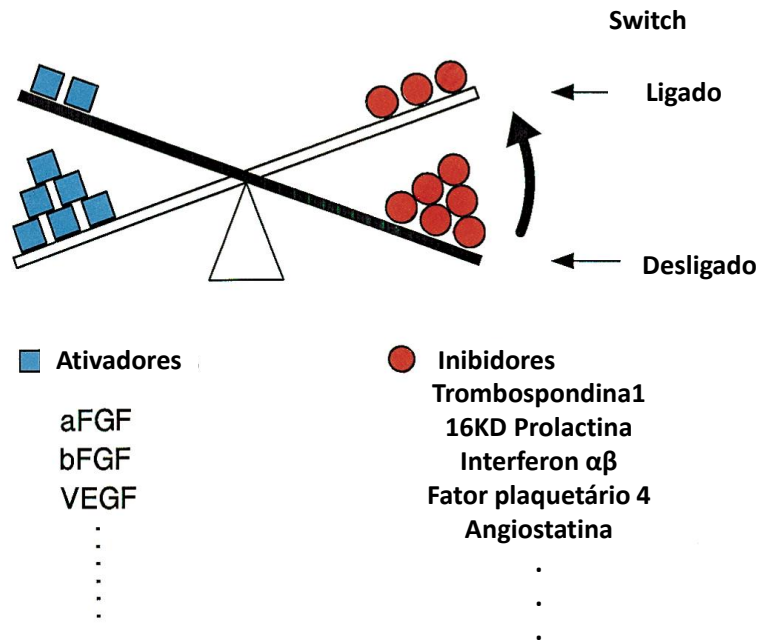
Figura 1- Mecanismos de formação vascular.



Legenda: Ilustração de todos os modelos de vascularização sugeridos pela literatura atual (a) sprouting angiogênico ou angiogênese; (b) vasculogênese pós-natal; (c) intussuscepção; (d) cooptação vascular; (e) mimetismo vascular, (f) transdiferenciação.

Fonte: Adaptado de Carmeliet & Jain, 2011.

Figura 2- A hipótese da transição angiogênica.



Legenda: O balanço entre fatores pró e anti-angiogênicos determina a resposta angiogênica final

Fonte: Adaptado de Hanahan & Folkman, 1996.

Pelo menos três sub-tipos endoteliais puderam ser definidos no processo que culmina com a formação de um ramo vascular funcional – ou seja, com lúmen capaz de carrear sangue – durante o processo de angiogênese: além das células endoteliais líderes (*tip cells*), que com seus abundantes filopódios frontais “monitoram” e respondem aos estímulos angiogênicos, conferindo direcionalidade ao processo, são identificáveis as células da haste (*stalk cells*) e as células da falange (*phalanx cells*) (De Smet et al, 2009). As últimas constituem a camada de células endoteliais mais quiescentes, compõem uma monocamada em forma de cone e recebem esta denominação pela semelhança com as falanges, antiga formação grega de soldados. As células da falange são recobertas por pericitos e estão fortemente associadas umas às outras por meio de junções adesivas (De Smet et al, 2009).

A partir da ativação das células endoteliais pelo VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), para impedir que todas as células se direcionem em massa ao estímulo recebido, elas começam a competir entre si para se tornarem as células líderes do processo de brotamento (De Smet et al, 2009). Essas atuam escaneando o ambiente através de seus inúmeros filopódios e reagem ao gradiente de VEGF (Caolo et al, 2012), guiando a formação do novo ramo em direção ao estímulo. A ligação do VEGF ao seu receptor VEGFR2 induz a expressão do ligante notch *delta-like 4* (DLL4) nas *tip cells*. E a ligação de DLL4 nas células vizinhas, ativa a via Notch, o que impede a formação de filopódios e a migração das células endoteliais (Caolo et al, 2012), caracterizando-as como células da haste, além de levar a diminuição da expressão de VEGFR2 e aumento da expressão de VEGFR1. As células da haste são responsáveis pelo alongamento do tubo vascular por meio de uma alta taxa de proliferação, além de iniciarem a formação do lúmen e contribuírem para a formação da membrana basal dos capilares (De Smet et al, 2009). Dessa forma, a competição pela posição de liderança está relacionada com o balanço entre a expressão de VEGFR2 e VEGFR1 (Carmeliet & Jain, 2011), e o destino de uma célula endotelial é especificado pela sinalização DLL-4/Notch, resultando em uma elevada atividade nas células da haste e reduzida nas células líderes (Caolo et al, 2012).

A vasculogênese pós-natal ocorre através do recrutamento de células derivadas da medula óssea e/ou de células progenitoras endoteliais (EPCs) (Wojakowski et al, 2012). Após o recrutamento, essas células se incorporam a parede vascular, passando por um processo de diferenciação, migração e/ou proliferação, possibilitando a formação *de novo* de novos vasos, o que justifica a denominação de vasculogênese pós-natal (Masuda & Asahara, 2003). Em condições normais, o número de EPCs circulantes é extremamente reduzido, no entanto

mediante um estímulo de hipóxia ou aumento da expressão de VEGF, elas podem ser mobilizadas da medula óssea (Furuya *et al*, 2005; Wojakowski *et al*, 2012).

O crescimento vascular intussusceptivo, ocorre quando células endoteliais, de paredes opostas, migram umas em direção as outras, formando um pilar tecidual transvascular no lúmen dos vasos pré-existentes, com reorganização das junções interendoteliais e perfuração central do pilar (Hillen & Griffioen, 2007; Spiegelmaere *et al*, 2012). Comparativamente com a angiogênese por *sprouting*, a intussuscepção forma vasos de forma mais rápida e mais econômica, uma vez que não requer a proliferação das células endoteliais, mas de um aumento do seu volume seguido pela diminuição da sua espessura, envolvendo apenas migração das células e remodelamento vascular (Auguste *et al*, 2005; Hillen & Griffioen, 2007).

A cooptação vascular foi descrita em 1999 por Holash e colaboradores como um processo caracterizado pela capacidade de alguns tipos de células tumorais cercarem e cooptarem os vasos sanguíneos adjacentes, durante o estágio inicial de desenvolvimento do tumor, impossibilitando a formação de novas ramificações, com regressão dos vasos nativos (Holash *et al*, 1999; Auguste *et al*, 2005). A redução do número de vasos e o consequente aumento da taxa de hipóxia tecidual resultam no aumento da produção de VEGF pelas células tumorais, culminado com uma potente resposta angiogênica na periferia do tumor. Em contrapartida, no centro tumoral as células encontram-se organizadas em núcleos pseudopaliçádicos, característica muito observada em gliomas (Holash *et al*, 1999; Brat & Meir, 2004).

O processo de mimetismo vascular permite que os tumores adquiram um padrão de microcirculação altamente organizado, de forma independente de angiogênese, onde as células tumorais agressivas originam canais revestidos por células não endoteliais e delimitados por uma matriz extracelular (Bissell, 1999; Folberg *et al*, 2000). Dessa forma, o tumor cria a sua própria rede de canais vasculares (Furuya *et al*, 2005).

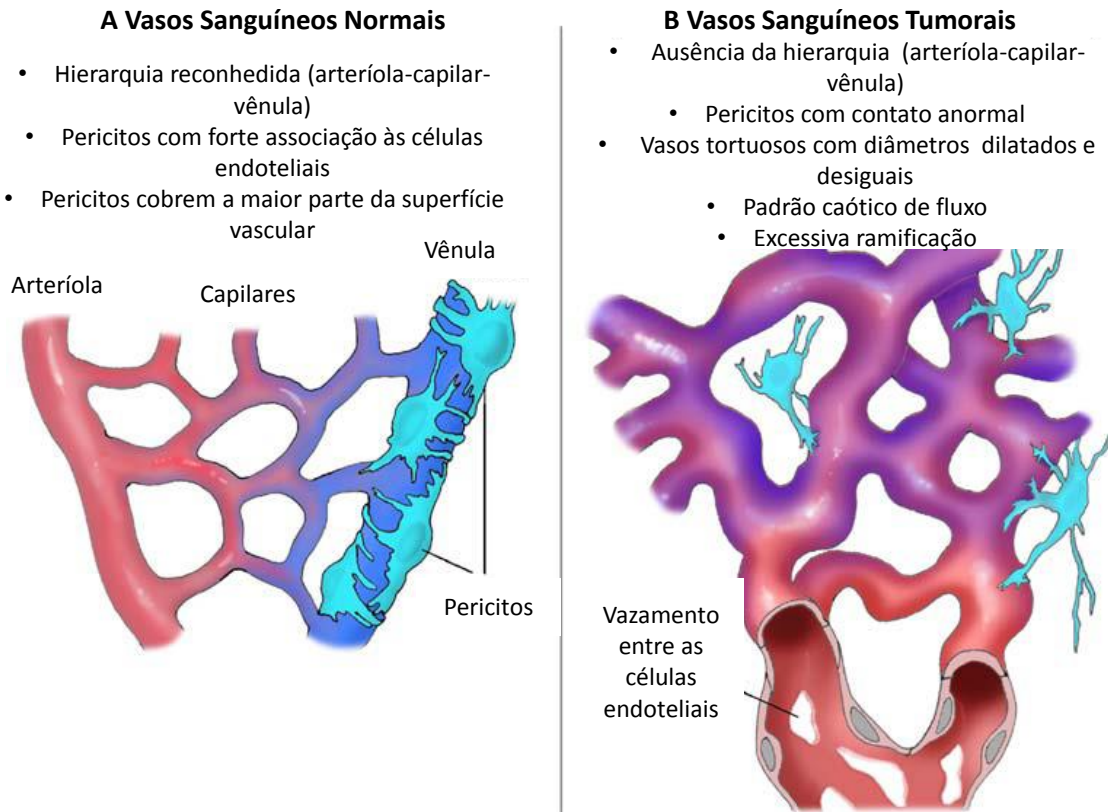
As células endoteliais associadas ao tumor não apenas interagem, mas também apresentam anormalidades genéticas similares às células tumorais, o que sugere uma possível associação entre a origem de ambos os tipos celulares (Ping & Bian, 2011). Já foi demonstrado por alguns estudos que essa origem comum pode estar associada com a presença de células-tronco de câncer, as quais poderiam gerar ou se transdiferenciar em células endoteliais para neovascularização (Ping & Bian, 2011). A transdiferenciação é um processo que já foi descrito em glioblastomas (Potente *et al*, 2011; Soda *et al*, 2011) e possivelmente relacionado com a resistência desse tumor as terapias anti-tumorais convencionais (Zhao *et al*, 2011; Lima *et al*, 2012).

De forma geral, a vasculatura tumoral é diferente da vasculatura normal tanto em termos estruturais quanto em relação ao comportamento biológico (Furuya *et al*, 2005). No tecido tumoral observa-se uma redução ou até mesmo ausência das interações pericito-célula endotelial, o que resulta na presença de vasos com elevada permeabilidade, diâmetros anormais e com hemorragias (Baluk *et al*, 2005; Furuya *et al*, 2005). Além disso, também é possível identificar ramificações irregulares e excessivas (Aird, 2009), o que sugere o possível desligamento de mecanismos de orientação da extensão dos vasos sanguíneos do tumor (Auguste *et al*, 2005), assim como a elevada desorganização da vasculatura, onde a hierarquia convencional arteríola-capilar-vênula não é identificada (Baluk *et al*, 2005), com formação de shunts arteriovenosos - vasos dilatados e tortuosos e padrão de fluxo caótico - possibilitando assim a formação de regiões hipóxicas e acídicas dentro do tumor (Carmeliet & Jain, 2000; Furuya *et al*, 2005; Aird, 2009). As células endoteliais também apresentam diferenças estruturais além dos vasos propriamente ditos, como alterações no seu formato, crescimento irregular, crescendo umas sobre as outras e se projetando para dentro do lúmen vascular, característica que mais uma vez colabora com o aumento da permeabilidade (Carmeliet & Jain, 2000). Tais diferenças estão ilustradas na **Figura 3**.

Microambiente tumoral

A hipótese da semente e do solo sugerida por Stephen Paget, em 1889, já havia conferido a idéia da modulação da tumorigênese pelo microambiente de determinados órgãos (Paget, 1889). No entanto, ela foi contestada e permaneceu por algum tempo negligenciada e até pouco tempo o estudo do desenvolvimento tumoral tinha como único foco a célula tumoral, sendo reconhecido como um processo celular autônomo. Porém, hoje já é reconhecida a influência do microambiente circundante ao tumor tanto nos mecanismos de aquisição quanto de progressão de vários marcadores tumorais, sendo esse capaz de não apenas responder e sustentar a carcinogênese, como também contribuir ativamente para a iniciação, progressão e metástase do tumor (Hu & Poliak, 2008; Langley & Fidler, 2011).

Figura 3- Comparação entre as características fenotípicas dos vasos sanguíneos normais e vasos sanguíneos tumorais.



Legenda: A estrutura e a funcionalidade de um vaso tumoral para um vaso normal diferem principalmente devido a alterações na hierarquia arteríola-capilar-vênula, nas interações pericito-célula endotelial, nos diâmetros e permeabilidade dos vasos, assim como no padrão de fluxo e número de ramificações.

Fonte: Adaptado de Aird, 2009.

O estroma tumoral é constituído por distintos componentes celulares não transformados, como fibroblastos, miofibroblastos, leucócitos, células endoteliais e mioepiteliais, macrófagos, dentre outros, e também pela matriz extracelular (MEC). Essa por sua vez corresponde ao principal componente desse microambiente, sendo constituída por uma rede de macromoléculas com diferentes propriedades físicas, bioquímicas e biomecânicas (Lu *et al.*, 2012).

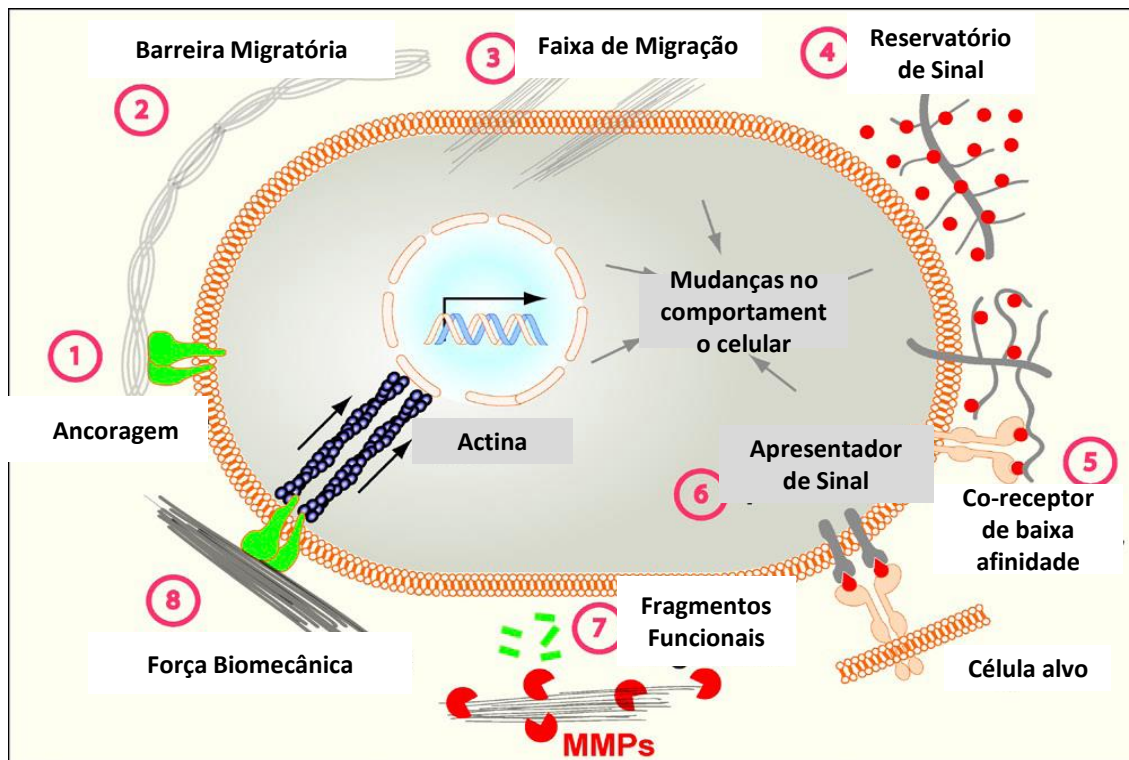
Entre elas encontram-se proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos e polissacarídeos, como exemplo podemos citar o colágeno, a fibronectina (FN) e as proteínas matricelulares. Tais constituintes são responsáveis tanto por funções estruturais como por funções regulatórias (Hu & Polyak, 2008; Chong *et al.*, 2012; Chiodoni *et al.*, 2010).

A MEC é capaz de regular as respostas celulares por diferentes mecanismos. A **Figura 4** ilustra as principais etapas de regulação: (1) ancoragem; (2) atuação como barreira migratória; (3) ou como facilitadora de migração; (4) reservatório de sinais, auxiliando na formação de um gradiente de concentração; (5) atuação como co-receptor; (6) ou apresentador de sinal, ajudando no direcionamento da comunicação célula-célula; (7) sinalização através de fragmentos funcionais derivados do processamento dos diferentes componentes da MEC por proteases; (8) força biomecânica responsável por controlar a sua rigidez, entre outras características físicas que influenciam o suporte, a arquitetura tecidual e a sua integridade.

Durante o desenvolvimento embrionário e a homeostase de cada órgão, a síntese e a organização da MEC ocorre de forma finamente regulada, no entanto diante de patologias, como fibrose tecidual e câncer, tal síntese se torna desregulada e a matriz de forma geral desorganizada. Dessa maneira, o comportamento das células estromais também é alterado, facilitando a angiogênese associada ao tumor e a inflamação, o que possibilita a geração de um microambiente tumorigênico (Lu *et al.*, 2012).

No microambiente tumoral, as **proteínas matricelulares** podem ser produzidas tanto pelas células tumorais quanto pelas células estromais e apresentam como principal característica no organismo adulto a expressão durante a renovação tecidual e reparo, visando à normalização do tecido (Chiodoni *et al.*, 2010). Tais proteínas não apresentam função estrutural (Mosher & Adams, 2012) e atuam regulando diversas funções que contribuem para a tumorigênese, como: (a) transição epitélio-mesênquima; (b) angiogênese tumoral; (c) proliferação; (d) invasão; (e) migração; (f) evasão do sistema imune; (g) sobrevivência à *anoikis* (h) adesão; (i) deposição de MEC; (j) regulação de sinais de receptores de fatores de crescimento (Chiodoni *et al.*, 2010; Chiquet-Ehrismann & Tucker, 2011).

Figura 4 – Funções exercidas pela matriz extracelular.



Legenda: A MEC se destaca como o principal componente do microambiente tumoral, sendo capaz de regular as respostas celulares por diferentes mecanismos. As principais etapas dessa regulação encontram-se ilustradas abaixo (1) ancoragem; (2) atuação como barreira migratória; (3) ou como facilitadora de migração; (4) reservatório de sinais; (5) atuação como co-receptor; (6) ou apresentador de sinal; (7) sinalização através de fragmentos funcionais; (8) força biomecânica.

Fonte: Adaptado de Lu *et al.*, 2012.

É importante destacar que a regulação dos mecanismos citados acima pode ocorrer de duas formas distintas: através da ligação direta a outras proteínas da MEC, disparando assim seus receptores de superfície específicos, ou através da ligação a fatores de crescimento e citocinas, modulando suas atividades.

Além disso, as glicoproteínas matricelulares funcionam como adaptadoras e moduladoras das interações célula-matriz, sendo conhecidas pela sua capacidade de induzir um *estado de adesão intermediário*, como ilustrado pela **Figura 5**. São proteínas estruturalmente diversas que incluem as trombospondinas 1 e 2, as tenascinas, a SPARC (proteína secretada, acídica e rica em cisteína), a osteopontina, a família CCN, galectinas, entre outras (Murphy-Ullrich, 2001; Chiodoni *et al*, 2010). Ao induzir tal estágio, elas propiciam a aquisição de um fenótipo celular mais migratório e favorável à proliferação.

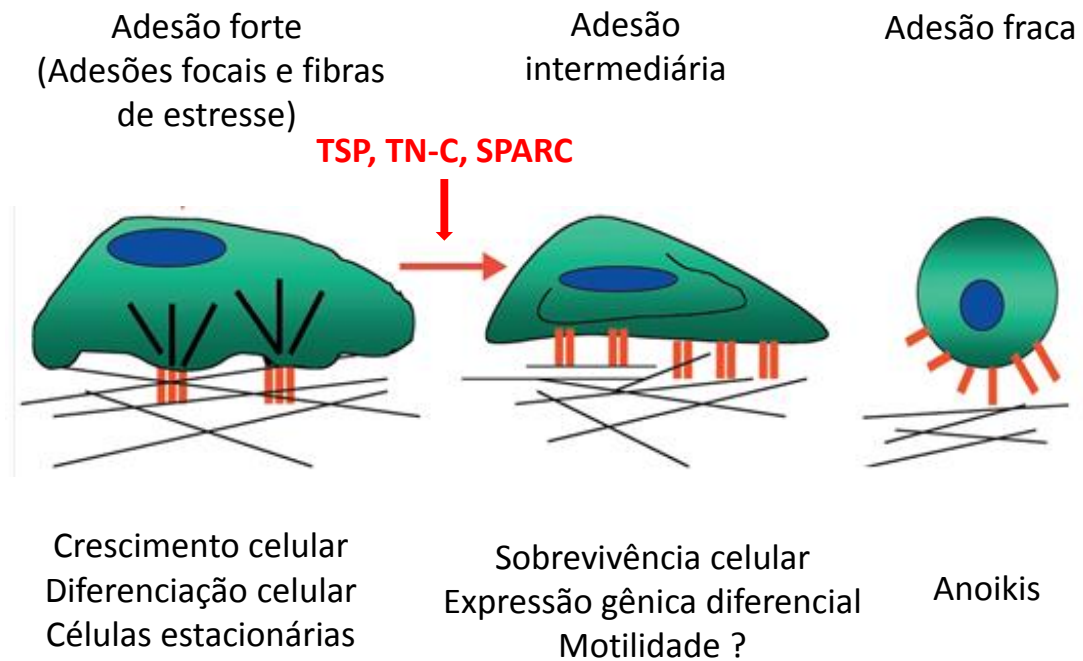
Tenascina-C

A TN-C é o membro fundador de uma família de cinco proteínas (Midwood *et al*, 2011), que inclui além da -C as tenascinas -X, -Y, -R e -W, as quais apresentam diferentes padrões de expressão durante o desenvolvimento e no organismo adulto, demonstrando a existência de mecanismos independentes de regulação (Tucker & Chiquet-Ehrismann, 2009).

A TN-C é uma proteína multi-modular constituída por quatro diferentes domínios: domínio de montagem, uma série de repetições tipo fator de crescimento epidermal (EGF-L), uma série de repetições tipo fibronectina III (FNIII) e um domínio globular tipo fibrinogênio C-terminal (FBG) (Midwood *et al*, 2011). A representação esquemática da molécula na **Figura 6A** indica grande parte dos seus ligantes, demonstrando assim a variedade de mecanismos associados a sua expressão.

A composição estrutural da TN-C está intimamente relacionada com as suas funções celulares, como é possível observar, a TN-C interage com muitas moléculas da MEC e receptores de superfície de celular, afetando assim a arquitetura tecidual, a resiliência do tecido e respostas celulares importantes na angiogênese, metástase e no nicho de células tronco (Obberghain-Schilling *et al*, 2011).

Figura 5- Estágios de adesão celular e indução do estado intermediário de adesão por proteínas matricelulares.



Legenda: O estágio de adesão forte é caracterizado pela presença de adesões focais e fibras de estresse. As proteínas matricelulares são capazes de induzir um estado intermediário de adesão, propiciando uma maior motilidade e proliferação celular. O balanço dessas proteínas na matriz pode ainda induzir um estado fraco de adesão, o qual pode resultar em *anoikis* ou morte celular induzida pela perda de adesão ao substrato.

Fonte: Adaptado de Murphy-Ullrich, 2001.

A molécula de TN-C pode ser organizada em hexâmeros ou processada em monômeros. A glicosilação e o splicing alternativo afetam o seu peso molecular e explica a variação entre 190 e 330KDa do seu monômero. Em humanos, o processo de splicing gera cerca de 9 domínios FNIII diferentes (Joester & Faissner, 2001), resultando em diferentes isoformas e diferentes respostas celulares (Chiquet-Ehrismann & Tucker, 2011).

Como dito anteriormente, no microambiente tumoral a homeostase tecidual encontra-se fortemente desregulada, principalmente pela diminuição da sinalização proveniente da adesão célula-célula, do crescimento independente de fatores de crescimento e da sinalização alterada da matriz extracelular (Orend, 2005).

Muitos estudos já demonstraram que alterações nos níveis dos diferentes constituintes da MEC são capazes de determinar diferentes fenótipos celulares, como por exemplo, em gliomas, onde já se verificou diferentes taxas de proliferação celular em resposta a distintas composições de proteínas matricelulares (Huang *et al*, 2001). Foi demonstrado que a TN-C é altamente expressa no seu microambiente, assim como no de outros tumores sólidos (Orend, 2005).

A expressão de TN-C em tecidos adultos fisiologicamente normais é extremamente baixa ou não é detectável (Midwood *et al*, 2011). No entanto, mediante injúria tecidual, a sua expressão é rapidamente e especificamente induzida (Goh *et al*, 2010). A elevada expressão de TN-C está fortemente associada com sítios de remodelamento vascular durante reparo tecidual dérmico, assim como com a angiogênese em uma variedade de estados patológicos, incluindo diabetes, doença inflamatória intestinal, doença de Crohn, vasculite e câncer (Obberghein-Schilling *et al*, 2011). A expressão de TN-C pode ser induzida por várias citocinas pró e anti-inflamatórias, por fatores de crescimento secretados principalmente por células estromais, assim como pela hipóxia, por espécies reativas de oxigênio e estresse mecânico (Midwood & Orend, 2009).

A TN-C foi descrita como antagonista do efeito adesivo da FN: a interação do sindecán-4 com o sítio HepII da FN é impedida através da ligação direta da TN-C as repetições tipo III 13 da FN (FNIII13) (**Figura 6B**) em células tumorais de carcinoma mamário e em células de glioblastoma, resultando em desestabilização de contatos focais e desarranjo das fibras de estresse, *in vitro* (Huang *et al.*, 2001). Esta interferência da TN-C na função do sindecán-4, representada na **Figura 6C**, inibe a sua função de co-receptor no espalhamento celular mediado pela FN, estimulando ainda a proliferação dos gliomas. Além disso, a TN-C não só compromete a adesão celular à FN como impede a sua polimerização (Orend, 2005). Os

efeitos moduladores de adesão também têm sido descritos para outras tenascinas, sugerindo que a habilidade de modular a adesão e a migração parece ser uma atividade comum de todas as tenascinas (Chiquet-Ehrismann & Tucker, 2011).

No contexto angiogênico, a MEC proporciona a manutenção da organização das células endoteliais vasculares nos vasos sanguíneos, através das interações adesivas estabelecidas com receptores de MEC transmembranares especializados, como as integrinas presentes na superfície dessas células (Obberghein-Schilling *et al*, 2011).

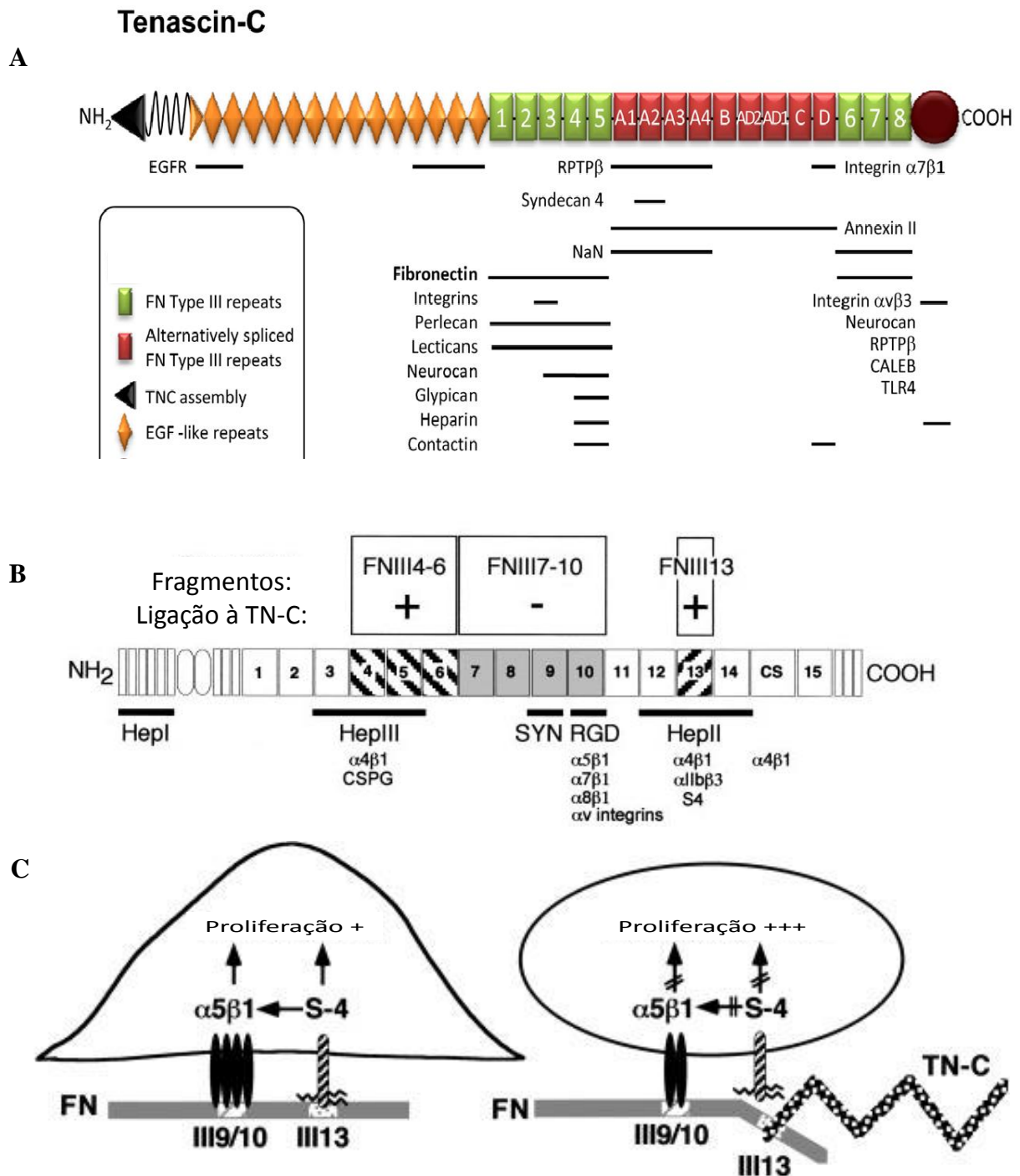
A adesão de tais células à MEC é extremamente importante para proliferação, migração, sobrevivência e para a estabilização dos vasos sanguíneos, o que constitui todos os pontos críticos da neovascularização (Davis e Senger, 2005). No entanto, mesmo se tendo conhecimento da importância que a MEC apresenta como um todo na regulação de todas essas vias, existe ainda a necessidade de se determinar quais são os componentes específicos que se encontram intimamente relacionados com cada um desses processos.

A glicoproteína TN-C modula a migração celular, proliferação e sinalização através da indução de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de sinalização oncogênicas (Midwood & Orend, 2009). Dentro desse contexto, e considerando a forte associação entre inflamação e câncer sugerida por muitos trabalhos, a presença da TN-C como molécula chave na regulação e comunicação entre os dois processos demonstra mais uma vez a sua potencialidade de ser estabelecida como um possível alvo terapêutico. Além de servir como plataforma para elucidação dos mecanismos associados a ambos os processos.

Gliomas

Os gliomas correspondem a maior parte dos tumores primários do sistema nervoso central (Llaguno *et al*, 2009). A classificação histopatológica atual da organização mundial de saúde (WHO- *World health organization*) (Louis *et al*, 2007) divide os gliomas malignos difusos de acordo com características morfológicas em: astrocítico, oligodendroglial e neoplasmas oligoastrocíticos mistos (Furnari *et al*, 2007; Onishi *et al*, 2011; Dunn *et al*, 2012). E subdivide os tumores astrocíticos em diferentes graduações (I-IV) segundo particularidades histológicas adicionais. Tais graduações estão correlacionadas com o prognóstico tumoral (Schneider *et al*, 2010; Onishi *et al*, 2011).

Figura 6 - Representação da estrutura dos domínios da tenascina-C e da molécula de fibronectina.



Legenda: Na figura **A** os potenciais parceiros de ligação dos diferentes domínios da TN-C encontram-se ilustrados, em **B** observa-se os domínios de ligação da FN à TN-C e suas respectivas afinidades, incluindo o domínio específico e o de maior afinidade (FNIII13). A figura **C** ilustra a modulação da adesão celular exercida pela TN-C através da ligação ao domínio FNIII13 da FN.

Fonte: (A) Adaptado de Obberghien-Schilling *et al*, 2011;(B) e (C) Adaptado de Huang *et al*, 2001.

A classificação dos tumores astrocíticos da WHO (Louis *et al*, 2007), apresentada na **Tabela 1**, define como Grau I os astrocitomas pilocíticos, os quais são raros e de natureza benigna, como Grau II os tumores que apresentam lesões com atipia nuclear sozinha, caracterizando um astrocitoma difuso, como Grau III os que apresentam além da atipia citológica, anaplasia e atividade mitótica. E como Grau IV os tumores onde existe, além das características citadas anteriormente, a presença de proliferação microvascular e/ou necrose, caracterizando um Glioblastoma (GBM) com mediana de sobrevivência de aproximadamente 15 meses, uma vez que se realize a terapia combinada de neurocirurgia, radiação e temozolomida (Onishi *et al*, 2011; Bartek *et al*, 2012; Dunn *et al*, 2012).

Os glioblastomas correspondem ao tipo de tumor humano cerebral primário maligno mais comum e mais letal (Reifenberger & Collins, 2004; Bartek *et al*, 2012; Dunn *et al*, 2012), sendo altamente heterogêneos tanto por sua aparência, compostos por diferentes tipos celulares, quanto por sua expressão gênica (Ardebili *et al*, 2011; Lima *et al*, 2012).

Além disso, os GBMs estão entre os tumores mais angiogênicos (Soda *et al*, 2011). A proliferação microvascular com a formação de uma rede extensiva de vasculatura anormal caracterizada por estruturas glomerulóides e hiperplasia endotelial (Wang *et al*, 2010), juntamente com a presença de focos necróticos circundados por células pseudopaliçadas constituem marcadores chaves da histologia dos glioblastomas (Reifenberger & Collins, 2004; Onishi *et al*, 2011; Hardee & Zagzag, 2012). Os vasos nesse tumor são desorganizados, tortuosos, com diâmetro aumentado, altamente permeáveis, anormais nas paredes endoteliais, na cobertura de pericitos e na membrana basal, o que resulta na perda da barreira hematoencefálica (Arismendi-Morillo & Castellano, 2005; Onishi *et al*, 2011; Soda *et al*, 2011).

Os glioblastomas, em contraste com oligodendrogliomas, são ricos em TN-C em toda a massa tumoral. Tal expressão encontra-se associada com o alto grau de invasão local característica desse tipo de tumor (Chiquet-Ehrismann & Tucker, 2011), a qual está parcialmente relacionada com o baixo prognóstico e reduzida expectativa de vida dos pacientes com GBM (Ardebili *et al*, 2011).

Tabela 1- Classificação dos tumores astrocíticos segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS)

Tumores Astrocíticos	I	II	III	IV
Astrocitoma de células gigantes subependimal	•			
Astrocitoma Pilocítico	•			
Astrocitoma Pilomixóide		•		
Astrocitoma Difuso		•		
Xantoastrocitoma pleomórfico		•		
Astrocitoma Anaplásico			•	
Glioblastoma				•
Glioblastoma de células gigantes				•
Gliosarcoma				•

Fonte: Adaptado de Louis *et al*, 2007.

Antecedentes do presente trabalho

Anteriormente, nosso grupo demonstrou que matrizes nativas com diferentes quantidades de TN-C resultavam em diferentes fenótipos adesivos das células endoteliais. As matrizes utilizadas foram a matriz da linhagem de glioma U-373MG (entre outras matrizes de astrocitomas), rica em TN-C e pobre em FN; a matriz nativa das HUVECs, que é rica em FN e não apresenta TN-C; e por fim a matriz de células FGH (fibroblastos isolados da gengiva humana), rica tanto em TN-C quanto em FN. Observamos que a matriz do glioma não suportava a adesão das HUVECs ao longo de 24 horas de cultivo, em contraste com o perfil adesivo observado tanto na matriz de FGH quanto na matriz autóloga de HUVECs. Após o contato com a matriz de células U-373 MG, as células endoteliais iniciavam um processo de *anoikis*. Além disso, as células que foram incubadas com a matriz de gliomas e resistem à *anoikis* apresentavam uma elevada capacidade proliferativa, porém reduzido potencial tubulogênico (Alves *et al*,2011).

As investigações realizadas sugeriram que a relação FN/TN-C parecia estar relacionada com os fenótipos observados, uma vez que a matriz de FGH, rica em TN-C, não foi capaz de disparar mecanismos de *anoikis* nem defeitos tubulogênicos nas HUVECs (Alves *et al*, 2011). No entanto, a matriz de FGH também apresentava uma elevada expressão de FN, o que nos levou à hipótese de que a matriz do glioma pudesse causar os efeitos observados tanto porque tinha muita TN-C ou alternativamente porque não tinha FN suficiente para bloquear os efeitos da TN-C. Com o objetivo de investigar se era o excesso de TN-C ou a falta de FN que resultava nos fenótipos observados, assim como um possível mecanismo de modulação entre as duas moléculas, foram estabelecidos substratos mistos com diferentes proporções FN:TN-C – elaborados a partir de preparações purificados das duas proteínas – que mimetizavam as condições encontradas tanto na matriz do glioma quanto nas matrizes não-tumorais (HUVEC e FGH) (Alves *et al*, 2011).

Os ensaios de adesão com substratos mistos demonstraram que o aumento da presença de FN era capaz de reverter o efeito anti-adesivo da TN-C. Da mesma forma, os substratos contendo uma menor proporção de TN-C em relação à FN apresentaram uma melhor resposta tubulogênica (Alves *et al*, 2011).

Apesar do experimento de simulação com diferentes proporções de FN:TN-C fornecer pistas de que a presença da TN-C seja fundamental para emitir a sinalização que leva aos

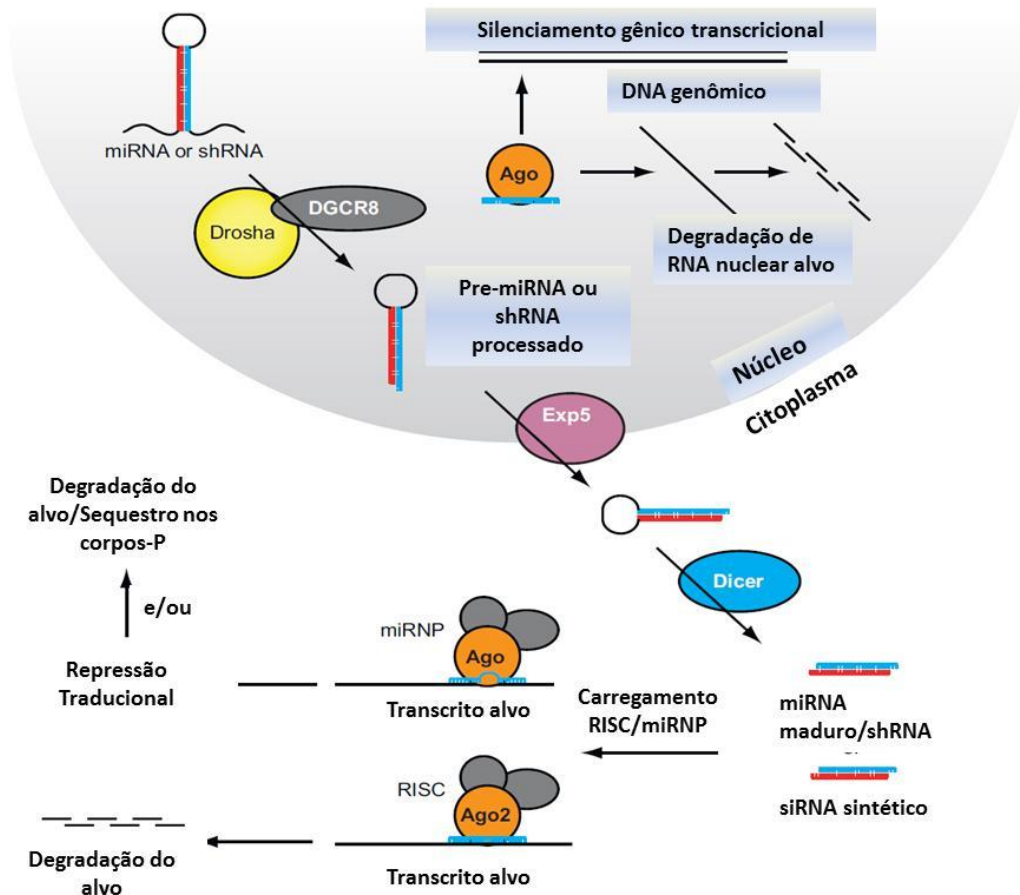
fenótipos observados nas células endoteliais em contato com a matriz de astrocitomas, esta estratégia possui a desvantagem de não permitir a abordagem do possível papel de outros componentes da matriz tumoral no processo. Por exemplo, fatores de crescimento e glicosaminoglicanos, sabidamente também regulam o processo angiogênico.

Dessa forma, com interesse em confirmar os dados anteriores e realizar uma abordagem mais específica do papel da TN-C tumoral, utilizamos o silenciamento gênico por RNA de interferência, a fim de diminuir a expressão de TN-C na linhagem U-373 MG.

Uma das formas de controle da expressão gênica ocorre através de diversos RNAs regulatórios, os quais são denominados RNAs de interferência (RNAi). A descoberta de sua presença nos sistemas biológicos tem revolucionado a pesquisa científica nos últimos anos, o que fez com que este venha sendo utilizado como uma ferramenta poderosa para o melhor entendimento de doenças gene-específicas, como também para o estabelecimento de alvos moleculares visando sua possível aplicação clínica (Martin e Caplen, 2007).

O termo RNAi é utilizado para caracterizar pequenos RNAs não codificantes, de tamanho variável entre 20 e 30 nucleotídeos, os quais se associam com complexos regulatórios contendo nucleases e de onde pareiam com RNAs mensageiros alvos, prevenindo assim a expressão destes mRNAs (Siomi e Siomi, 2009). O seu mecanismo geral de ação consiste na execução de três etapas, como ilustrado pela **Figura 7**: primeiramente uma dupla-fita de RNA (dsRNA), que pode ser expressa dentro da célula ou introduzida artificialmente no compartimento celular, é processada em pequenos duplexes de RNA pela enzima Dicer ou Ribonuclease III (RNaseIII) (Valencia-Sanchez *et al*, 2006). Posteriormente, os duplexes são dissociados e uma fita é preferencialmente carregada em um complexo protéico conhecido como complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (Kaufmann *et al*, 2010). Finalizando o processo, o RISC procura no transcriptoma potenciais mRNAs alvos, e uma vez identificados, a fita simples de RNA (ssRNA) carregada no complexo, denominada de fita guia, direciona uma endonuclease do RISC na clivagem destes mRNAs, que apresentam uma sequência homóloga a da fita simples de RNA (Siomi e Siomi, 2009).

Figura 7- Aplicações do RNA de Interferência em Sistemas de Mamíferos.



Legenda: A figura demonstra a produção e a atuação dos microRNAs endógenos, assim como o mecanismo de ação dos siRNAs sintéticos durante o processo de silenciamento gênico.

Fonte: Adaptado de Martin e Caplen, 2007.

Objetivos do trabalho:

Objetivo Geral

Investigar a importância da TN-C na matriz secretada por células de linhagem de astrocitoma na modulação do fenótipo angiogênico das células endoteliais.

Objetivos específicos:

- ✓ Silenciar a expressão de TN-C da linhagem celular de astrocitoma U-373 MG;
- ✓ Avaliar o perfil de resposta das células endoteliais após o contato com a matriz da célula U-373 MG silenciada, através de ensaios funcionais relacionados com parâmetros específicos do processo angiogênico, como: (i) adesão das células endoteliais sobre a matriz das células silenciadas; (ii) caracterização da resposta tubulogênica endotelial após o contato prolongado com a matriz secretada por células de astrocitoma silenciadas;
- ✓ Avaliar o processo de *anoikis* endotelial após contato prolongado com matrizes de astrocitomas (silenciados ou não para a expressão de TN-C);
- ✓ E por fim, investigar a modulação exercida pela TN-C no ciclo celular e na expressão de CKIs (inibidores de quinases dependentes de ciclina), em especial a proteína p27.

1 METODOLOGIA

Um esquema geral que sintetiza a estratégia experimental utilizada neste trabalho está apresentado ao final desta seção (**Figura 8**).

1.1 Cultivo celular

HUVECs primárias foram obtidas através do tratamento de veias de cordões umbilicais humanos com a enzima colagenase, segundo modificações da técnica descrita por Jaffe *et al* (1973), a partir de cordões umbilicais obtidos do Hospital-Maternidade Carmela Dutra, Rio de Janeiro, através de doação consentida segundo as normas do Conselho de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil (SMSDF) do Município do Rio de Janeiro (Protocolo de Pesquisa # 0086.0.314.325-10).

A linhagem tumoral de astrocitoma U-373 MG, obtida da ATCC – *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, EUA) foi cultivada em meio DMEM-F12 HAM, com 10% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina 2mM, bicarbonato de sódio 26mM, fungizona 2,5 µg/mL, penicilina 500U/mL e gentamicina 40 µg/mL. HUVECs foram cultivadas em meio 199, com 20% de soro fetal bovino (SFB) e na presença dos mesmos complementos citados anteriormente, nas mesmas concentrações. Os meios de ambas as células eram trocados de 2 em 2 dias e as células mantidas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Atingido o estado de confluência, as células eram tripsinizadas (tripsina-EDTA 0,025%) e expandidas, para uso posterior nos experimentos. As células endoteliais eram usadas até a passagem 3. Exceto pelo meio de cultura (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA) e pelo soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP), todos os demais reagentes utilizados em cultivo celular foram fornecidos pela Life Technologies/Invitrogen (São Paulo, SP).

1.2 Transfecção com siRNA para TN-C

As células da linhagem U-373 MG foram plaqueadas em placas de 60 mm de diâmetro ou

em placas de 6 poços na densidade de 1×10^4 células/cm², em meio DMEM-F12HAM, com 10% SFB, contendo L-glutamina 2mM, sem penicilina e sem fungizona. Passadas 24 horas, realizamos a transfecção com a Lipofectamina® 2000 (2µg/mL), diluída em meio reduzido de soro Opti-MEM®. Os siRNAs direcionados aos RNAs mensageiros da tenascina-c também foram diluídos em meio Opti-MEM. Testamos inicialmente duas concentrações distintas de siRNA (40 e 60nM) e as mesmas concentrações para o siRNA truncado (controle negativo). Ao final da incubação, a solução de siRNA foi misturada com a solução de lipofectamina (proporção 1:1). Todas as condições foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente e ao final adicionadas às culturas celulares. Após 24 horas, trocamos o meio de cultura de todas as condições por meio DMEM-F12 HAM, suplementado com 10% de SFB, L-glutamina 2mM, bicarbonato de sódio 26mM, fungizona 2,5 µg/mL, penicilina 500U/mL e gentamicina 40 µg/mL. As construções do siRNA positivo (senso: 5'-CAGCCAGUGGUGUUUAACCACGUUU-3'/ anti-senso: 5'-AAACGUGGUUAAACACCACUGGCUG-3') e do controle truncado (senso: 5'-CAGGUGAUGUGAAUUCACCGCCUUU-3'/ anti-senso: 5'-AAAGCGGUGAAUUCACAUCACCUG-3'), assim como o meio Opti-MEM e a Lipofectamina, foram obtidos junto à Life Technologies/Invitrogen (São Paulo, SP).

1.3 Ensaio indireto de imunoadsorção enzimática (ELISA) para detecção de TN-C secretada

Após a transfecção das células U-373 MG com siRNAs (t = 120 horas, contadas a partir do término do período de incubação com siRNAs), a secreção de TN-C foi quantificada, através da técnica de ELISA indireto. As células transfectadas com siRNA 40 e 60nM (positivo) e siRNA 40 e 60nM (truncado) foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 células/cm² em placas de 24 poços por 4 horas, na presença de meio DMEM-F12 HAM com soro fetal bovino (10%). Posteriormente, o meio com soro foi retirado e adicionamos 400µL de meio sem soro por 72h. Em seguida, os meios condicionados foram coletados e quantificados quanto ao teor de proteínas totais, de acordo com o método descrito no item 2.4. Os meios condicionados foram então incubados em placas de ELISA (volume final de 100 µL/poço; 5µg de proteína total por condição), por no mínimo 16 horas a 4°C. A fim de podermos estimar o teor de TN-

C nos meios condicionados, sensibilizamos os poços igualmente com soluções contendo concentrações variadas e conhecidas de TN-C purificada (de 15 a 1000 ng/mL), diluída em tampão bicarbonato 0,1M pH 9,5, por 16 horas a a 4°C. Os poços foram bloqueados com albumina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA) 0,1% em TBS 1x, por 16 horas a 4°C e em seguida lavados 3 vezes com salina fisiológica (NaCl 0,9%) suplementada com 0,05% de Tween-20. Os poços foram incubados com o anticorpo primário (monoclonal anti-TN-C humana, clone BC-24, dirigido contra o domínio EGF-like da proteína, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA) na diluição 1:4000 em salina tamponada com Tris 0,02M pH 7,6, contendo Tween 0,1% (TBS-T) por 1h a 37°C. Os poços foram lavados 3 vezes com salina/Tween 0,05% e incubados com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (mouse-HRP – DAKO) 1:2000 em TBS-T por 1 hora a 37°C. Após 3 lavagens com salina/Tween, os poços foram incubados com 100 µL de O-fenilenediamino (OPD) (1 mg/mL) em tampão citrato de sódio 0,01 M, pH 4,5 contendo 0,05 % de H₂O₂. A reação colorimétrica foi paralisada com H₂SO₄ 3 M e lida em um leitor de microplacas (Multiskan Spectrum/Thermo Scientific) a 490nm. Uma curva-padrão foi construída a partir dos valores de D.O. obtidos para as concentrações conhecidas de TN-C, que foram então usadas para se estimar a concentração nos meios condicionados.

1.4 Dosagem de proteína pelo método de Bradford

Meios condicionados foram coletados (t = 120 horas, como descrito no item 2.3) de células transfectadas e submetidos à centrifugação a 1100 rpm por 10 minutos para eliminação de restos celulares. Em seguida, realizamos uma dosagem de proteína total pelo método Bradford. A placa de 96 poços foi sensibilizada com 10µL de cada amostra ou padrões em concentrações conhecidas e 190µL do reagente Coomassie Plus *protein assay* (Thermo Scientific, Rockford, EUA). Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, a placa foi lida a 595 nm.

1.5 Extração de RNA

No período pós-transfecção ($t = 120$ horas, contadas a partir do término do período de incubação com siRNAs) as culturas foram lavadas com PBS e lisadas com o reagente Trizol (Life Technologies/Invitrogen, São Paulo, SP) (1,0 mL/placa de 60 mm de diâmetro), por 2 a 5 minutos. O lisado de cada condição foi centrifugado a 12.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para microtubos e tratado com 200 μ L de clorofórmio (200 μ L de clorofórmio para cada 1mL de Trizol usado). A mistura foi agitada por 15 segundos, deixada em repouso a temperatura ambiente por dois minutos e então centrifugada a 12.000 rpm, a 4°C, por 15 minutos. Ao final desse processo, a fase aquosa superior de cada amostra foi transferida para outros microtubos, a qual foi em seguida adicionado o volume de isopropanol equivalente ao volume de sobrenadante recolhido. Após homogeneização manual, a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida centrifugada a 12.000 rpm a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e 1 mL de etanol 75% (1,0mL de etanol 75% para cada 1,0mL de Trizol usado) foi adicionado e homogeneizado em agitador. Estas amostras de RNA foram armazenadas em freezer ultrafrio (-80°C).

1.6 Quantificação do RNA

As amostras de RNA total foram retiradas do freezer -80°C, centrifugadas a 7.500 rpm, a 4°C, por 5 minutos e ao final tiveram seus sobrenadantes descartados. O sedimento obtido foi seco em temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos. Em seguida, o sedimento de RNA de cada amostra foi dissolvido em água livre de RNase (água DEPC- dietilpirocarbonato 0,1%), uma alíquota foi retirada e diluída três vezes para posterior dosagem no NanoDrop, e as amostras retornaram ao freezer -80°C. Uma vez que a quantificação por espectrofotometria das amostras extraídas conferiu uma proporção entre as absorvâncias 260nm/280nm variável de 1,8-2,0, podemos dizer que o RNA extraído apresentava um bom grau de pureza. Dessa maneira, considerando que absorvância a 260nm igual a 1,0 corresponde a 40 μ g RNA/ μ L, quantificamos em μ g/ μ L o RNA extraído de cada amostra e calculamos o volume necessário a ser retirado de cada amostra para obtenção de 1,0 μ g de RNA, que corresponde a quantidade

de RNA utilizada para a produção de cDNA.

1.7 Síntese de cDNA

Nesse processo, 1,0 µg de RNA total das células da linhagem U-373 MG foi submetido a reação de transcrição reversa utilizando a enzima *Moloney Monkey Leukemia vírus reverse transcriptase* – M-MLV 5x (200U/µL, concentração final 1x). Antes do início da reação, as amostras foram tratadas com DNase I (Deoxyribonuclease I, Amplification Grade – Life Technologies/Invitrogen, São Paulo- SP) para eliminar qualquer possível contaminação com DNA genômico. Para isso, o volume de RNA correspondente a 1,0µg de RNA total foi avolumado com água DEPC 0,1%, completando um volume final de 8µL. Posteriormente, foram adicionados 1µL de tampão (10x *DNase I Reaction Buffer*), seguido da adição de 1µL da enzima DNase I (ambos os valores correspondem à quantidade suficiente para um volume final de 10µL e 1µg de RNA total). Após esse tratamento, as amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 1µL de EDTA e elas foram colocadas no termociclador (Bio-Rad, Gene Cyclor) a 65°C por 10 minutos. Foram acrescentados 0,5µL de oligo-DT primer (0,5mg/µL, Promega, São Paulo) e seguiu-se uma incubação no termociclador a 70°C por 5 minutos. As amostras foram então resfriadas rapidamente por cinco minutos, depois adicionadas dos componentes finais da reação: 5,0µL de tampão M-MLV 5x (concentração final 1x, Promega, São Paulo), 2,5µL do mix de dNTPs (concentração inicial 10mM) e 0,5µL da transcriptase reversa M-MLV 5x (200U/µL). O volume foi ajustado com água DEPC 0,1% até 25µL e as amostras foram então incubadas no termociclador a 37°C por 60 minutos. Ao término da reação, os cDNAs produzidos foram armazenados no freezer -80°C, de onde posteriormente foram retirados para análises por RT-PCR em tempo real.

1.8 RT-PCR em Tempo Real

Para análise quantitativa de transcritos de TN-C, foi utilizada a técnica de PCR em tempo real, utilizando os moldes de cDNA formados a partir de 1µg de RNA total de cada amostra.

Na reação de RT-PCR, foi utilizado o Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas Life Sciences, Lituânia, U.E) (12,5 μ L), os primers senso e anti-senso (0,2 μ L de cada para o gene alvo *TNC*, na concentração de 10pmol/ μ L, 0,5 μ L de cada para o gene constitutivo *RNA18S5* também na concentração de 10pmol/ μ L, 1,0 μ L de cDNA, 0.05 μ L da Rox diluída (1:10) e água DEPC 0,1% para um volume final de 25 μ L. As amostras foram feitas em triplicata, e as condições de corrida usadas tanto para o gene alvo (*TNC*) quanto para o gene constitutivo (*RNA18S5*) foram: 95 °C de desnaturação inicial por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão). A todas as corridas foi adicionada a curva de dissociação contínua, a qual nos possibilitou observar, caso ocorresse, a formação de dímeros de *primers*, produtos inespecíficos e/ou contaminação. As corridas foram realizadas no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e o software usado para a análise dos dados foi o 7500 V2.03, de onde posteriormente os valores correspondentes aos Cts (Cycle Threshold) de cada amostra foram exportados, para a quantificação relativa do nível de mRNA da TN-C normalizado pelo nível de mRNA da unidade ribossomal 18s (*RNA18S5*). A sequência dos primers senso e anti-senso utilizados estão descritas na **Tabela 2**.

1.9 Ensaio de adesão celular sobre matriz

Células U-373 MG silenciadas ou na condição controle (respectivamente transfectadas com siRNA específico para TN-C ou seu controle truncado, ambos a 40nM), células U-373 MG selvagens e HUVECs foram plaqueadas na densidade de $2,5 \times 10^5$ células/cm², em placas de 96 poços, por 72h. Posteriormente, as células foram lisadas com uma solução de NH₄OH 0,1M em PBS, contendo Triton X-100 0,1% (v/v), leupeptina 1mM e PMSF 1mM. As matrizes extracelulares secretadas pelas células, que permanecem imobilizadas à superfície plástica das placas de cultura, foram incubadas em PBS com cálcio (1mM), suplementado com 0,1% BSA, por 1-2 horas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, as HUVECs foram tripsinizadas, contadas e plaqueadas na densidade de 1×10^5 células/cm² sobre as matrizes, na presença de meio 199 suplementado com BSA 0,1%.

Tabela 2- Sequências senso e anti-senso dos *primers* utilizados

Gene	Sequência dos primers [5'→3']
<i>TNC</i> (gene alvo)	senso: TCCAAAGAGCCAACAAGCCA
	anti-senso: GCTGGATTGCTCTCCTTGTCTT
<i>RNAI8S5</i> (gene constitutivo)	senso: CCTGGATACCGCAGCTAGGA
	anti-senso: GCGGCGCAATACGAATGCCCC

Fonte: A autora, 2013.

Após 24 horas, os poços foram lavados para remoção das células não aderidas, e então incubados com 1mg/mL de brometo de 4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA) por 2 horas.

Após este tempo, as amostras foram solubilizadas com álcool isopropílico absoluto e a placa lida a 595 nm.

1.10 Ensaio de tubulogênese endotelial

Células U-373 MG silenciadas para a expressão de TN-C ou transfectadas com siRNA controle, células U-373 MG selvagens e HUVECs foram plaqueadas na densidade de 8×10^4 células/cm² em placas de 6 poços por 72 horas. Posteriormente, as células foram lisadas, de acordo com o procedimento descrito no item 2.9, para a obtenção das matrizes imobilizadas. Em seguida, HUVECs foram tripsinizadas, contadas e plaqueadas na densidade de 4×10^4 células/cm² sobre essas matrizes em meio 199 suplementado com 0,1% BSA, por 24 horas. Géis de lâmina basal foram preparados em placas de 96 poços a partir de Matrigel® depletado em fatores de crescimento (Becton&Dickinson), polimerizado a 37°C (50-60 µL de solução de Matrigel/poço).

Posteriormente, as HUVECs que haviam sido previamente incubadas com diferentes matrizes foram semeadas a uma densidade de 2×10^5 células/cm² em placa de 96 poços, em meio 199 com 5% SFB por 16 horas. Após esse período, as culturas foram lavadas com PBS 1x, antes da fixação das células com glutaraldeído 1,1% em PBS por 15 minutos em temperatura ambiente (Zemani *et al.*, 2005). Em seguida, três lavagens com PBS 1x foram realizadas (3 minutos cada lavagem). O número de estruturas (brotos ou prolongamentos celulares endoteliais, que resultam no aspecto em “rede” da diferenciação angiogênica) foi quantificado em pelo menos 5 campos representativos de cada condição.

1.11 Análise de proteínas por Eletroforese PAGE-SDS e *Western Blotting*

A técnica de *western blotting* foi utilizada tanto para a confirmação do silenciamento da TN-C nas células U-373 MG, quanto para a análise da via de sinalização do p27 nas HUVECs provenientes das diferentes matrizes. Para a análise de TN-C, células U-373 MG silenciadas ou não foram extraídas com tampão de lise 1 (Tris-HCl 25mM pH7,5, contendo NaCl 250mM, EDTA 5mM, IGEPAL CA-630 1%). Para análise de vias de sinalização endoteliais, HUVECs semeadas por 22-24 horas sobre diferentes matrizes (matriz autóloga ou matrizes de células U-373 MG [selvagem, silenciada em TN-C ou transfectadas com siRNA controle]) eram lisadas com tampão de lise 2 (Tris 20mM pH 7,5, contendo NaCl 150mM, Triton X-100 1%), inibidores de protease (PMSF 1mM e leupeptina 40 μ M), inibidores de fosfatase (Na₃Vo₄ 1mM e NaF 5mM), EDTA e EGTA ambos a 5mM, por 15 minutos a 4°C. O extrato de cada condição foi centrifugado a 6000rpm, a 4°C por 10 minutos. Após a centrifugação recuperamos o sobrenadante e esse foi diluído em tampão de amostra (Tris 25 mM, pH 6.8 glicerol 10%, azul de bromofenol (ABF) 0,02%, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 5%) e as amostras aquecidas a 100°C por 5 minutos.

A eletroforese foi realizada em um sistema de mini-gel vertical (Mini-Protean II Tetra, Bio-Rad). As amostras foram aplicadas em géis de poli(acrilamida) com diferentes malhas, de acordo com o peso molecular da proteína de interesse. Assim, o gel fracionador foi preparado a 6% de acrilamida para análise da TN-C, ou 12% para análise da β -actina e p27, todos com gel espaçador a 3% de acrilamida. A corrida eletroforética foi realizada a 100V em tampão Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1% e o mesmo volume de cada condição foi aplicado nos poços. O padrão de peso molecular utilizado compreendia a faixa de 12 kDa a 225 kDa (Full-range Rainbow, GE Healthcare Life Sciences, São Paulo). Em seguida, as proteínas separadas foram eletrotransferidas para uma membrana de PVDF (Imobilon-P, Millipore, São Paulo), utilizada segundo as recomendações do fabricante. A membrana foi previamente preparada através de incubações sequenciais com metanol absoluto (3 segundos), água destilada (15 minutos) e tampão de transferência (5 minutos) (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e metanol 20%) e a transferência foi realizada em um sistema Trans-Blot para mini-gel (Bio-Rad), por 90 minutos a 100 V e a 4°C. A membrana foi bloqueada por um período de 18 horas com BSA 5% diluído em tampão TBS, a 4°C. Em seguida, as membranas foram incubadas por 18 horas a 4°C com diferentes anticorpos para cada proteína de interesse:

monoclonal anti-TN-C humana (1:4000), anti-actina (concentração de uso: 8µg/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA) ou anti-P27^{KIP1} (1:1000; *Cell Cycle Regulation Sampler kit*; Cell Signaling, Danvers, MA, EUA). Após a incubação com anticorpos primários as membranas passaram por sucessivas lavagens com TBS-T e foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados a HRP (1:2000; anti-Igs de camundongo ou coelho, Dako, Patts, Suécia) por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T. Após as sucessivas lavagens, as membranas foram incubadas com um reagente quimioluminescente (ECL, GE Healthcare Life Sciences, São Paulo) e exposto ao filme recomendado (ECL), de acordo com as instruções do fabricante. O filme revelado foi digitalizado e a densidade das bandas reveladas foi quantificada por análise no programa Adobe-Photoshop, versão 6.0.

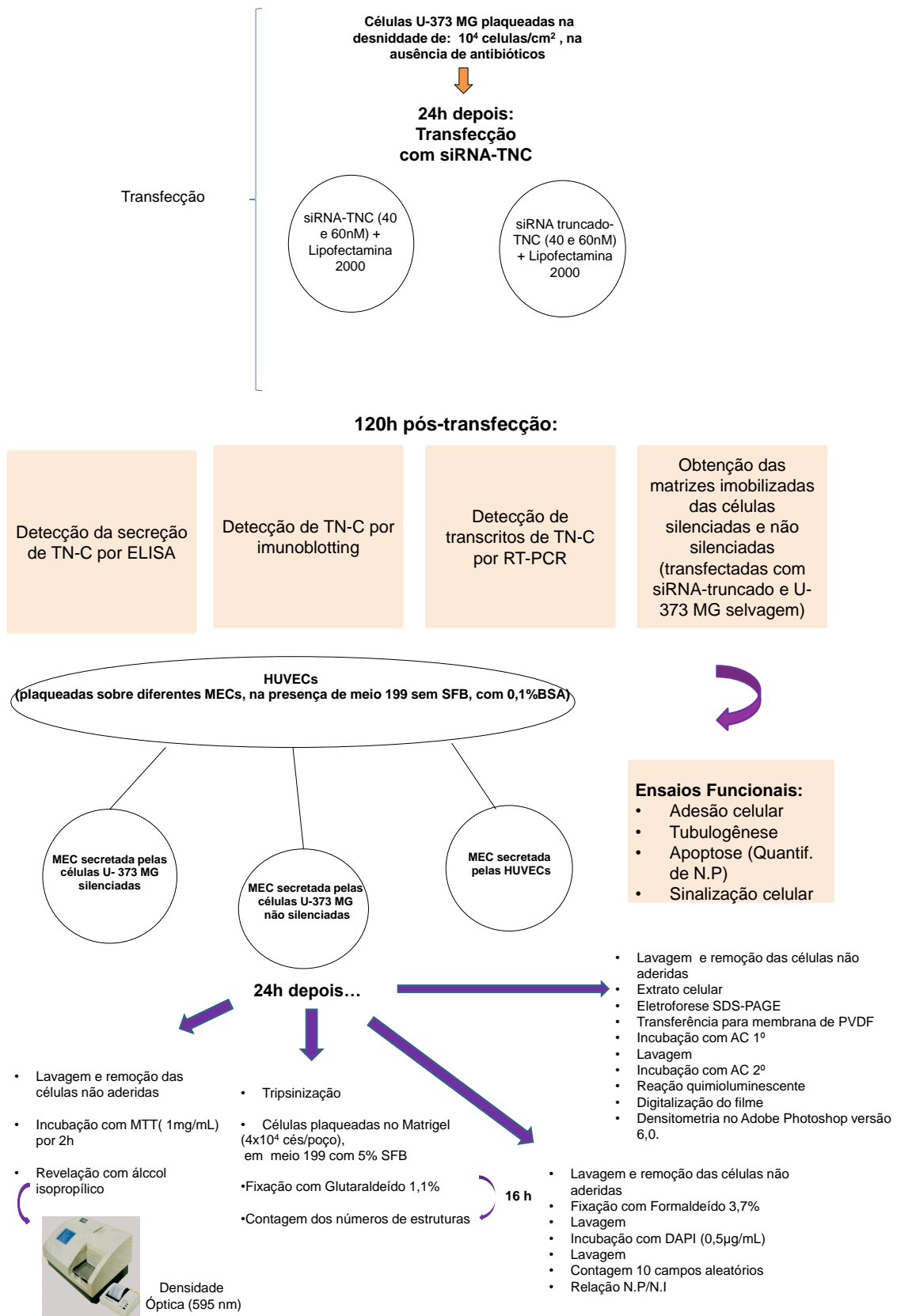
1.12 Quantificação da formação de núcleos picnóticos

Células U-373 MG silenciadas para a expressão de TN-C ou transfectadas com siRNA controle, células U-373 MG selvagens e HUVECs foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 células/cm², em placas de 24 poços por 72 horas. Posteriormente, as células foram lisadas, de acordo com o procedimento descrito no item 2.9, para a obtenção das matrizes imobilizadas. Em seguida, HUVECs foram tripsinizadas, contadas e plaqueadas na densidade de 5×10^4 células/cm² sobre essas matrizes, em meio 199 suplementado com 0,1% BSA, por 24 horas. Após esse período, todos os poços foram lavados, com meio 199 sem SFB. Em seguida, as células foram fixadas com formaldeído 3,7% diluído em PBS 1x, por 10 minutos, em temperatura ambiente. Três lavagens com PBS 1x (3 minutos cada) foram realizadas e as células permeabilizadas com Triton X-100 0,2% diluído em PBS, por 5 minutos. Posteriormente sucessivas lavagens com PBS 1x foram realizadas (3 minutos cada) e as condições incubadas com DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA) diluído (1:2000) em PBS suplementado com 0,1% BSA, em temperatura ambiente, por 30 minutos. Por fim, novamente todos os poços foram lavados com PBS 1x (3 minutos cada lavagem) e a quantificação dos núcleos picnóticos foi realizada através da contagem de 10 campos aleatórios. A correlação entre o número de núcleos picnóticos (N.P) e o número de núcleos intactos (N.I) por campo [N.P/N.I] foi estabelecida.

1.13 Análise Estatística

As análises foram realizadas no programa Excel (Microsoft 2010) utilizando o teste T de Student. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados são relatados como média \pm DP.

Figura 8 - Esquema geral da estratégia experimental



Fonte: A autora, 2013.

2 RESULTADOS

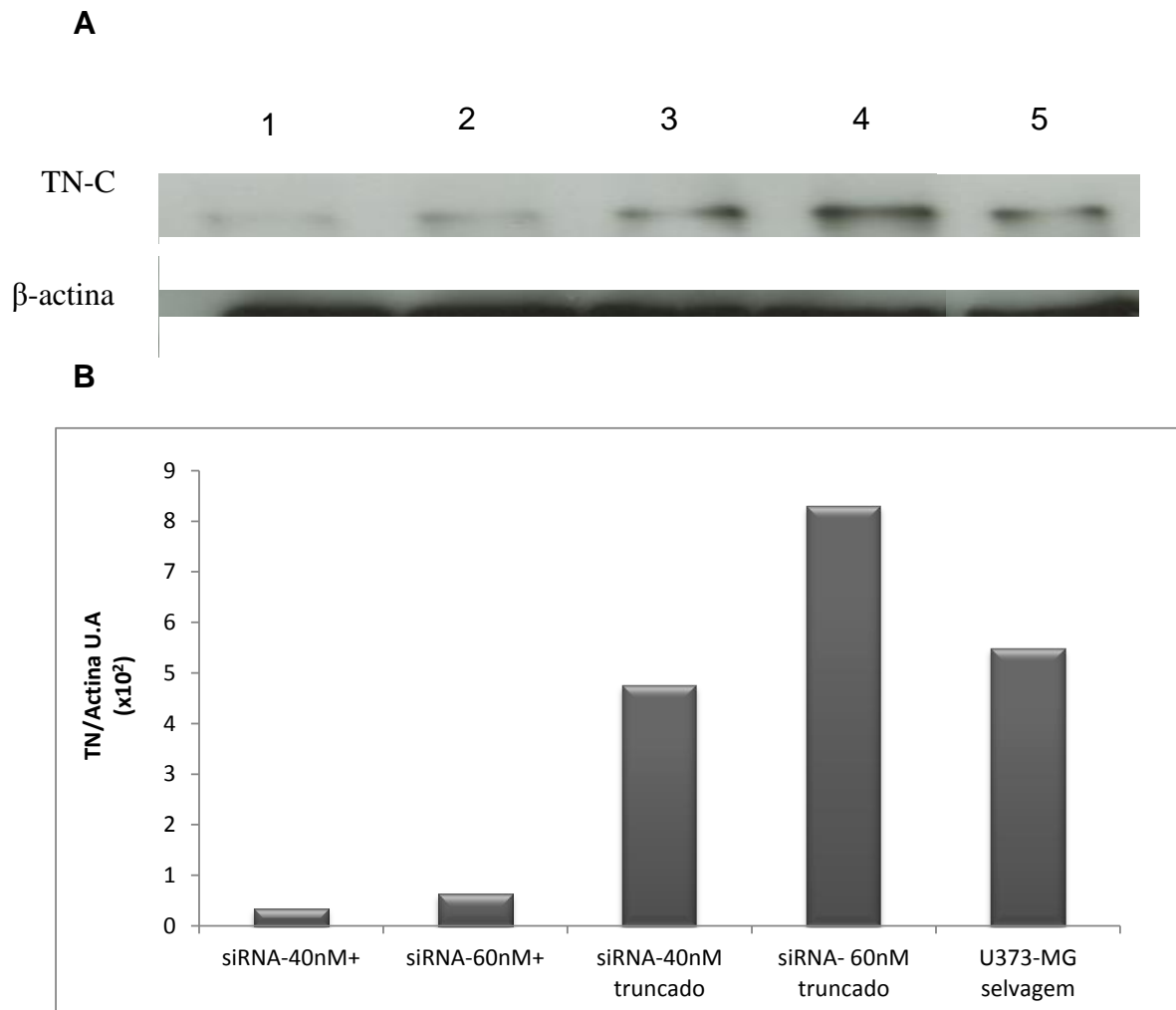
2.1 Silenciamento da TN-C na linhagem U-373 MG

Com o objetivo de diminuir a expressão de TN-C em células de astrocitoma da linhagem U-373 MG, estas foram transfectadas com siRNA, utilizando como agente transfectante a lipofectamina 2000.

Em experimentos preliminares, alguns parâmetros fundamentais do procedimento de transfecção e silenciamento por RNA de interferência para esta linhagem especificamente - concentração do siRNA, o tempo de transfecção e a persistência do silenciamento – foram padronizados com auxílio do *BLOCK-iT™ Transfection Optimization Kit*, que utiliza um siRNA direcionado a proteína p53. Determinamos que um silenciamento de 50% da expressão era observado 144 horas após a transfecção e se mantinha estável por todo o período analisado (**Anexo I, Fig. A1**) (Fernandes, 2011). De forma complementar, antes de efetivamente iniciarmos experimentos com células U-373 MG silenciadas, a expressão de TN-C foi acompanhada até 7 dias (\cong 170 horas) após o processo de transfecção, por *western blotting*, que mostrou uma persistência de silenciamento de aproximadamente **75%** (**Anexo I, Fig. A2**).

Para a finalidade do presente trabalho, que era o de obter matrizes secretadas por células tumorais silenciadas para estudos funcionais, as células precisariam produzir matriz por pelo menos 72 horas, contadas a partir de sua readaptação ao meio de crescimento regular, após o procedimento de transfecção (etapa preliminar que consome outras 72 horas). Desta maneira, inicialmente estimou-se que o tempo médio de 120 horas pós-transfecção seria adequado para a secreção das matrizes. Além disso, comparamos a eficácia de duas concentrações de siRNA. De fato, pudemos observar uma redução significativa na expressão final da proteína em ambas as concentrações de siRNA testadas (40 nM e 60 nM), quando a TN-C foi detectada por *western blotting* no extrato celular das culturas transfectadas (**Figura 9**). A menor concentração (40nM) se mostrou tão efetiva quanto a maior concentração utilizada (60nM), as quais resultaram em \cong 97 % e 92% de silenciamento, respectivamente. Assim, neste trabalho optamos por utilizar a concentração de 40 nM nos ensaios subsequentes.

Figura 9- Análise da expressão de TN-C por Western Blotting.



Legenda: A expressão de TN-C em células de astrocitoma U-373 MG transfectadas com concentrações distintas de siRNA (40 e 60nM) foi analisada 120h após a transfecção. (A) Extratos celulares foram submetidos a uma corrida eletroforética e transferidas para uma membrana de PVDF (Immobilon-P). A membrana foi incubada com um anticorpo monoclonal anti-TN humana, que foi detectado indiretamente, por um sistema de quimioluminescência, conforme descrito na Metodologia. A β -actina foi usada como controle de *loading*. Condições: 1- siRNA-40nM+; 2- siRNA-60nM+; 3- siRNA-40nM truncado; 4- siRNA-60nM truncado, 5- U-373 MG selvagem. (B) As bandas eletroforéticas foram analisadas por ferramenta de quantificação de pixels dos filmes digitalizados com resolução de 200 dpi, com auxílio do programa Adobe Photoshop (versão 6.0). (n=2, gráfico representativo de um experimento típico).

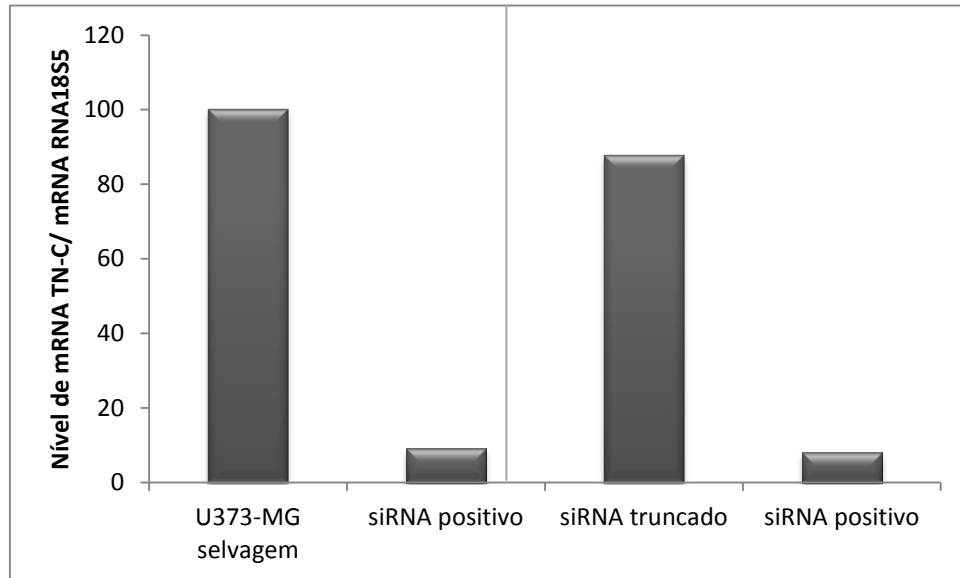
A análise por RT-PCR em tempo real foi realizada através da quantificação relativa do nível de expressão de mRNA da TN-C normalizado pelo nível de mRNA da unidade ribossomal 18s, a qual foi utilizada como gene constitutivo (*RNAI8S5*). A normalização da expressão quando calculada em relação ao controle com células U-373 MG não transfectadas, forneceu uma taxa de silenciamento de 92%, enquanto a normalização em relação ao controle siRNA-truncado apontou para uma taxa de 90% de silenciamento (**Figura 10**), resultando em uma média percentual de 91% de silenciamento. Analisamos os níveis de TN-C secretada nos meios condicionados das células U-373 MG transfectadas com siRNA ou com siRNA-controle (truncado) através de um ELISA qualitativo (**Figura 11 e Anexo I, Fig. A3**). Neste procedimento, os meios condicionados foram diretamente incubados em placas de ELISA e o teor de TN-C estimado a partir de valores obtidos para uma curva-padrão. Por este método, a quantidade de TN-C secretada por células silenciadas com 40 nM de siRNA específico para a TN-C foi indetectável.

Consideradas conjuntamente, as diferentes análises da expressão de TN-C permitem concluir que, no período pós-transfecção necessário para se obter matrizes tumorais nativas para ensaios funcionais com células endoteliais, as células U-373 MG mantiveram-se silenciadas em índices superiores a 90%.

2.2 O silenciamento de TN-C em células U-373 MG resulta em aumento da adesão de células endoteliais à matriz tumoral

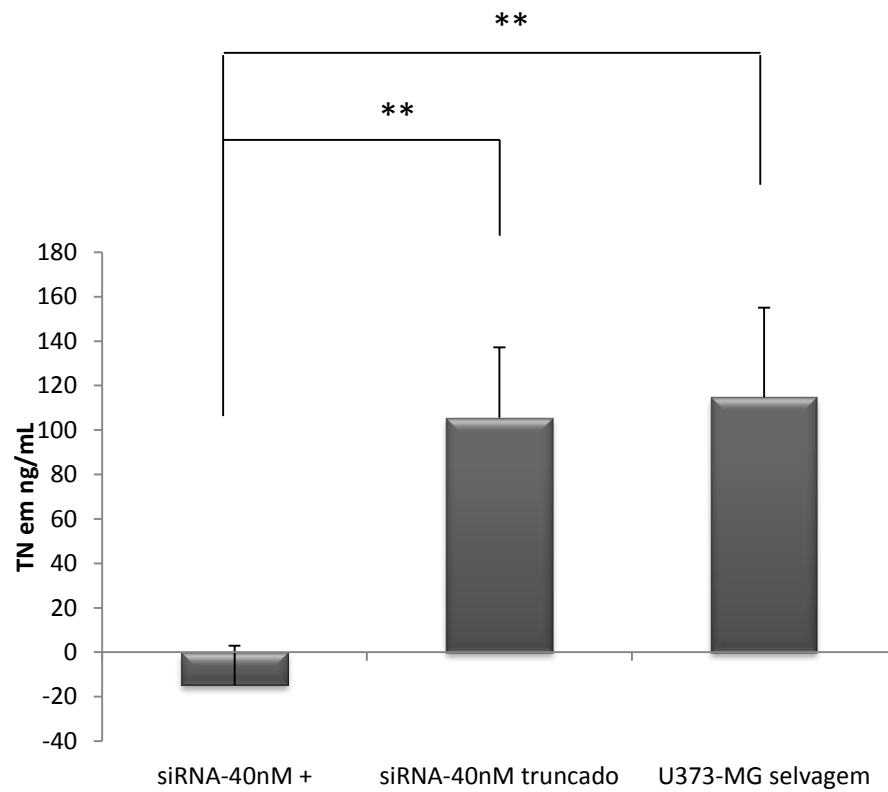
Conforme já mencionado na Introdução a este trabalho, a matriz do astrocitoma U-373 MG promove a desaderência de um sub-população de HUVECs, ao longo de 24 horas de cultivo, em um processo de *anoikis* relacionado ao balanço entre a quantidade de FN e TN-C incorporadas na matriz tumoral (Alves et al, 2011). Procuramos então verificar se o silenciamento de TN-C em células U-373 MG resulta em modificação dos parâmetros de adesão endotelial previamente observados.

Figura 10- Nível de expressão de mRNA para TN-C normalizado pelo nível de mRNA 18S.



Legenda: Os níveis de mRNA foram quantificados por RT-PCR em tempo real, conforme o procedimento descrito na Metodologia. O mRNA 18S foi utilizado como controle interno de expressão (gene de referência) (n=1).

Figura 11- Detecção de TN-C por ELISA indireto.



Legenda: HUVECs (10^5 células/cm²) silenciadas ou não para a expressão de TN-C foram plaqueadas em meio livre de soro por 72 horas. Os meios foram coletados, clarificados por centrifugação, quantificados para determinação do teor de proteínas totais e utilizados para detecção de TN-C através de um ELISA semi-quantitativo indireto, conforme descrito na Metodologia. A reação colorimétrica foi quantificada em um leitor de microplacas a 490nm. A análise estatística foi realizada com base no teste T de Student com o auxílio do Microsoft Excel - versão 2010. Média de três experimentos independentes. **p<0,01.

A **Figura 12** mostra que a diminuição de TN-C nas matrizes tumorais resulta em um pequeno (\cong 18%, em média), porém significativo aumento na taxa de adesão endotelial. A taxa de adesão endotelial, no entanto, continua significativamente menor que a obtida com matrizes autólogas (produzidas pelas próprias células endoteliais).

2.3 Análise da apoptose por quantificação de núcleos picnóticos

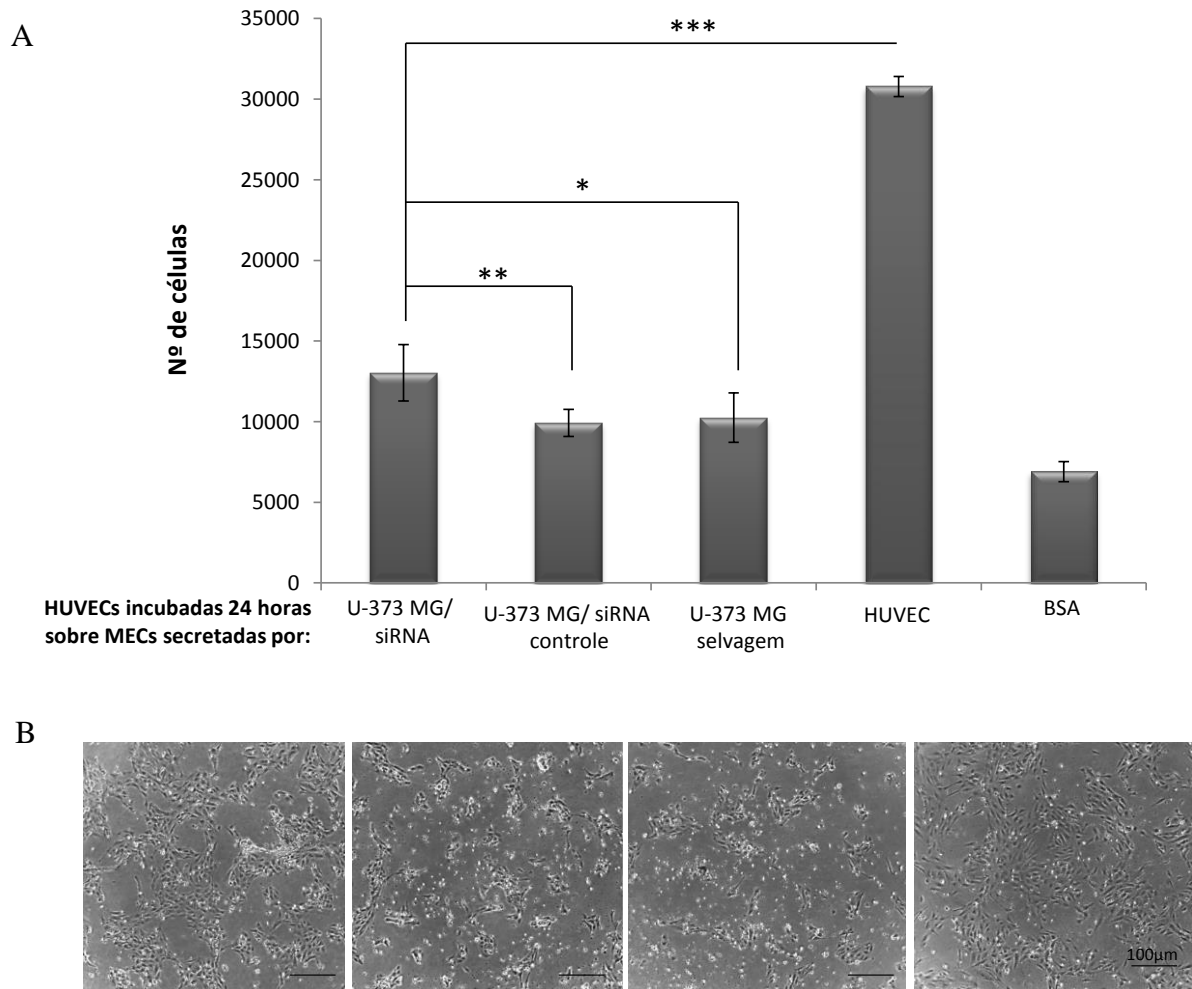
A adesão célula-matriz mediada pelas integrinas gera sinais de sobrevivência, e uma vez que esses sinais são bloqueados a partir da desaderência celular da matriz a *anoikis* é induzida (Zhan *et al*, 2004). Em nosso modelo de estudo, a matriz do astrocitoma U-373 MG, rica em TN-C, parece afetar tal sinalização, provavelmente disparando uma cascata de eventos que culminam com a apoptose de parte das células que permaneceram em longo contato com esta matriz.

A fim de investigarmos este aspecto, realizamos um ensaio de quantificação de núcleos picnóticos, característicos de etapas tardias de apoptose, após a incubação das HUVECs com diferentes matrizes. Após 24 horas de incubação com matrizes produzidas por células tumorais silenciadas, células endoteliais apresentaram uma menor proporção de núcleos picnóticos, quando comparadas a HUVECs incubadas com a matriz de células U-373 MG não silenciadas (selvagens) e com a matriz produzida por células que receberam siRNA controle. De forma concordante com o ensaio de adesão (item 3.2), o menor índice de núcleos picnóticos foi observado em células endoteliais semeadas sobre matriz autóloga (**Figura 13**).

2.4 Modulação da tubulogênese endotelial pela matriz produzida por células U-373 MG silenciadas para a expressão de TN-C

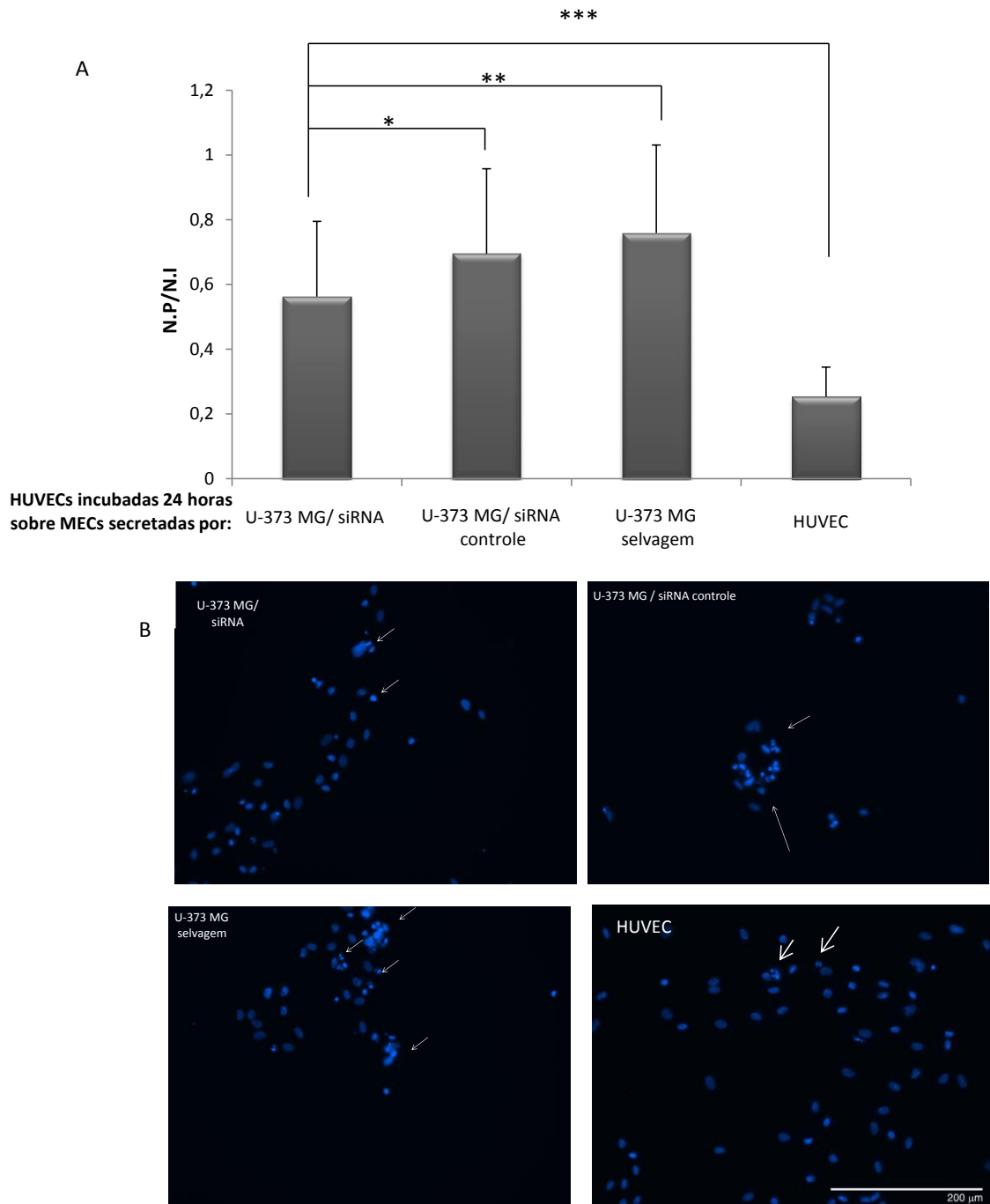
Anteriormente, nosso grupo mostrou que matrizes de astrocitomas ricas em TN-C são também capazes de selecionar células endoteliais resistentes à *anoikis* altamente proliferativas, porém apresentam uma acentuada disfunção do processo tubulogênico.

Figura 12- Adesão de células endoteliais sobre matrizes imobilizadas.



Legenda: (A) Matrizes imobilizadas foram obtidas após o cultivo de células U-373 MG (silenciadas ou não) e HUVECs por 72 horas. HUVECs foram plaqueadas sobre as diferentes matrizes por 24 horas e células não aderentes foram removidas. As células aderentes foram quantificadas pelo método do MTT, conforme descrito na Metodologia. (B) Aspecto morfológico das células semeadas sobre as diferentes matrizes. As análises estatísticas foram realizadas aplicando o Teste T de Student do Microsoft Excel versão 2010.* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (n=3, gráfico representativo de um experimento típico e reprodutível).

Figura 13- Avaliação de núcleos endoteliais picnóticos após o contato com diferentes matrizes.



Legenda: (A) HUVECs aderidas sobre diferentes substratos por 24 horas foram fixadas com formaldeído 3,7%, permeabilizadas com Triton X-100 0,2% e marcadas com DAPI. O número de núcleos picnóticos e o de núcleos íntegros foram contados em microscópio de fluorescência (magnificação: 20 X). A quantificação foi realizada em dez campos aleatórios e em triplicata para cada condição. Foi estabelecida uma relação entre núcleos picnóticos (NP) e núcleos íntegros (NI). (B) Fotos representativas das condições analisadas. As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste T de Student no Microsoft Excel (versão 2010). (n=2, gráfico representativo de experimentos independentes). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A relação FN:TN-C nas matrizes tumorais também foi relacionada a este fenótipo, tal como demonstrado pelo uso de ambas as proteínas isoladas, na forma de substratos imobilizados mistos (Alves *et al*, 2011).

A supressão da TN-C em matrizes nativas por silenciamento mostrou que este procedimento também restaurou parcialmente a capacidade tubulogênica das células endoteliais (**Figura 14**).

Desta maneira, os dados mostrados até este ponto do trabalho permitem afirmar que a estratégia de silenciamento da expressão da TN-C em células de astrocitoma U-373 MG resulta na normalização parcial da capacidade adesiva, de sobrevivência e de diferenciação angiogênica de células endoteliais.

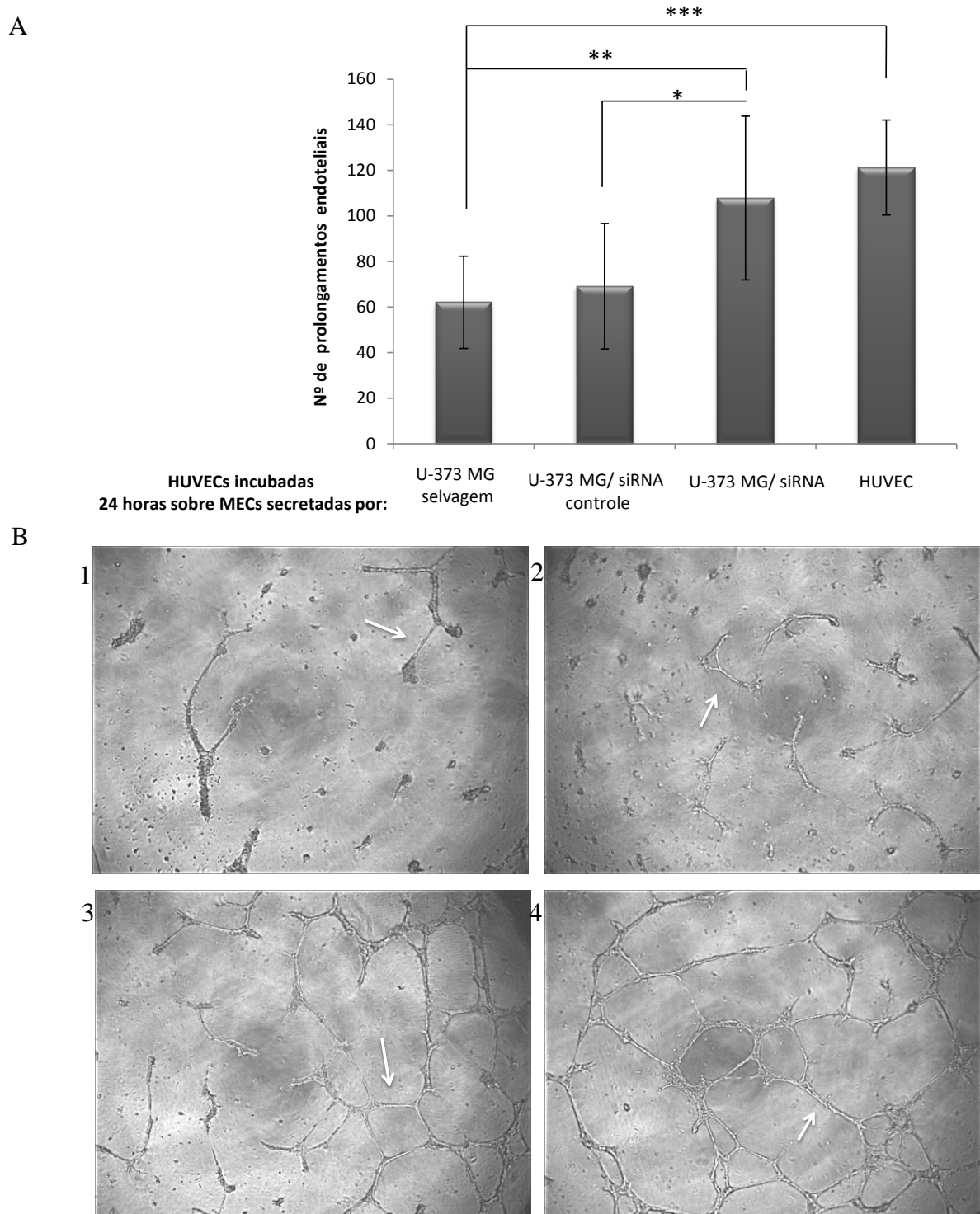
2.5 Estudo da expressão da proteína p27

Estudos preliminares por nosso grupo sugerem que um dos fatores envolvidos na seleção de duas diferentes sub-populações endoteliais por matrizes ricas em TN-C - quais sejam, células que entram em *anoikis* e células resistentes à *anoikis* - é a transição das células por fases do ciclo celular. Na verdade, a sincronização de culturas de HUVECs por deprivação de soro antes de sua incubação com matrizes nativas ou suportes imobilizados pobres em TN-C suprime o fenótipo apoptótico (Alves, 2007).

O inibidor de complexos ciclina-CDK p27^{kip1}, além de atuar como um modulador negativo do ciclo celular vem sendo relacionado com a regulação de outras funções celulares, como apoptose e diferenciação celular (Goukassian *et al*, 2001; Chu *et al*, 2008). A fim de iniciarmos o estudo de reguladores do ciclo celular, buscamos verificar uma possível relação entre a expressão do p27 e a modulação tanto da apoptose quanto da diferenciação endotelial no contexto de nosso modelo.

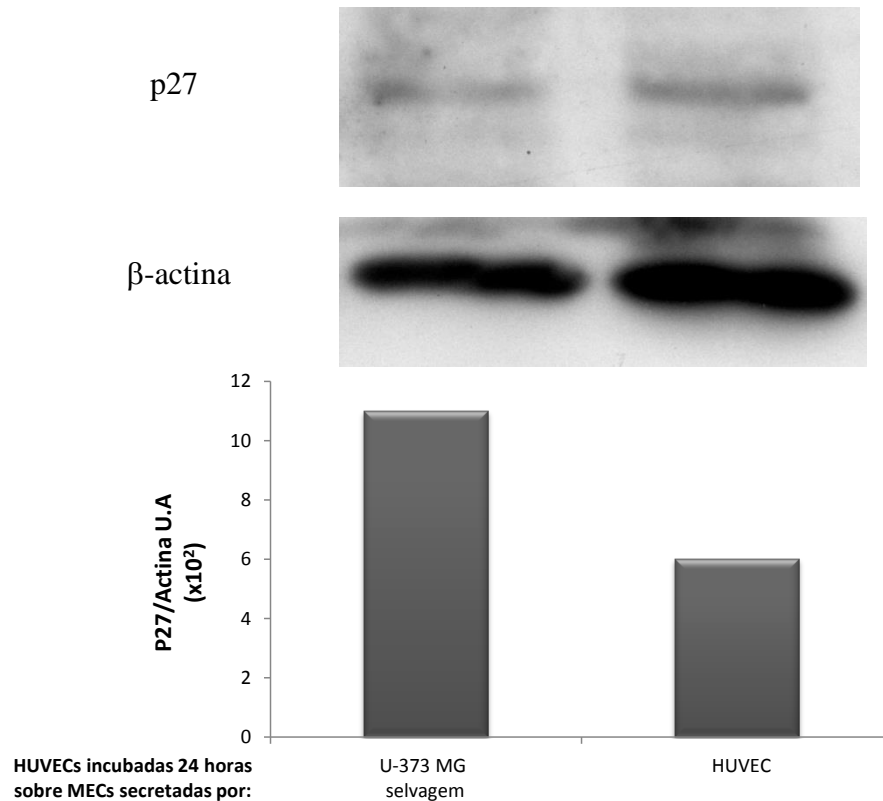
Primeiramente, analisamos a expressão de p27 em HUVECs após a incubação das células endoteliais com matriz de U-373 MG selvagem e com a matriz autóloga. Essa análise preliminar revelou um aumento da expressão da proteína p27 nas HUVECs após 24 horas de contato com a matriz de astrocitoma, quando comparada com a expressão das HUVECs provenientes de sua própria matriz nativa (**Figura 15**).

Figura 14- Ensaio de diferenciação angiogênica *in vitro*.



Legenda: (A) Após 24h de incubação sobre diferentes matrizes imobilizadas, HUVECs foram tripsinizadas e plaqueadas em Matrigel (2×10^5 células/cm²). Dezesesseis horas depois, as culturas foram fixadas com glutaraldeído 1,1% e o número de prolongamentos endoteliais quantificados. (B) Aspecto morfológico das estruturas: (1) U-373 MG selvagem; (2) U-373 MG com siRNA controle; (3) U-373 MG com siRNA positivo; (4) HUVEC. As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste *T* de Student (Microsoft Excel versão 2010) (média de três experimentos independentes). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

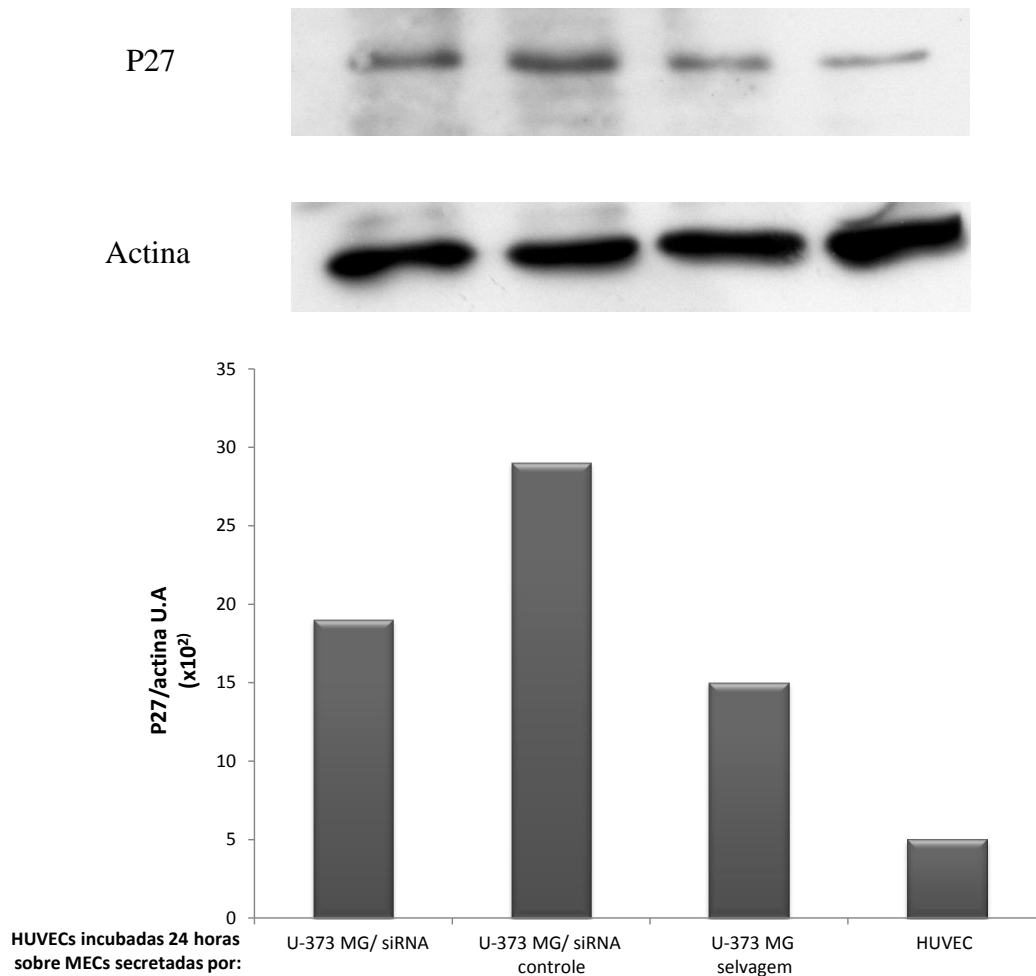
Figura 15- Análise da expressão da proteína p27 por Western blotting.



Legenda: A proteína p27 foi detectada em extratos celulares de HUVECs previamente incubadas por 24 horas com matriz secretada por células U-373 MG selvagens ou sobre matriz autóloga, conforme descrito na Metodologia. A quantificação de pixels das bandas proteicas reveladas nos filmes por reação quimioluminescente foi realizada usando o Adobe Photoshop versão 6.0. (n=3, gráfico representativo de um experimento característico e reprodutível).

Uma vez identificado que as distintas composições matriciais são capazes de gerar diferentes níveis de expressão da proteína p27, resolvemos então analisar se a presença da TN-C na matriz do glioma encontra-se associada a essa resposta. Para isso, avaliamos a expressão final da proteína p27 após a incubação com matriz secretada por células silenciadas para TN-C. HUVECs que passaram pela matriz depletada em TN-C apresentaram expressão de p27 comparável ao das HUVECs previamente incubadas com matrizes secretadas por células U-373 MG selvagens (**Figura 16**). Desta maneira, concluímos que o silenciamento da TN-C na matriz da U-373 MG não foi capaz de modular a expressão da proteína p27 em células endoteliais.

Figura 16 - Análise da expressão da proteína p27 em células endoteliais: efeito do silenciamento da TN-C.



Legenda: HUVECs foram semeadas (4×10^4 células/cm²) sobre diferentes matrizes (U-373 MG silenciada em TN-C, U-373 MG transfectada com siRNA truncado, U-373 MG selvagem e matriz autóloga da HUVEC) por 24 horas. Extratos celulares de cada condição foram obtidos e a expressão da proteína p27 foi analisada por *Western blotting*, conforme descrito na Metodologia. A quantificação de pixels das bandas proteicas reveladas nos filmes por reação quimioluminescente foi realizada usando o Adobe Photoshop versão 6.0. (n=2, gráfico representativo de experimentos independentes).

3 DISCUSSÃO

A adesão célula-matriz está relacionada com a regulação de uma diversidade de funções, dentre elas a organização do citoesqueleto e sua contração, já citadas anteriormente, proliferação, sobrevivência, migração celular, expressão gênica, sinalização durante a morfogênese, homeostase tecidual e tumorigênese (Berrier & Yamada, 2007; Hynes, 2009; Hanein & Horwitz, 2012). Os sinais emitidos tanto por pontos de adesão estáveis quanto pelos recém-formados são capazes de influenciar a organização do citoesqueleto e a polimerização de actina, assim como as estruturas do citoesqueleto são capazes de influenciar a formação e a desorganização das adesões (Parsons *et al*, 2010).

Em relação à estrutura, as adesões podem ser classificadas em quatro tipos: adesão nascente, complexo focal, adesão focal e fibrilar (Lock *et al*, 2008; Hanein & Horwitz, 2012). As integrinas e os proteoglicanos constituem os principais receptores de adesão à matriz extracelular, cooperando em eventos de sinalização (Kim *et al*, 2011). Ambos os receptores, mas principalmente as integrinas, na adesão célula-matriz realizam a associação do citoesqueleto a membrana plasmática por meio do seu domínio intracelular, enquanto que no seu domínio extracelular eles direcionam e organizam a deposição da matriz (Berrier & Yamada, 2007; Byron *et al*, 2010). Assim, a associação desses receptores com a MEC possibilita que essa atue não apenas conferindo suporte estrutural e mecânico, mas também seja responsável por direcionar distintos eventos de sinalização (Kim *et al*, 2011).

Considerando que a composição, a organização e as propriedades mecânicas da matriz atuam na regulação da adesão (Parsons *et al*, 2010), diferentes composições de MEC resultam em respostas celulares distintas e específicas (Schlie-Wolter *et al*, 2013). Analisando a composição do estroma da maioria dos tumores do sistema nervoso central, dentre eles, o glioblastoma, é possível identificar o aumento de uma gama de proteínas como metaloproteases, colágeno tipo IV e laminina (Hirata *et al*, 2009), fibronectina e vitronectina (Zamecnik, 2005). Principalmente, nota-se a elevada presença da TN-C, detectada tanto na matriz quanto nos tecidos perivasculares de gliomas de alto grau (Zamecnik, 2005), em um padrão de expressão inverso ao de FN, porém capaz de modular a adesão em substratos ricos em FN (Huang *et al*, 2001; Bellail *et al*, 2004; Van Obberghen-Schilling *et al*, 2011).

Em contrapartida, a matriz extracelular com a qual tanto as células endoteliais quanto os pericitos estabelecem contato também varia a sua composição de acordo com tipo e o estado do vaso (quiescente, lesionado ou angiogênico) onde se encontram (Hynes, 2007). A

membrana basal vascular é constituída por componentes estruturais como diferentes tipos de laminina (411, 421, 511, 521), colágeno IV e V e fibronectina, além de outras proteínas que atuam como pontes, facilitando a co-organização dos componentes da membrana basal (Bellail *et al*, 2004; Stratman & Davis, 2012). Dentre estes, encontram-se os nidogênios 1 e 2 e o proteoglicano de heparan sulfato perlecan (Stratman & Davis, 2012). A vitronectina e entactina também estão presentes (Bellail *et al*, 2004).

Portanto, dadas as mudanças de composição na matriz extracelular provocadas pela progressão de tumores, é esperado que as interações célula-matriz ao longo do processo angiogênico também se modifiquem (Hynes, 2007). De fato, ao compararmos a matriz tumoral com a matriz das células endoteliais, nos últimos anos, tem sido possível identificar moléculas que exercem papel-chave na modulação do processo angiogênico. Observações anteriores do nosso grupo indicaram que a interferência exercida pela TN-C nas propriedades adesivas da FN pode ser um dos fatores preponderantes na regulação da tubulogênese endotelial, no contexto das matrizes alteradas e ricas em TN-C, prevalentes nos astrocitomas (Alves *et al*, 2011). Ainda que tenhamos obtido evidências de tal mecanismo ao utilizarmos substratos adesivos mistos, elaborados com preparações purificadas destas duas proteínas – TN-C e FN – tornava-se ainda necessário analisar o efeito da manipulação dos níveis de TN-C incorporada na matriz das células tumorais, porém sem significativas alterações na composição de outras moléculas naturalmente secretadas e presentes na matriz nativa.

No presente trabalho, realizamos então o silenciamento da expressão de TN-C na linhagem U-373 MG, visando posteriormente avaliar a resposta promovida pela matriz do glioma nas células endoteliais, através de ensaios funcionais relacionados com a diferenciação angiogênica. Verificamos que o silenciamento da TN-C resultou em um incremento da adesão de células endoteliais, conforme esperado a partir de nossas observações anteriores, de que a adesão à matriz tumoral é um fator-chave que seleciona sub-populações endoteliais com diferentes respostas angiogênicas. Nós observamos, porém, que o silenciamento não foi capaz de elevar a taxa de adesão àquela observada para as HUVECs plaqueadas sobre sua própria matriz, obtendo-se um aumento médio limitado a cerca de 18%, quando comparado ao efeito da matriz produzida por células U-373 MG selvagens. Apesar desta observação poder estar relacionada a diferentes causas, a maior incorporação de FN nas matrizes endoteliais, que é cerca de 20 vezes maior que na matriz da linhagem U-373 MG (Alves *et al*, 2011), possivelmente é o fator mais relevante a ser considerado para esta resposta.

No entanto, deve ser destacado que tal resultado corresponde à adesão endotelial remanescente após 24 horas de incubação sobre a matriz tumoral. Nós já havíamos observado que os eventos de desaderência (*anoikis*) de células incubadas com matrizes de gliomas se iniciavam a partir de 6 horas de contato célula-matriz (Alves et al, 2011), sem que nenhuma diferença na taxa de adesão primária (até $t = 2$ horas) fosse perceptível. A partir deste tempo, os eventos de desaderência se intensificavam rapidamente, culminando com a seleção, após 24 horas, de uma sub-população resistente, que se mantinha aderida e viável. Por esta razão, precisaremos ainda estudar a adesão endotelial em tempos mais curtos, a fim de verificar se o silenciamento de TN-C no astrocitoma causa alguma mudança na adesão inicial das células endoteliais, bem como se a dinâmica de indução de *anoikis* se repetirá nestas condições.

Anoikis é uma palavra grega que significa “sem abrigo”, e refere-se a apoptose induzida pela perda de adesão ou adesão inapropriada entre a célula e a matriz (Gilmore, 2005; Chiarugi & Giannoni, 2008). No presente trabalho, após 24 horas de contato com a matriz produzida por células U-373 MG silenciadas para a expressão de TN-C, as células endoteliais apresentaram uma redução significativa de núcleos apoptóticos, quando comparadas ao observado nas HUVECs incubadas com matriz de U-373 MG selvagem. Estes resultados sugerem que a presença de TN-C na matriz do glioma, além de ser capaz de interferir na adesão das HUVECs sobre essa matriz, também influencia a sinalização de sobrevivência e morte nessas células. No entanto, o percentual de *anoikis* dessas células continuou significativamente mais elevado do que o observado após incubação com a matriz endotelial própria, sugerindo uma vez mais que a matriz tumoral deve ser desprovida de outros fatores essenciais à homeostase endotelial (fibronectina, provavelmente).

Dados anteriores do grupo já haviam demonstrado que as HUVECs são protegidas da apoptose através da adesão via sindecan-4 em substratos ricos no domínio N-terminal da glicoproteína TSP-1 (Ferrari do Outeiro-Bernstein *et al*, 2002). Assim, é possível que a interferência exercida pela TN-C na ligação da FN ao sindecan-4 (Huang *et al*, 2001), o qual atua como co-receptor da integrina $\alpha_5\beta_1$, seja o mecanismo responsável pelo descolamento das HUVECs da matriz do glioma, e conseqüentemente, através da interrupção dessa ligação, ou até mesmo de outras associações, pela TN-C, estimule o desligamento de vias anti-apoptóticas e favoreça a ativação de vias pró-apoptóticas. Outro estudo mais recente também demonstrou a importância da sinalização emitida pelo sindecan-4 no controle da sobrevivência celular. A expressão do sindecan-4 é capaz de reduzir a apoptose de cardiomiócitos, impedindo a expansão dos danos no miocárdio após o infarto (Echtermeyer *et al*, 2011). Dessa forma,

podemos inferir uma possível relação entre a TN-C, o sindecán-4 e a apoptose nas células endoteliais, que será investigada nas próximas etapas.

O processo de formação de estruturas tubulares por células endoteliais requer a associação das células entre si, em processos que envolvem migração celular e mecanismos de adesão célula-célula e célula-matriz (Hynes, 2007). De forma geral esta diferenciação envolve, além das etapas de adesão e migração celular, o alinhamento das células segundo mecanismos que envolvem a sinalização pelo sistema Delta-like/Notch, a secreção de proteases e a formação de lúmen, culminando com a formação do tubo (Arnaoutova *et al*, 2009; Davis *et al*, 2011). O desenvolvimento de modelos *in vitro* de diferenciação das células endoteliais, que permitem a observação da formação de tubos em matrizes extracelulares tridimensionais, possibilitou a identificação de moléculas e vias de sinalização que participam dos eventos críticos durante o processo de formação do lúmen (Davis *et al*, 2011), assim como da angiogênese como um todo (Arnaoutova *et al*, 2009).

Observamos que, diferentemente dos efeitos discretos obtidos no ensaio de adesão celular, o silenciamento da expressão de TN-C na linhagem U-373 MG produziu uma matriz capaz de reverter drasticamente o defeito tubulogênico observado nas HUVECs incubadas com a matriz produzida por células tumorais não silenciadas. A regulação do processo de diferenciação também foi associada a determinadas moléculas da matriz extracelular, que podem modular a formação de gradiente e difusão do VEGF-A (Mettouchi, 2012). A FN vem sendo descrita neste aspecto, como “organizadora” das funções do VEGF-A (revisto por Mettouchi, 2012). Por exemplo, Wijelah e colaboradores demonstraram que a associação do VEGF com a FN amplifica os seus efeitos biológicos, especificamente a ativação sustentada de MAP Kinase e a migração de células endoteliais (Wijelah *et al*, 2002), através da associação entre a integrina $\alpha_5\beta_1$ e o receptor VEGFR-2, ambas respostas importantes durante o processo de diferenciação endotelial. Ainda, outro grupo demonstrou recentemente, em ensaios *in vivo*, que retinas deficientes em FN astrocítica apresentaram redução na migração dos vasos - medida pela expansão radial do plexo vascular - e excessiva formação de filopódios das células-líderes, porém com vasos de comprimento reduzido (Stenzel *et al*, 2011).

Assim, fica clara a importância não apenas da presença, mas também da funcionalidade da FN na matriz extracelular para a morfogênese vascular. Em nossos ensaios de diferenciação, utilizamos uma matriz de lâmina basal (Matrigel®) pobre em fatores de crescimento, mas que deve ainda conter algum teor destes, na forma biologicamente ativa. Os ensaios de

tubulogênese foram ainda realizados em 5% de soro fetal bovino, que provavelmente provê fatores derivados de plaquetas, com atividade potencialmente pró-angiogênica e que devem exercer efeitos ativadores sobre as células endoteliais. Assim, a possibilidade de que a diminuição de TN-C nas matrizes, através do silenciamento, possa tornar mais eficaz o papel da FN tumoral - presente em pequenas quantidades, mas talvez suficientes para potencializar a ativação do VEGFR2 - é um tópico que precisaremos aprofundar no futuro. Um indício dessa possível interferência da TN-C está relacionada com o sítio de ligação do VEGF-A à FN, que foi localizado no domínio Hep II nas repetições tipo III 13-14 da molécula de fibronectina (Wijelah *et al*, 2002): esta região também corresponde ao sítio de ligação da TN-C à FN (Huang *et al*, 2001), sendo portanto possível que uma competição pela ligação ao domínio Hep II possa ocorrer entre a TN-C e o VEGF-A. A regulação da expressão de receptores para fatores angiogênicos na superfície de células endoteliais incubadas com as diferentes matrizes nativas também é um aspecto que estamos investigando neste momento.

Observações anteriores de nosso grupo indicaram que a capacidade da matriz de astrocitomas de induzir *anoikis* em HUVECs é regulada pelo ciclo celular, uma vez que a sincronização das culturas endoteliais na fase G₀/G₁, antes da incubação com as matrizes de astrocitoma, torna mais de 90% destas competentes na adesão de longo prazo (até 24 horas) a estas matrizes (Alves, 2007 – dados não publicados). O progresso do ciclo celular é finamente regulado por diferentes quinases dependentes de ciclinas (CDKs) (Lee & Kim, 2009). A atividade das CDKs pode ser controlada por inúmeros mecanismos, como fosforilação e desfosforilação, a ligação de diferentes ciclinas, regulação transcricional, degradação de proteínas, sua localização e pela associação com inibidores (Kaldis, 2007). Dessa forma, as CDKs são reguladas por diferentes inibidores de quinases dependentes de ciclinas, denominados CKIs (Borriello *et al*, 2007; Lee & Kim, 2009). O p27, também conhecido como Kip1 (Chu *et al*, 2008), é um CKI e atua principalmente controlando a progressão da fase G₀ para fase S do ciclo celular (Drexler, 2003; Chu *et al*, 2008). As proteínas CIP/KIP, diferentemente das proteínas da família INK4, interagem com o complexo ciclina-CDK e não apenas com a subunidade CDK (Borriello *et al*, 2007; Lee & Kim, 2009).

Até pouco tempo, o p27 era reconhecido apenas pela sua atividade moduladora dos complexos ciclina-CDK (Borriello *et al*, 2007), tendo sido primeiramente identificado como CKI do complexo ciclina E-CDK2 (Lee & Kim, 2009), no entanto o seu papel como regulador de outros processos vêm sendo extensivamente estudado. Dessa forma, estudos já demonstraram a sua capacidade de exercer tanto funções negativas quanto positivas na

regulação da proliferação, migração e apoptose celular (Besson *et al*, 2004; Chu *et al*, 2008). Dentro desse contexto, o controle dos níveis da proteína p27, assim como de suas funções fisiológicas (inibitórias ou não inibitórias), está associado com mecanismos de regulação transcricional, traducional (Lee & Kim, 2009) e pós-traducional (Chu *et al*, 2008; Lee & Kim, 2009).

A atividade inibitória do p27 sobre os complexos ciclina-CDK é controlada pela sua concentração, localização subcelular e seu *status* de fosforilação (Chu *et al*, 2008). A fosforilação em sítios de serina e treonina pode resultar na localização citoplasmática do p27, e uma vez no citosol pode ser degradado ou atuar modulando outras funções celulares que não estejam diretamente associadas ao ciclo celular (Lee & Kim, 2009). Da mesma forma, a fosforilação do p27 na treonina 157 (Thr 157), reduz significativamente a entrada de p27 no núcleo (Sekimoto *et al*, 2004). Já foi demonstrado que quando essa fosforilação ocorre dentro da sequência de localização nuclear, a proteína 14-3-3 é capaz de se ligar ao p27, impedindo assim o seu importe nuclear (Sekimoto *et al*, 2004), ocasionando seu consequente acúmulo citoplasmático (Borriello *et al*, 2007).

A adesão célula-matriz tem sido apontada como uma importante reguladora da expressão do p27. Diferentes trabalhos mostraram a relação entre a ancoragem de fibroblastos a um substrato e a progressão celular (Fang *et al*, 1996). Tal relação também já foi demonstrada com células endoteliais de capilares (Huang *et al*, 1998). Fibroblastos não ancorados a uma matriz apresentam um arraste do ciclo celular, permanecendo presos na fase G1 do ciclo, enquanto que os fibroblastos que reestabelecem o contato com o substrato sólido conseguem ultrapassar o ponto de restrição G1/S e entram na fase S (Huang *et al*, 1998). Outros estudos atribuíram o arraste do ciclo na fase G1/S, observado em fibroblastos cultivados em suspensão, ao possível aumento da expressão de p27 e p21 nessas células (Fang *et al*, 1996; Zhu *et al*, 1996).

No presente trabalho, observamos um consistente aumento da expressão de p27 nas células endoteliais incubadas com matrizes da linhagem U-373 MG, em comparação com células em contato com matriz autóloga. Sabemos que a sub-população endotelial que resiste à *anoikis* está majoritariamente na fase G₀/G₁ do ciclo (Alves, 2007). Portanto, um aumento da expressão de p27 parece compatível com um “arraste” dessa população endotelial em G₀/G₁. No entanto, sabemos igualmente que células endoteliais que foram incubadas com matrizes de astrocitoma, uma vez replaqueadas sobre outros suportes, proliferam de 3 a 5 vezes mais do que as que foram incubadas com matrizes autólogas (Alves *et al*, 2011), o que pode parecer

em princípio contraditório com a maior expressão de p27 nestas células. Portanto, estudos adicionais são necessários para determinar como a expressão de p27 é modulada ao longo do ensaio de proliferação sobre outros suportes de adesão, diferentes da matriz tumoral na qual essas células foram previamente incubadas.

Já foi descrito que a superexpressão de p27 pode reduzir a migração de HUVECs (Goukassian *et al*, 2001) e de células musculares lisas da aorta de coelhos (Díez-Juan *et al*, 2003), além de prejudicar a angiogênese *in vivo* em um modelo murino de isquemia de membro posterior, assim como inibir a tubulogênese de HUVECs plaqueadas em matrigel (Goukassian *et al*, 2001). Considerando esses estudos, outro grupo demonstrou que a injeção intratumoral de vetores que superexpressavam p27 foi capaz de reduzir não apenas o crescimento do glioblastoma, como também de afetar a angiogênese associada ao tumor, sugerindo que o p27 superexpresso era capaz de alterar o microambiente tumoral e poderia estar atuando diretamente sobre as células endoteliais (Schiappacassi *et al*, 2008). Assim, em princípio poderíamos sugerir uma possível correlação entre a diminuição da tubulogênese observada nas HUVECs após a passagem pela matriz da U-373 MG selvagem com o aumento de p27 observado nessas células. Em contrapartida, o reestabelecimento da tubulogênese nas HUVECs previamente incubadas com matrizes secretadas por células U-373 MG silenciadas – comparável ao perfil tubulogênico das HUVECs que passaram pela matriz autóloga - não permite traçar uma correspondência entre a sinalização emitida pela TN-C e a dependência de p27, uma vez que o silenciamento de TN-C na linhagem de astrocitoma não alterou a expressão de p27. Assim, apesar do importante papel que observamos para a TN-C na modulação da adesão e da diferenciação endotelial, os dados que emergiram dos experimentos com matrizes produzidas por células tumorais silenciadas sugerem que a expressão da proteína p27 não seja regulada pela presença de TN-C.

É importante lembrar, que a proteína p27 tem a sua função e a sua atividade controlada pela sua localização subcelular (Sekimoto *et al*, 2004), uma vez no núcleo atua como um supressor de tumor, já no citoplasma pode atuar como um oncogene dotado de capacidade pró-metastática (Borriello *et al*, 2007), assim como pela influência da sua concentração (Sekimoto *et al*, 2004) e seu estado de fosforilação (Lee & Kim, 2009). De forma similar, outro inibidor de CDK, o p21/Cip1 também já foi descrito apresentando propriedades oncogênicas quando localizado no citoplasma celular (Sicinski *et al*, 2007). Deve ser considerado ainda que a p27 é uma proteína que apresenta meia-vida curta e sua degradação é controlada por um sistema ubiquitina-proteasoma (Kaldis, 2007). Após a ativação do

complexo ciclina-CDK, a subunidade detentora de atividade tirosina Kinase (CDK) fosforila o p27 no resíduo 187 de treonina (Thr 187), tornando-o um alvo a ser reconhecido pelo complexo ubiquitina ligase E3, denominado SCF^{Skp2}, e seu cofator a subunidade CDK1 (CKs1), para em seguida ser degradado pelo proteassoma (Sekimoto *et al*, 2004; Kaldis, 2007, Lee & Kim, 2009).

Portanto, ainda que a maior presença de p27 em células endoteliais incubadas com matrizes de astrocitoma possa realmente significar uma maior síntese e atividade deste inibidor, é necessário investigar sua localização subcelular, seu perfil de fosforilação e seu *turnover*, aspectos que não foram tecnicamente abordados neste trabalho e que limitam a interpretação dos dados aqui apresentados sobre a expressão de p27 endotelial. No entanto, estes dados preliminares indicam claramente que, em populações endoteliais heterogêneas quanto às fases do ciclo celular – que provavelmente predominam no microambiente tumoral, sabidamente nutrido por vasos não-quiescentes e desorganizados – a modulação da expressão de CKIs deve ter um papel preponderante na resposta à matriz extracelular e na seleção de células endoteliais com variáveis competências para o processo angiogênico.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A técnica utilizada para a transfecção e silenciamento da linhagem U-373 MG se apresentou reprodutível e eficiente, de tal modo que foi possível confirmar o silenciamento por três metodologias distintas, as quais demonstraram níveis de silenciamento similares;

- ✓ O silenciamento da TN-C resultou em um aumento discreto, porém significativo (aproximadamente 18%) da taxa de adesão endotelial sobre a matriz do astrocitoma;
- ✓ Os ensaios de adesão sobre matriz permitiram confirmar a sugestão anterior do grupo, de que a presença de TN-C na matriz tumoral é um fator-chave que seleciona subpopulações endoteliais com diferentes respostas angiogênicas;
- ✓ HUVECs semeadas sobre a matriz secretada pelo astrocitoma U-373 MG silenciado apresentaram uma redução significativa de núcleos apoptóticos, quando comparadas ao observado nas HUVECs incubadas com matriz de U-373 MG selvagem; estes resultados sugerem que a presença de TN-C na matriz do glioma, além de ser capaz de interferir na adesão de HUVECs sobre essa matriz, também influencia a sinalização de sobrevivência e morte nessas células;
- ✓ O silenciamento da TN-C foi capaz de reverter drasticamente o defeito tubulogênico observado nas HUVECs após a passagem pela matriz secretada por células U-373 MG selvagens;
- ✓ HUVECs incubadas com a matriz secretada por células U-373 selvagens apresentaram um aumento na expressão da proteína p27 em relação à expressão das HUVECs que permaneceram em contato com sua matriz autóloga. No entanto, o silenciamento da TN-C não foi capaz de alterar o perfil de expressão da proteína p27 nas células endoteliais, quando comparada à expressão de p27 em células que foram incubadas com a matriz selvagem.

Nas próximas etapas deste trabalho, alguns aspectos precisarão ser aprofundados:

- ✓ É necessário verificar a dinâmica de adesão ao longo do período de 24 horas, a fim de investigar se a depleção da TN-C das matrizes tumorais altera a adesão primária das células endoteliais e a dinâmica de desaderência;
- ✓ Uma possível relação entre a TN-C, o sindecan-4 e a apoptose nas células endoteliais foi sugerida pelos nossos resultados, a ser investigada nas próximas etapas, através de estratégias de silenciamento do sindecan-4 endotelial, bem como pela pesquisa dos níveis de expressão desse co-receptor nas células endoteliais;
- ✓ Os ensaios de tubulogênese permitiram realizar uma correlação entre o silenciamento da TN-C na matriz do astrocitoma, o papel da FN tumoral e sinalização do VEGFR-2, a qual também será alvo de futuras investigações;
- ✓ A falta de correlação entre a expressão de TN-C e os níveis de expressão de p27, apesar deste CKI estar envolvido nos efeitos da matriz de astrocitoma, sugere que outro (s) componente (s) da matriz tumoral atuem na regulação do ciclo celular das células endoteliais e, possivelmente, na indução do processo de *anoikis*. Nas próximas etapas, aprofundaremos o estudo da participação de outras moléculas da matriz e do ciclo celular neste processo.

REFERÊNCIAS

- Aird, W. C. Endothelium as an organ system. **Crit Care Med**, v. 32, n.5,p.S271-9, May, 2004.
- Aird, W. C. Spatial and temporal dynamics of the endothelium. **J Thromb Haemost**, v. 3,n.7, p.1392-406, Jul, 2005.
- Aird, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium. I. Structure, function, and mechanisms. **Circ Res**, v.100, n.2, p.158-73, Feb, 2007b.
- Aird, W. C. Molecular heterogeneity of tumor endothelium. **Cell Tissue Res**, v. 335, n.1, p.271-81, Jan, 2009.
- Aird, W.C. Endothelium in health and disease. **Pharmacol Rep**, v.60, n.1, p.139-43, Jan-Feb, 2008.
- Aird, W. C. Endothelial Cell Heterogeneity. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, n. 1, p. a006429, Jan, 2012.
- Llaguno *et al.* Malignant Astrocytomas Originate from Neural Stem/Progenitor Cells in a Somatic Tumor Suppressor Mouse Model. **Cancer Cell**,v. 15, n.1, p.45-56, Jan, 2009.
- Alves, T. R. Modulação da apoptose e da diferenciação angiogênica em gliomas humanos: papel da matriz extracelular tumoral. Rio de Janeiro, 2007.
- Alves *et al.* Tenascin-C in the extracellular matrix promotes the selection of highly proliferative and tubulogenesis-defective endothelial cells. **Exp. Cell Res**, v.317, n.15, p.2073-85, Sep, 2011.
- Ardebili *et al.* CD133/prominin1 is prognostic for GBM patient's survival, but inversely correlated with cysteine cathepsins' expression in glioblastoma derived spheroids. **Radiol. Oncol**, v. 45, n.2, p.102-15, Jun, 2011.
- Arismendi-Morillo G, Castellano A. Tumoral micro-blood vessels and vascular microenvironment in human astrocytic tumors. A transmission electron microscopy study. **J Neurooncol**, v.73, n.3, p.211-7, Jul, 2005.
- Arnautova *et al.* The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. **Angiogenesis**,v.12, n.3, p.267-74, Apr, 2009.
- Atkins *et al.*
Endothelial differentiation: molecular mechanisms of specification and heterogeneity. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.31,n.7, p.1476-84, Jul , 2011.
- Auguste *et al.* Molecular mechanisms of tumor vascularization. **Crit Rev Oncol Hematol**, v.54, n.1, p.53-61, Apr, 2005.

- Baeriswyl, V; Christofori, G. The angiogenic switch in carcinogenesis. **Semin Cancer Biol**, v.19, n.5, p.329-37, Oct, 2009.
- Baluk *et al.* Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. **Curr Opin Genet Dev**, v.15, n.1, p.102-11, Feb, 2005.
- Bartek *et al.* Key concepts in glioblastoma therapy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.83, n.7, p.753-60, Jul, 2012.
- Bellail *et al.* Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. **Int J Biochem Cell Biol**, v.36, n.6, p.1046-69, Jun, 2004.
- Berrier, A. L; Yamada, K. M. Cell–Matrix Adhesion. **J Cell Physiol**, v. 213, n.3, p.565-73, Dec, 2007.
- Besson *et al.* p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. **Genes Dev**, v. 18, n.8, p.862-76, Apr, 2004.
- Borriello *et al.* p27Kip1 metabolism: a fascinating labyrinth. **Cell Cycle**, v. 6, n.9, p.1053-61, May, 2007.
- Brat, D. J, Van Meir, E. G. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. **Lab Invest**, v.84, n.4, p.397-405, Apr, 2004.
- Byron *et al.* Adhesion signalling complexes. **Curr Biol**, v.20, n.24, p.R1063-7, Dec, 2010.
- Caolo *et al.* Notch Regulation of Hematopoiesis, Endothelial Precursor Cells, and Blood Vessel Formation: Orchestrating the Vasculature. **Stem Cells Int**, p.805602, Feb, 2012.
- Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature**, v.438, n. 7070, p.932-6, Dec, 2005.
- Carmeliet, P; Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v.407, n.6801, p.249-57, Sep, 2000.
- Carmeliet, P; Jain, R. K. (2011) Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**,v. 473, n.7347, p.298-307, May, 2011.
- Chiarugi, P; Giannoni, E. Anoikis: A necessary death program for anchorage-dependent cells. **Biochem Pharmacol**, v.76, n.11, p.1352-64, Dec, 2008.
- Chiodoni *et al.* Matricellular proteins: from homeostasis to inflammation, cancer, and metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v.29, n.2, p.295-307, Jun, 2010.
- Chiquet-Ehrismann, R; Tucker, R. P. Tenascins and the Importance of Adhesion Modulation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v.3, n.5, May, 2011.

Chu *et al.* The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n.4, p.253-67, Apr, 2008.

Davis, G. E; Senger, D. R. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. **Circ Res**, v.97, n.11, p.1093-107, Nov, 2005.

Davis *et al.* Molecular basis for endothelial lumen formation and tubulogenesis during vasculogenesis and angiogenic sprouting. **Int Rev Cell Mol Biol**, v.288, p.101-65, 2011.

De Smet *et al.* Mechanisms of Vessel Branching Filopodia on Endothelial Tip Cells Lead the Way. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.29, n.5, p.639-49, May, 2009.

De Spiegelaere *et al.* Intussusceptive Angiogenesis: A Biologically Relevant Form of Angiogenesis. **J Vasc Res**, v.49, n.5, p.390-404, 2012.

Dejana, E. The Role of Wnt Signaling in Physiological and Pathological Angiogenesis. **Circ Res**, v.107, n.8, p.943-52, Oct, 2010.

Díez-Juan *et al.* Role of the Growth Suppressor p27Kip1 During Vascular Remodeling. **Curr Vasc Pharmacol**, v.1, n.1, p.99-106, Mar, 2003.

Drexler, H. C. The role of p27Kip1 in Proteasome Inhibitor Induced Apoptosis. **Cell Cycle**, v.2, n.5, p.438-41, Sep-Oct, 2003.

Dunn *et al.* Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. **Genes Dev**, v.26, n.8, p.756-84, Apr, 2012.

Dyer, L. A; Patterson, C. Development of the Endothelium: An Emphasis on Heterogeneity. **Semin Thromb Hemost**, v.36, n.3, p.227-35, Apr, 2010.

Echtermeyer *et al.* Syndecan-4 signalling inhibits apoptosis and controls NFAT activity during myocardial damage and remodeling. **Cardiovasc Res**, v.92, n.1, p.123-31, Oct, 2011.

Engerman *et al.* Cell turnover of capillaries. **Lab Invest**, v.17, n.6, p.738-43, Dec, 1967.

Fang *et al.* Dependence of Cyclin E-CDK2 Kinase Activity on Cell Anchorage. **Science**, v.271, n.5248, p.499-502, Jan, 1996.

Fernandes, L.R. Padronização das Condições de Silenciamento de Expressão por RNA de Interferência da Linhagem U373-MG de glioma. Rio de Janeiro, 2011.

Ferrari do Outeiro-Bernstein *et al.*, M. A; Nunes, S. S; Andrade, A. C; Alves, T. R; Legrand, C; Morandi, V. A recombinant NH(2)-terminal heparin-binding domain of the adhesive glycoprotein, thrombospondin-1, promotes endothelial tube formation and cell survival: a possible role for syndecan-4 proteoglycan. **Matrix Biol**, v.21, n.4, p.311-24, Jun, 2002.

Folberg *et al.*, R; Hendrix, M. J; Maniotis, A. J. Vasculogenic Mimicry and Tumor Angiogenesis. **Am J Pathol**, v.156, n.2, p.361-81, Feb, 2000.

- Folkman, J. Angiogenesis and apoptosis. **Semin Cancer Biol**, v.13, n.2, p.159-67, Apr, 2003.
- Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N Engl J Med**, v.285, n.21, p.1182-6, Nov, 1971.
- Furnari *et al.* Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes Dev**, v.21, n.21, p.2683-710, Nov, 2007.
- Furuya *et al.* Pathophysiology of tumor neovascularization. **Vasc Health Risk Manag**, v.1, n.4, p.277-90, 2005.
- Garlanda, C; Dejana, E. Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.17, n.7, p.1193-202, Jul, 1997.
- Gilmore AP. (2005) Anoikis. **Cell Death Differ**, v.12, p.S21473-1477, Nov, 2012.
- Goukassian *et al.* Overexpression of p27Kip1 by doxycycline-regulate adenoviral vectors inhibits endothelial cell proliferation and migration and impairs angiogenesis. **FASEB J**, v.15, n.11, p.1877-85, Sep, 2001.
- Hanahan, D; Folkman, J. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. **Cell**, v. 86, n.3. p.353-64, Aug, 1996.
- Hanein, D; Horwitz, A. R. The structure of cell-matrix adhesions: the new frontier. **Curr Opin Cell Biol**, v.24, n.1, p.134-40, Feb, 2012.
- Hardee, M. E; Zagzag, D. Mechanisms of glioma-associated neovascularization. **Am J Pathol**, v.181, n.4, p.1126-41, Oct, 2012.
- Heinke *et al.* Life is a pattern: vascular assembly within the embryo. **Front Biosci (Elite Ed)**, v.4, p.2269-88, Jan, 2012.
- Hillen, F; Griffioen, A. W. (2007) Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. **Cancer Metastasis Rev**, v.26, n.3-4, p.489-502, Dec, 2012.
- Hirata *et al.* Endogenous tenascin-C enhances glioblastoma invasion with reactive change of surrounding brain tissue. **Cancer Sci**, v.100, n.8, p.1451-9, Aug, 2009.
- Holash *et al.* Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. **Science**, v.284, n.5422, p.1994-8, Jun, 1999.
- Hu, M; Polyak, K. Microenvironmental regulation of cancer development. **Curr Opin Genet Dev**, v.18, n.1, p.27-34, Feb, 2008.
- Huang *et al.* Control of Cyclin D1, p27Kip1, and Cell Cycle Progression in Human Capillary Endothelial Cells by Cell Shape and Cytoskeletal Tension. **Mol Biol Cell**, v.9, n.11, p.3179-93, Nov, 1998.

- Huang *et al.* Interference of Tenascin-C with Syndecan-4 Binding to Fibronectin Blocks Cell Adhesion and Stimulates Tumor Cell Proliferation. **Cancer Res**, v.61, n.23, p.8586-94, Dec, 2001.
- Hunting *et al.* Circulating endothelial (progenitor) cells reflect the state of the endothelium: vascular injury, repair and neovascularization. **Vox Sang**, v.88, n.1, p.1-9, Jan, 2005.
- Hynes, R. O. Cell–matrix adhesion in vascular development. **J Thromb Haemost**, v.5, p.5 Suppl 1:32-40, Jul, 2007.
- Hynes, R. O. Extracellular matrix: not just pretty fibrils. **Science**, v.326, n.5957, p.1216-9, Nov, 2009.
- Jaffe *et al.* Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria. **J. Clin. Invest**, v.52, n.11, p.2745–2756, Nov, 1973.
- Joester, A; Faissner, A. (2001) The structure and function of tenascins in the nervous System. **Matrix Biol**, v.20, n.1, p.13-22, Feb, 2001.
- Kaldis, P. Another Piece of the p27Kip1 Puzzle. **Cell**, v.128, n.2, p.241-4, Jan, 2007.
- Katayose *et al.* Promoting Apoptosis: A Novel Activity Associated with the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p27. **Cancer Res**, v.57, n.24, p.5441-5, Dec, 1997.
- Kaufmann *et al.* RNA interference for therapy in the vascular endothelium. **Microvasc. Res**, v.80, n.2, p.286-93, Sep, 2010.
- Kim *et al.* Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. **J Endocrinol**, v.209, n.2, p.139-51, May, 2011.
- Langley, R. R, Fidler, I. J. The seed and soil hypothesis revisited - the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. **Int J Cancer**, v.128, n.11, p.2527-35, Jun, 2011.
- Lee, J; Kim, S. S. The function of p27KIP1 during tumor development. **Exp Mol Med**, v. 41, n.11, p.765-71, Nov, 2009.
- Lima *et al.* Glioblastoma: Therapeutic challenges, what lies ahead. **Biochim Biophys Acta**, v.1826, n.2, p.338-49, Dec, 2012.
- Lock *et al.* Cell–matrix adhesion complexes: Master control machinery of cell migration. **Semin Cancer Biol**, v.18, n.1, p.65-76, Feb, 2008.
- Louis *et al.* WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. **Acta Neuropathol**, v.114, n.2, p.97-109, Aug, 2007.
- Lu *et al.* The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. **J Cell Biol**, v.196, n.4, p.395-406, Feb, 2012.

- Martin, S. E.; Caplen, N. J. Applications of RNA Interference in mammalian Systems. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v.8, p.81-108, Sep, 2007.
- Masuda, H; Asahara, T. Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. **Cardiovasc Res**, v.58, n.2, p.390-8, May, 2003.
- Mettouchi, A. The role of extracellular matrix in vascular branching morphogenesis. **Cell Adh Migr**, v.6, n.6, p.528-34, Nov-Dec, 2012.
- Midwood *et al.* Advances in tenascin-C biology. **Cell Mol Life Sci**, v.68, n.19, p.3175-99, Oct, 2011.
- Midwood, K. S; Orend, G. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. **J Cell Commun Signal**, v.3, n.3-4, p.287-310, Dec, 2009.
- Mosher, D. F; Adams, J. C. Adhesion-modulating/matricellular ECM protein families: A structural, functional and evolutionary appraisal. **Matrix Biol**, v.31, n.3, p.155-61, Apr, 2012.
- Murphy-Ullrich, J. E. The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? **J Clin Invest**, v.107, n.7, p.785-90, Apr, 2001.
- Onishi *et al.* Angiogenesis and invasion in glioma. **Brain Tumor Pathol**, v. 28, n.1, p.13-24, Feb, 2011.
- Orend, G. Potential oncogenic action of tenascin-C in tumorigenesis. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n.5, p.1066-83, May, 2005.
- Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. **Lancet**, v.133, p.571-573, 1889.
- Parsons *et al.* Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.11, n.9, p.633-43, Sep, 2010.
- Ping, Y. F; Bian, X. W. Cancer Stem Cells Switch on Tumor Neovascularization. **Curr Mol Med**, v.11, n.1, p.69-75, Feb, 2011.
- Reifenberger, G; Collins, V.P. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. **J Mol Med (Berl)**, v.82, n.10, p.656-70, Oct, 2004.
- Risau, W. Differentiation of endothelium. **FASEB J**, v.9, n.10, p.926-33, Jul, 1995.
- Schiappacassi *et al.* p27Kip1 expression inhibits glioblastoma growth, invasion, and tumor-induced neoangiogenesis. **Mol Cancer Ther**, v.7, n.5, p.1164-75, May, 2008.
- Schlie-Wolter *et al.* The selective role of ECM components on cell adhesion, morphology, proliferation and communication in vitro. **Exp Cell Res**, v.319, n.10, p.1553-61, Jun, 2013.
- Schneider *et al.* Gliomas in Adults. **Dtsch Arztebl Int**, v.107, n.45, p.799-807, Nov, 2010.

Sekimoto *et al.* 14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27Kip1. 14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27Kip1. **EMBO J**, v.23, n.9, p.1934-42, May, 2004.

Sicinski *et al.* Duality of p27Kip1 function in tumorigenesis. **Genes Dev**, v. 21, n.14, p.1703-6, Jul, 2007.

Siomi, H.; Siomi, M. C. On the road to reading the RNA-interference code. **Nature**, v.457, n.7228, p.396-404, Jan, 2009.

Soda *et al.* Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.108, n.11, p.4274-80, Mar, 2011.

Stenzel *et al.* Integrin-dependent and -independent functions of astrocytic fibronectin in retinal angiogenesis. **Development**, v.138, n.20, p.4451-63, Oct, 2011.

Stratman, A. N; Davis, G. E. Endothelial Cell-Pericyte Interactions Stimulate Basement Membrane Matrix Assembly: Influence on Vascular Tube Remodeling, Maturation, and Stabilization. **Microsc Microanal**, v.18, n.1, p.68-80, Feb, 2012.

Goh *et al.* Transcriptional Regulation of the Endogenous Danger Signal Tenascin-C: A Novel Autocrine Loop in Inflammation. **J Immunol**, v. 184, n.5, p.2655-62, Mar, 2010.

Triggle *et al.* The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. **Can J Physiol Pharmacol**, v.90, n.6, p.713-38, Jun, 2012.

Tucker, R. P; Chiquet-Ehrismann, R. The regulation of tenascin expression by tissue microenvironments. **Biochim Biophys Acta**, v.1793, n.5, p.888-92, May, 2009.

Valencia-Sanchez *et al.* Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. **Genes Dev**, v.20, n.5, p.515-24, Mar, 2006.

Van Obberghen-Schilling *et al.* Fibronectin and tenascin-C: accomplices in vascular morphogenesis during development and tumor growth. **Int J Dev Biol**, v.55, n.4-5, p.511-25, 2011.

Wang *et al.* Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. **Nature**, v.468, n.7325, p.829-33, Dec, 2010.

Wijelath *et al.* Novel vascular endothelial growth factor binding domains of fibronectin enhance vascular endothelial growth factor biological activity. **Circ Res**, v.91, n.1, p.25-31, Jul, 2002.

Wojakowski *et al.* Mobilization of stem and progenitor cells in cardiovascular diseases. **Leukemia**, v.26, n.1, p.23-33, Jan, 2012.

Yano *et al.* Phenotypic heterogeneity is an evolutionarily conserved feature of the endothelium. **Blood**, v. 109, n.2, p.613-5, Jan, 2007.

Zamecnik, J. The extracellular space and matrix of gliomas. **Acta Neuropathol**, v.110, n.5, p.435-42, Nov, 2005.

Zemani *et al.* Low-molecular-weight fucoidan enhances the proangiogenic phenotype of endothelial progenitor cells. **Biochem Pharmacol**, v.70, n.8, p.1167-75, Oct, 2005.

Zhan *et al.* Signalling mechanisms of anoikis. **Histol Histopathol**, v.19, n.3, p.973-83, Jul, 2004.

Zhao *et al.* Cancer stem cells and angiogenesis. **Int J Dev Biol**, v.55, n.4-5, p.477-82, 2011.

Zhu *et al.* Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. **J Cell Biol**, v.133, n.2, p.391-403, Apr, 1996.

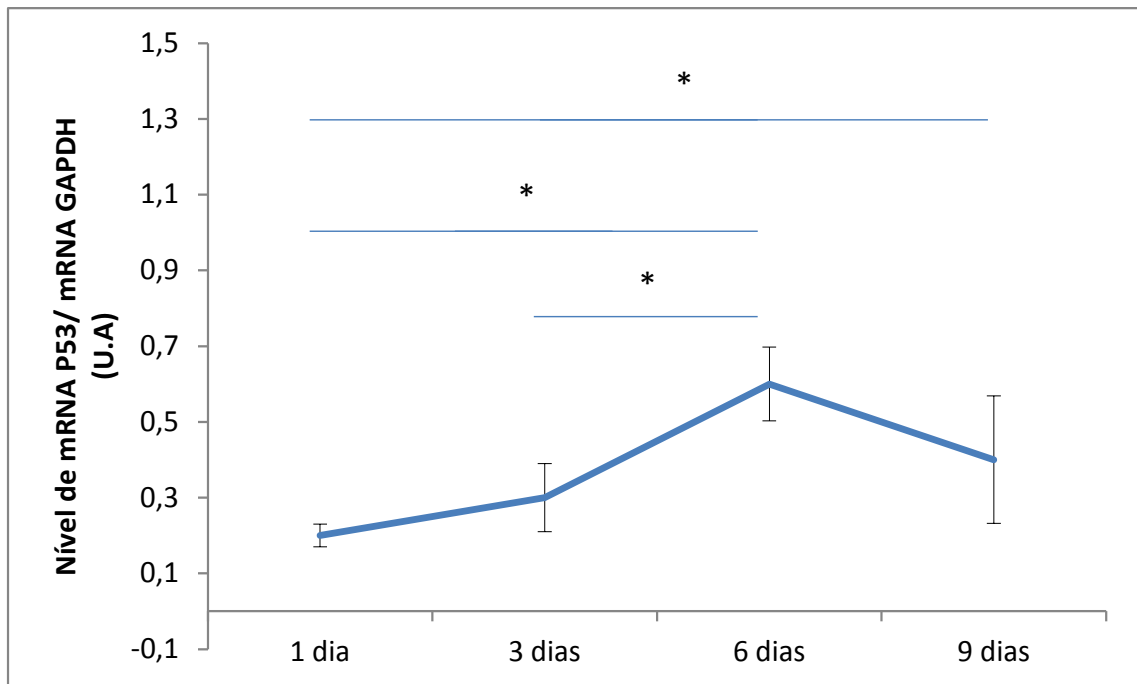
APÊNDICE A – Nível de mRNA de TP53 nas células U-373 MG.

Figura A1- Níveis de transcritos de TP53 nas células U-373 MG, 1-9 dias pós-transfecção com siRNA-p53 positivo 20nM, normalizado pelo nível de mRNA de GAPDH (retirado de Fernandes, 2011).

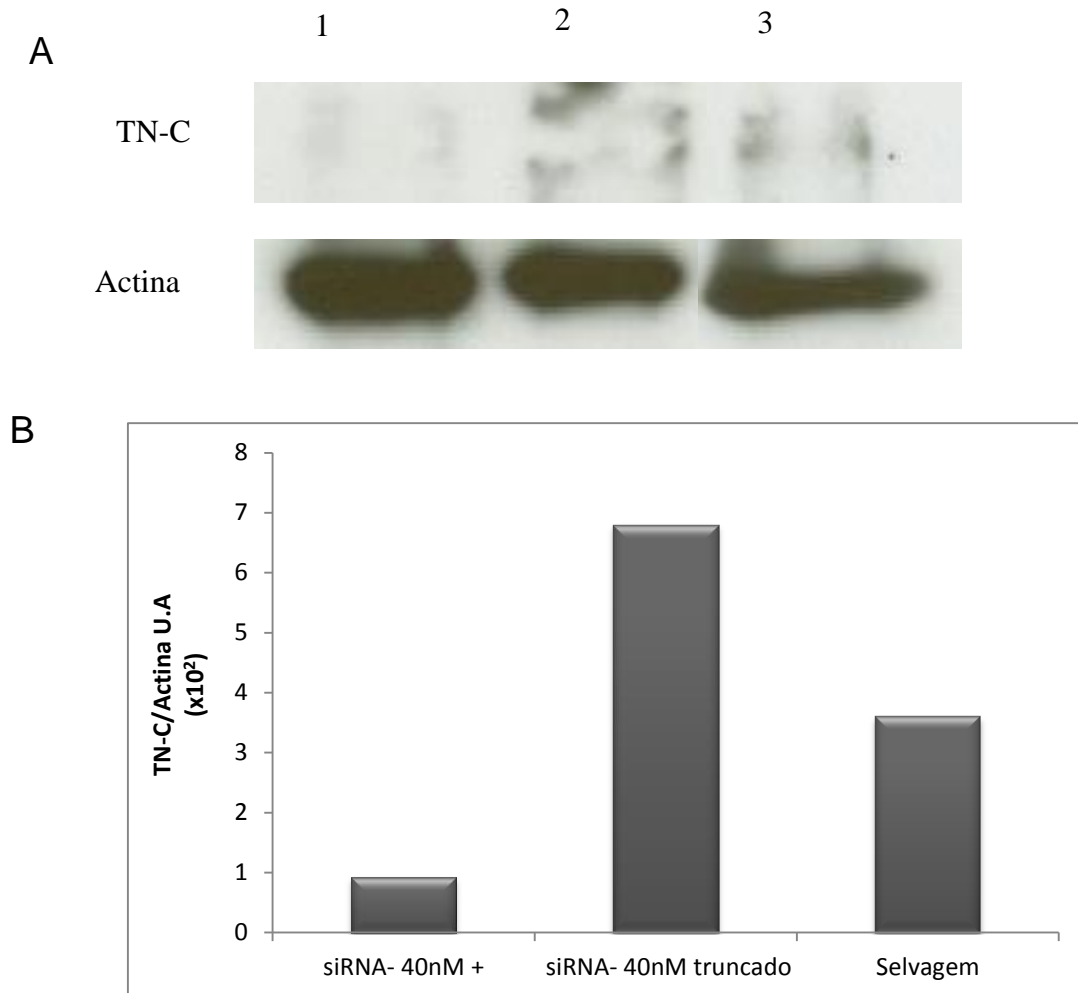
APÊNDICE B – Persistência do silenciamento da TN-C.

Figura A2 (A) Detecção da TN-C em extratos de células U-373 MG 168 horas após transfecção com siRNA: as amostras foram submetidas a uma corrida eletroforética e analisadas por *Western blotting*, como descrito na Metodologia. Amostras: extratos de células transfectadas com (1) siRNA-40nM+; (2) siRNA-40nM truncado; ou extratos de células U-373 MG selvagens. **(B)** Quantificação de pixels em imagens digitalizadas a partir dos filmes autorradiográficos obtidas de *Western blottings*, usando o Adobe Photoshop versão 6.0.

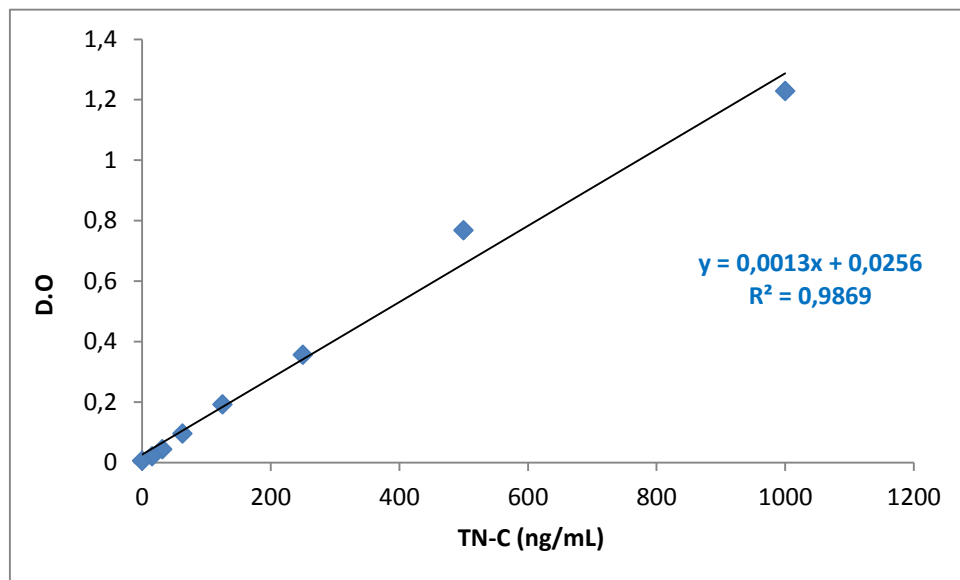
APÊNDICE C- Curva Padrão de TN-C imobilizada em placas de poliestireno

Figura A3- A abscissa representa a concentração de TN-C nas soluções utilizadas para sensibilizar a placa.