



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Aline Oliveira da Silva

**A Tenascina -C e a sinalização celular na diferenciação tubulogênica  
endotelial**

Rio de Janeiro

2012

Aline Oliveira da Silva

**A Tenascina-C e a sinalização celular na diferenciação tubulogênica endotelial**

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.<sup>a</sup> Dra. Verônica Maria Morandi da Silva

Rio de Janeiro

2012

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

S586 Silva, Aline Oliveira da. A Tenascina-C e a sinalização celular na diferenciação tubulogênica endotelial / Aline Oliveira da Silva. - 2012.  
81 f.

Orientadora: Verônica Maria Morandi da Silva.

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

1. Matriz extracelular – Teses. 2. Glioma – Teses. 3. Células – Adesão - Teses. 4. Neovascularização - Teses. 5. Endotélio - Teses. 6. Tenascina. 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

Aline Oliveira da Silva

**A Tenascina-C e a sinalização celular na diferenciação tubulogênica endotelial**

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 8 de fevereiro de 2012.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Verônica Maria Morandi da Silva

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Ricardo José Giordano

Universidade de São Paulo

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

Instituto Nacional de Câncer

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Robson de Queiroz Monteiro

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2012

## **DEDICATÓRIA**

Esta dissertação é dedicada a minha mãe, o meu grande amor, pelo seu exemplo de vida...

## AGRADECIMENTOS

A Deus porque Ele cuida de mim.

A minha mãe, por todo seu amor, cuidado e dedicação. Mesmo nos momentos mais difíceis de nossas vidas, não me deixou desistir. Eu continuo por você...

Ao meu pai pelo seu amor, dedicação e força. Obrigada por todo apoio que o senhor tem me dado.

A todos os meus familiares que sempre torceram por mim, em especial a minha avó Cléa.

Ao meu amor, Leandro, por ser essa pessoa tão carinhosa e especial e por fazer a minha vida mais feliz.

À minha orientadora Verônica, pela paciência, compreensão, conselhos e experiências nesses seis anos de convivência.

Aos membros da Banca Examinadora por aceitarem avaliar esse trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Camila pelo apoio, atenção e dedicação.

À Profa Thereza Crhistina Barja-Fidalgo pela atenção dispensada a mim ao aceitar revisar a este trabalho e pelas dicas.

Aos amigos do laboratório Vivi, Laila, Fernanda e Edward, por todo apoio, carinho e força! Obrigada por fazerem do laboratório uma ambiente mais alegre e, acima de tudo, pela amizade!

Aos demais membros do laboratório Chico, Marcella, Adelailde, tia Marileia e Marcus Temperine por toda ajuda!

Aos membros dos outros laboratórios, Gisele, Marcelo, Ceixa, Miclele, Gabi, Andréa, etc, pelo apoio.

Aos secretários Marcos e Vitor, pelo apoio e momentos de descontração.

Aos amigos da turma de biologia da UERJ 2005/1 pelos momentos alegres e inesquecíveis!!!

À equipe da Anatomia Patológica do Hospital Maternidade Carmela Dutra, pela cessão dos cordões umbilicais.

Ao CNPq, pelas bolsas a mim concedidas.

A alegria evita mil males e prolonga a vida.

*William Shakespeare*

## RESUMO

SILVA, Aline Oliveira da. **A Tenascina-C e a sinalização celular na diferenciação tubulogênica endotelial**. 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

A matriz extracelular (MEC) é capaz de modular a adesão celular, induzindo processos de sinalização celular. No estado de aderência intermediária, induzido por proteínas matricelulares, as células tendem a se diferenciar, migrar e proliferar. A tenascina-C é uma proteína matricelular amplamente secretada em gliomas que está envolvida na proliferação e angiogênese tumoral. A MEC de gliomas, possui elevada incorporação de tenascina-C (TN-C), uma glicoproteína matricelular desadesiva que compete com a glicoproteína adesiva fibronectina (FN), desestabilizando os contatos focais e induzindo proliferação celular em gliomas. Neste trabalho nós nos propusemos a investigar o papel da TN-C tumoral no fenótipo angiogênico de células endoteliais. Recentemente em um trabalho publicado pelo nosso grupo observamos que as células endoteliais semeadas sobre matrizes de glioma (U373 MG) aderem menos e são deficientes na capacidade de formar tubos quando comparadas com àquelas plaqueadas sobre MEC de HUVECs. No entanto, neste trabalho, reproduzimos este fenótipo semeando as células endoteliais em suportes de TN-C /FN miméticos da composição da matriz tumoral nativa. Por *western blotting*, observamos um aumento na fosforilação em treonina 638 da proteína PKC $\alpha$ , um possível sítio inibitório, e um aumento na ativação de PKC $\delta$ . O efeito antagônico na regulação dessas isoformas de PKC foi demonstrado quando usamos inibidores seletivos de PKC  $\alpha$  e  $\delta$  e um ativador de PKC $\alpha$  (PMA). Observamos que quando tratamos as HUVECs plaqueadas sobre MEC de U373 com PMA, resgatamos a capacidade dessas células de formar tubos, o pré-tratamento dessas HUVECs com inibidor de PKC  $\delta$  (rotlerina) resgatou parcialmente a capacidade tubulogênica dessas células. O pré-tratamento das HUVECs que foram semeadas sobre MEC da HUVEC (que formam tubos normalmente) com um inibidor de PKC  $\alpha$  (RO320432) levou a diminuição da capacidade tubulogênica. Além disso, esta matriz também induz ativação de ERK e AKT. Investigamos também se o bloqueio dos diferentes domínios da TN-C na matriz derivada de glioma poderia, de alguma forma, reverter o defeito angiogênico das células, propiciado pela interação com a matriz extracelular de gliomas. O pré-tratamento da matriz extracelular de glioma com anticorpos anti-TN-C (contra os domínios FNIII 1-3, 4-5 FNIII e N-terminal) resgatou parcialmente a capacidade das células endoteliais de formar tubos. Nossos dados sugerem que a indução do fenótipo vascular observado em muitos gliomas, com predomínio de vasos mal formados e sub-funcionais, pode ser parcialmente devido ao comprometido da sinalização mediada por PKCs em células endoteliais, bem como do aumento da ativação das vias de ERK e Akt.

Palavras-chave: Célula endotelial. Gliomas. Angiogênese. Matriz extracelular.



## ABSTRACT

SILVA, Aline Oliveira da. **Tenascina-C and the cellular signalling in endothelial tubulogenic differentiation.** 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

The extracellular matrix (ECM) modulates both strong cell adhesion – by inducing junctional complexes - and intermediate states of adhesion, where cells can differentiate, migrate and proliferate, depending on the signaling pathways activated by adhesion receptors. Tenascin-C is a matricellular protein widely secreted by glioma cells. It has a significant anti-adhesive activity and is involved in proliferation and tumor angiogenesis. Alves *et al.*, 2011 observed that endothelial cells seeded on ECM of the U373 adhere less and are deficient in the ability to form tubes when compared with those plated on ECM of the HUVECs. This phenotype was reproducible with substrates for TN-C/FN mimetic of native tumor matrix composition. We also investigated whether the blockage of different domains of TN-C in glioma-derived matrix could revert this poor angiogenic phenotype. Pre-treatment of glioma-derived matrix with antibodies against FNIII-type 1-3 repeats, FNIII-type 4-5 repeats and the EGF-like N-terminal domain of TN-C partially rescued endothelial cell ability to form tubes. PKC-alpha activation has been previously implicated in the induction of tubulogenesis in Matrigel. By western blotting, we observed an increase in the phosphorylation of a threonine 638 - a possible inhibitory site PKC alpha protein - and in the threonine 505 of PKC delta – leading to its inactivation - in tubulogenesis-defective endothelial cells previously incubated with ECM of gliomas. The antagonistic effect of these isoforms of PKC was demonstrated when we used selective inhibitors and activators of the PKCs. When HUVECs were incubated with ECM U373 MG in the presence of PMA, they rescued their ability to form tubes; pre-treatment of HUVECs with inhibitor of PKC  $\delta$  (rottlerin) also partially rescued the tubulogenic ability of these cells. However, pre-treatment of HUVECs were seeded on the HUVEC ECM (which form tubes normally) with an inhibitor of PKC  $\alpha$  (RO320432) led to impairment of tubulogenesis. Moreover, this matrix also induces activation of ERK and AKT. Our data suggest a role for TN-C-induced aberrant vascular phenotypes often observed in malignant gliomas can have the possible contribution of PKC-alpha inhibition, as well as of ERK and Akt activation, in endothelial cells exposed to tumor ECM.

Keywords: Endothelial cells. Gliomas. Angiogenesis. Extracellular matrix.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Progressão maligna de astrocitoma humano.....	15
Figura 2 –	Glioblastomas podem ser classificados em primário ou secundário.....	16
Figura 3 –	Estrutura dos monômeros da Fibronectina e da Tenascina-C.....	29
Figura 4 –	Integração de vias de sinalização por fatores de crescimento e interação célula- MEC mediada por integrinas.....	31
Figura 5 –	Representação das estruturas e da classificação das isoformas de PKC.	34
Figura 6 –	O efeito da MEC de U373 na adesão celular é reproduzido por um substrato misto definido de FN/TN-C.....	44
Figura 7 –	Ensaio de tubulogênese das HUVECs incubadas sobre substratos mistos de FN/TN-C e sobre MECs derivadas de U373 e FGH.....	46
Figura 8 –	Papel de diferentes domínios da TN-C na indução do defeito tubulogênico em células endoteliais.....	48
Figura 9 –	Aquisição do defeito tubulogênico ao longo do tempo.....	49
Figura 10 –	Análise de sítios de fosforilação de PKC $\alpha$ e PKC $\delta$ em células endoteliais incubadas sobre matrizes imobilizadas.....	51
Figura 11 –	Ensaio de tubulogênese de HUVECs plaqueadas sobre MECs de células U373 MG e HUVECs pré-tratadas com inibidores e ativadores das PKCs.....	53
Figura 12 -	Análise da modulação das vias de sinalização ERK 1/2 e Akt por MECs nativas.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

Akt ou PKB	Proteína quinase B ( <i>protein kinase B</i> )
BCRJ	banco de células do Rio de Janeiro
BSA	albumina de soro bovino
DAG	diacilglicerol
DMEM-F12	dulbecco's modified eagle médium/F12
EDTA	ácido etileno-diamino-tetra-acético
EGF	fator de crescimento epidermal
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	proteínas quinases reguladas por estímulos extracelulares ( <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i> )
FGF	fator de crescimento de fibroblastos ( <i>fibroblast growth factor</i> )
FGH	fibroblastos de gengiva humana
FN	fibronectina
GAG	glicosaminoglicano
GBM	glioblastoma
HIF1 $\alpha$	fator induzido por hipóxia-1
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HUCCF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
HUVEC	célula endotelial de veia umbilical humana
kDa	quiloDáton
LN	laminina
M199	meio 199 para cultura de células endoteliais
MAPK	proteína-quinase ativada por mitógeno ( <i>Mitogen-activated protein kinase</i> )
MAPKK- MAP	quinase quinase ( <i>MAP kinase kinase</i> )
MAPKKK MAP	quinase quinase quinase ( <i>MAP kinase kinase kinase</i> )
MEC	matriz extracelular

MMP	metaloproteinase
OPD	O-Phenylenediamine dihydrochloride
PBS	tampão salina fosfato (NaCl 1,37 M, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5 mM, KCl 40 mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1mM ph 6,5)
PBS-Ca <sup>+2</sup>	tampão salina fosfato 0,001M CaCl <sub>2</sub>
PDGFR-β	Receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas ( <i>Beta- type platelet derived growth factor receptor</i> )
PDK1	proteína-quinase dependente de fosfaridilinositol-1
PI3K	fosfatidilinositol 3- quinase ( <i>Phosphoinositide 3-kinase</i> )
PIP3	fosfatidilinositol trifosfato ( <i>Phosphoinositide- Triphosphate</i> )
PKC	Proteínas quinases C ( <i>Protein Kinase C</i> )
PMA	forbol-12-miristato-13-acetato ( <i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i> )
RACKs	receptores de Proteínas Kinase C ativadas
RPM	rotações por minuto
RTK	Receptor de Tirosina Quinase ( <i>Tyrosin Kinase Receptor</i> )
SDS	duodecil sulfato de sódio
SDS- PAGE	gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
SPARC	proteína secretada acídica rica em cisteína
TBS	tampão tris (NaCl 137mM, Tris 20mM, ph 6,5)
Tie-2	receptor tipo tirosina quinase para angiopoietinas
TN	tenascina
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
U373 MG	linhagem de glioma humano
uPA	serino protease ativadora de plasminogênio tipo-uroquinase
VEGF	fator de crescimento de endotélio vascular ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
VEGFR2/Kdr	Receptor -2 do fator de crescimento de endotélio vascular ( <i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i> )
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	36
1.1	<b>Específicos</b> .....	36
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
2.1	<b>Cultura de Células Endoteliais De Veia Umbilical Humana (HUVEC)</b> .....	37
2.2	<b>Cultivo das linhagens celulares</b> .....	37
2.3	<b>Obtenção de Matrizes extracelulares (MECs) imobilizadas livres de células</b>	38
2.4	<b>Bloqueio de diferentes epítomos da tenascina-C</b> .....	38
2.5	<b>Preparo de substratos mistos definidos de tenascina-C (TN-C) e fibronectina (FN)</b> .....	39
2.6	<b>Incubação de células endoteliais com matrizes imobilizadas (livres de células) e/ ou substratos mistos FN/TN-C</b> .....	39
2.7	<b>Ensaio de tubulogênese com Matrigel</b> .....	39
2.8	<b>Análise das vias de sinalização envolvidas na modulação da diferenciação angiogênica mediada por matrizes de glioma U373 MG</b> .....	40
2.8.1	<u>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida – SDS (PAGE-SDS) e Western Blotting</u> .	40
2.8.2	<u>Tratamento das HUVECs com moduladores de isoformas de PKC</u> .....	41
2.9	<b>Análise estatística</b> .....	42
3	<b>RESULTADOS</b> .....	43
3.1	<b>Adesão e diferenciação de células endoteliais incubadas sobre substratos definidos de Fibronectina/ Tenascina-C</b> .....	43
3.2	<b>Identificação dos domínios da TN-C envolvidos na modulação da tubulogênese</b> .....	45
3.3	<b>Aquisição do defeito tubulogênico ao longo do tempo de incubação de células endoteliais com matrizes de células U373 MG</b> .....	47
3.4	<b>Análise dos Processos de Sinalização em Células Endoteliais incubadas com matriz de células U373 MG</b> .....	50

4	<b>DISCUSSÃO .....</b>	55
	<b>CONCLUSÕES .....</b>	66
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	68

## INTRODUÇÃO

### Gliomas: Classificação

Os gliomas são tumores que se formam a partir da transformação maligna de astrócitos, oligodendrócitos ou de seus progenitores. Constituem os mais comuns tumores cerebrais, correspondendo a mais de 70% de todos os neoplasmas do sistema nervoso central (SNC) e variam consideravelmente na morfologia, localização, alterações genéticas e resposta à terapia (Kleihues *et al.*, 2009). Em geral, são tumores muito invasivos e infiltrantes, embora não metastáticos (Hochberg & Puitt, 1980).

Esses tumores podem ser classificados em astrocíticos, oligodendrogliol, oligoastrocíticos. Essas distinções têm como base as semelhanças microscópicas entre as células normais da glia (astrócitos e oligodendrócitos) e as células tumorais. Por exemplo, os astrocitomas - tumores que se originam dos astrócitos ou de seus progenitores - são caracterizados pela expressão de um marcador específico (proteína glial fibrilar ácida – GFAP) numa fração da massa tumoral (Louis, 2006; Eng *et al.*, 2000).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os astrocitomas são classificados em quatro graus (I-IV), astrocitoma pilocítico, grau I; astrocitoma de grau II; astrocitoma anaplásico, grau III e glioblastoma, grau IV. Oligodendrogliomas e oligoastrocitomas são subseqüentemente graduados em grau II e grau III de malignidade, com base na correlação entre as características histopatológicas e o prognóstico (Kleihues *et al.*, 2002). Os glioblastomas (GBMs) se encaixam no grau mais maligno dos astrocitomas e podem surgir *de novo*, ou evoluir a partir de gliomas de baixo grau. (Louis, 2006)

Os critérios histopatológicos considerados incluem: atipia nuclear, mitoses, proliferação endotelial, necrose, expressão das proteína de citoesqueleto vimentina e da proteína acídica fibrilar glial (GFAP), do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF); amplificação do CDK4 (*cyclin dependent kinase 4*) e dos receptores dos fatores de crescimento EGF – *epidermal growth factor* e PDGF (*platelet derived growth factor alpha*); perda ou mutação do gene p53, (Plate & Risau, 1995; Mentlein & Held-Feindt, 2003), além de evidências clínicas como: progressão, idade do paciente e localização cerebral (Kleihues *et al.*, 1995; Figurela-Branger & Bouvier, 2005).

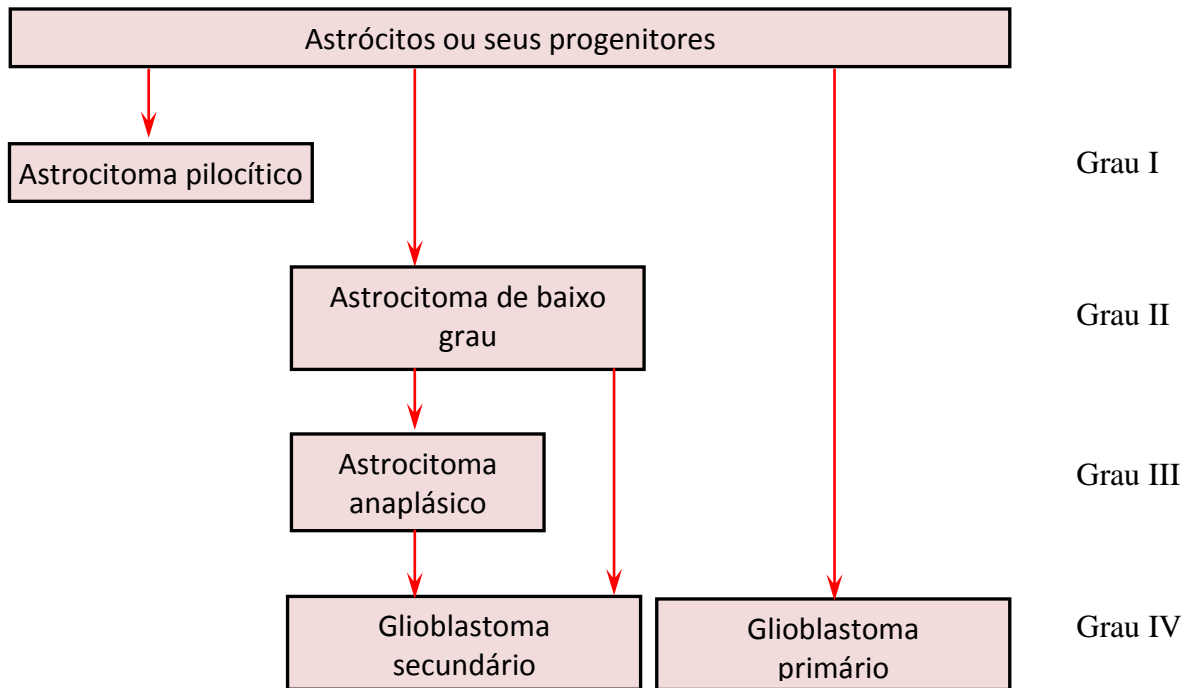
Tumores de grau I (astrocitomas pilocíticos) são raros e biologicamente benignos. Os astrocitomas de baixo grau são tumores cerebrais primários que se localizam preferencialmente nos hemisférios cerebrais e geralmente se manifestam clinicamente nos adultos (Louis, Holland & Cairncross, 2001).

Esses tumores apresentam ainda infiltração difusa das estruturas cerebrais adjacentes e distantes, tendem a recorrer após ressecção cirúrgica e estão freqüentemente associados com a progressão para outros tipos histológicos malignos - astrocitoma anaplásico (grau III) - e eventualmente glioblastoma secundário (grau IV) (Louis *et al.*, 2007; Ohgaki *et al.*, 2005). O astrocitoma difuso (grau II) geralmente apresenta apenas hiper celularidade com atipia nuclear, enquanto o astrocitoma anaplásico (grau III) já apresenta atividade mitótica maior, além de acentuação das alterações presentes no astrocitoma difuso. Em alguns casos, proliferação endotelial moderada pode ser vista no astrocitoma anaplásico. Para que um tumor astrocítico seja classificado como glioblastoma multiforme (grau IV), além de uma combinação dos critérios acima descritos para os tumores graus II e III, a presença de proliferação endotelial acentuada ou necrose é obrigatória. Grandes áreas de necrose, bem como pequenos focos necróticos rodeados de uma camada de células tumorais em uma disposição denominada *pseudo-paliçada*, são freqüentemente observadas. Seu grande potencial de crescimento resulta de vários fatores, incluindo a grande proliferação celular, extensiva migração de células através dos tratos mielinizados e angiogênese tumoral proeminente (Kleihues & Cavenee, 2000).

O GBM primário é mais comum em pacientes mais velhos sem evidências de doença prévia e se apresenta como um tumor agressivo, altamente invasivo. GBM secundário geralmente é observada em pacientes mais jovens, que inicialmente apresentam astrocitoma de baixo grau que evolui para GBM dentro de 5-10 anos do diagnóstico inicial, independentemente da terapia anterior. A catalogação de alterações genéticas nestes subtipos de GBM identificou diferenças em seus perfis genéticos, predominantemente na penetrância de algumas mutações genéticas específicas. Como resultado, tem sido proposto que a GBM primário e secundário representam duas entidades clínicas distintas (Kleihues & Cavenee 2000). No entanto, as distinções tornam-se turvas quando se considera o quadro clínico marcante, semelhanças biológicas entre estes dois subtipos, uma vez que GBMs primário e secundário se comportam de forma clinicamente indistinguível. A sobrevivência média a partir do momento que o GBM é diagnosticado, que é de 9 a 12 meses, não difere estatisticamente entre estes dois subtipos, refletindo taxas equivalentes de proliferação e invasão bem como resistência a todas as modalidades terapêuticas (Maher *et al.*, 2001).

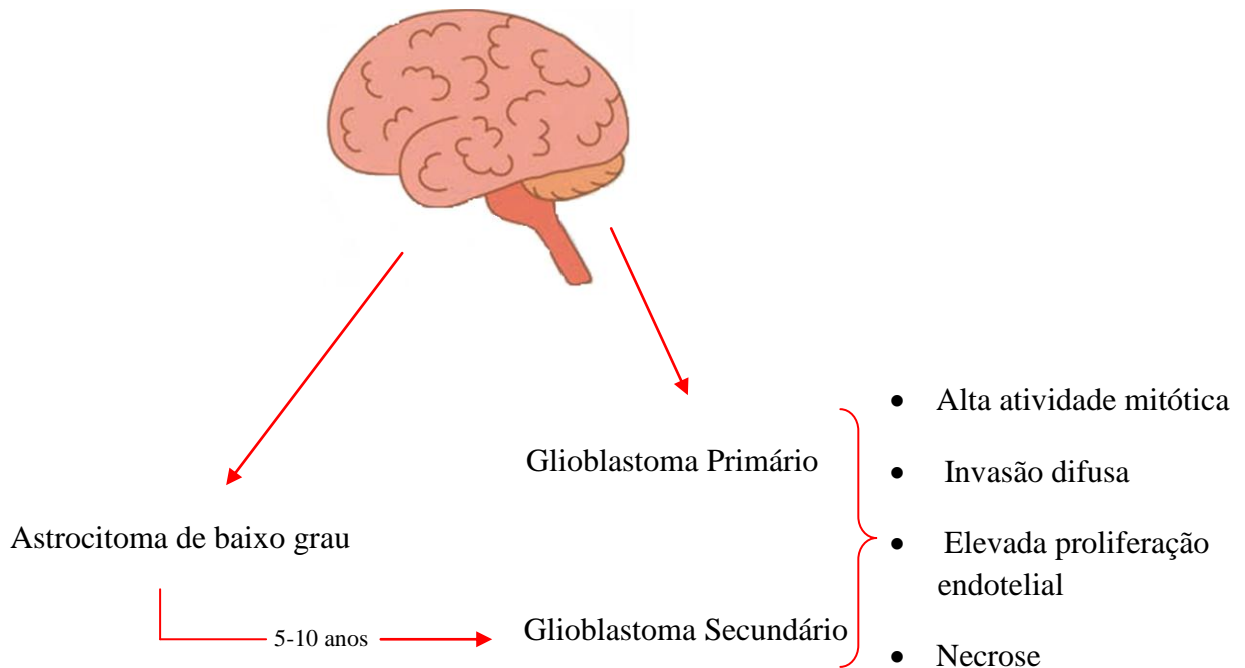


Figura 1 - Progressão maligna de astrocitoma humano, (do grau I ao grau IV) segundo classificação da WHO – *World Health Organization*



Fonte: Kleihues *et al.*, 1995.

Figura 2 - Glioblastomas podem ser classificados em primário ou secundário. GBM Primário- patologia inicial ou GBM Secundário- se desenvolve a partir de astrocitomas d grau II ou III



Fonte: Adaptado de Maher *et al.*, 2002.

## O Endotélio

O endotélio recobre a superfície interna de todos os vasos sanguíneos (artérias, veias e capilares) no organismo adulto. Estes vasos se interconectam por anastomose, formando uma complexa rede vascular que irrigará e suprirá as necessidades de oxigênio e nutrientes dos tecidos. As células endoteliais são circundadas por células perivasculares: os pericitos, nos vasos de pequeno calibre e as células musculares lisas, nos vasos de grande calibre (Risau, 1995).

As células endoteliais são caracterizadas por apresentarem, em seu citoplasma, organelas denominadas corpos de Weibel-Palade, que estocam e secretam proteínas importantes na fisiologia vascular, como fator de von Willebrand (fvW). Além deste fator, outras moléculas têm sido utilizadas como marcadores de células endoteliais. Dentre elas, podemos citar a enzima de conversão de angiotensina (ACE) (Jaffe *et al.*, 1973), receptores para os fatores de crescimento do endotélio vascular 1 e 2 (VEGFR-1 e VEGFR-2) (Peters *et al.*, 1993),

caderina do endotélio vascular (VE-caderina ou caderina-5) (Lampugnani *et al.*, 1992) molécula de adesão celular endotelial plaquetária-1 (PECAM-1, CD31)(Vecchi *et al.*, 1994), P-selectina e CD34 (Fina *et al.*, 1990).

Estas células produzem matriz extracelular (MEC) do tipo lâmina basal, constituída de colágeno tipo IV, laminina (LM), nidogênio e heparano-sulfato proteoglicanos (HSPG) (Sechler *et al.*,1998).

Normalmente as células endoteliais estão em estado quiescente e possuem *turn over* muito lento, de até 7 anos. Porém, estas células podem ser ativadas por estímulos externos tornando-se proliferativas, migratórias e exibindo diferentes receptores em suas superfícies membranares (Risau, 1995). A ativação endotelial facilita a adesão e diapedese dos leucócitos nas situações inflamatórias, ou permite a formação de novos vasos nos casos de reparos de lesões ou durante o ciclo menstrual feminino, por exemplo. Permite igualmente a formação de novos vasos em situações patológicas como retinopatia diabética, hipertensão artrite reumatóide e câncer (Folkman, 1995).

No entanto, as células endoteliais são consideradas uma população heterogênea, uma vez que um mesmo organismo apresenta vasos contínuos, descontínuos e fenestrados (Risau, 1995). Vasos fenestrados facilitam a permeabilidade seletiva, secreção, absorção e filtração de moléculas. Vasos descontínuos ou sinusóides estão presentes na medula óssea, atuam na hematopoiese e liberação de células sanguíneas. Vasos contínuos são conectados por junções oclusivas e possuem papel de barreira, são característicos do cérebro e da retina (Risau, 1995).

O endotélio cerebral é formado a partir da migração de precursoras endoteliais externas ao cérebro. Cabendo ao microambiente cerebral induzir a diferenciação dessas precursoras em células endoteliais com características de barreira hematoencefálica (Risau, 1995). Em contato com a parede externa dos vasos cerebrais estão os astrócitos que estendem prolongamentos conhecidos como **pés vasculares**, formando uma fina camada em rede que envolve o microcapilar cerebral, mediando a comunicação neuro-vascular (revisto por Abbot, 2002).

A barreira hematoencefálica é formada por células endoteliais, astrócitos, pericitos (células estromais e perivasculares envolvidas na maturação e estabilização dos vasos sanguíneos), microglia perivascular e membrana basal (Bart *et al.*, 2000; Mercier, 2004), e tem como importante papel a regulação homeostática do microambiente cerebral. Entretanto, não está ainda muito claro se a perda da permeabilidade e excesso de neovascularização são as causas ou as conseqüências da disfunção glial.

## Características da rede vascular em gliomas

Os vasos do glioma são altamente heterogêneos e não estão em conformidade com a fisiologia da microvasculatura do tecido cerebral normal. Em contraste com os capilares cerebrais (de aproximadamente 3 a 5 $\mu$ m de diâmetro), os gliomas contêm uma rede vascular sinusoidal com diâmetros variando entre 3 e 40 $\mu$ m. Vários autores têm sugerido que a dilatação destes vasos tumorais seria um dos principais mecanismos para compensar a natural e progressiva falha de perfusão intratumoral característica dos gliomas (Forsyth *et al.*, 1999; Brahim-Horn *et al.*, 2001; Hanahan D & Folkman J, 1996).

Estudos de microscopia eletrônica têm identificado pelo menos três anormalidades estruturais do revestimento endotelial que formam a base para um aumento da permeabilidade microvascular e da perda de funcionalidade da barreira hematoencefálica nesses tumores: (i) abertura de lacunas endoteliais (junções interendoteliais e canais transendotelial); (ii) vesículas citoplasmáticas (cavéolas e organela vesicular vacuolar (VVO)); (iii) fenestrações (Kim S, *et al.*, 2000; Lindahl P, *et al.*, 1997).

Células murais são componentes essenciais para a maturação e estabilidade dos vasos sanguíneos (Xian *et al.*, 2006). Alterações na densidade ou na interação de pericitos com o endotélio estão associadas a diversas doenças humanas, tais como retinopatia diabética, má-formação venosa e acidente vascular cerebral hereditário (Gaengel *et al.*, 2009). Estudos recentes mostram também uma associação entre o recrutamento de pericitos com a vascularização tumoral, correlacionando a pobre cobertura de pericitos na rede vascular tumoral com a má formação desses vasos e o aumento do número de metástases (Yonenaga *et al.*, 2005).

Além disso, a angioarquitetura do glioma é dependente principalmente do tamanho da massa tumoral e de sua localização no interior do tumor, pode ser classificada em dois grupos distintos: (i) microvasculatura da região peritumoral representando a área de crescimento do tumor e invasão ao tecido adjacente e (ii) microvasculatura intratumoral. Estas regiões diferem significativamente em relação a atividade angiogênica (Lakka *et al.*, 2005), densidade vascular, expressão de fatores de crescimento angiogênico e seus receptores (Rao *et al.*, 1996; Forsyth *et al.*, 1999; Ferrara, 2004). Enquanto a região peritumoral mostra uma alta atividade angiogênica e conseqüentemente alta densidade vascular, a atividade angiogênica dentro da massa do glioma diminui progressivamente para o centro do tumor (Forsyth *et al.*, 1999; Carmeliet P & Jain, 2000).

Muitos trabalhos já demonstraram que a perfusão em gliomas é menor e mais variável do que no tecido cortical normal (Farin *et al.*, 2001; Bremnes *et al.*, 2002; Goodenough *et al.*, 1996). Estudos dinâmicos da microcirculação de gliomas têm demonstrado que estes tumores realmente apresentam uma vascularização de baixa eficácia funcional: enquanto no tecido cerebral normal mais de 95% dos capilares são eficientes para o seu abastecimento, nos gliomas apenas 50-70% dos capilares são funcionais. A falha na perfusão é ainda mais acentuada nas áreas centrais do tumor, onde a proporção de vasos funcionais é inferior a 25% (Del Maestro *et al.*, 1990; Forsyth *et al.*, 1999).

Muitos traços característicos do microambiente vascular nos gliomas estão relacionados com o padrão anormal de expressão de moléculas vasoativas. A alta atividade angiogênica do tumor resulta da alta expressão de fatores de crescimento pró-angiogênicos e seus receptores. Os padrões de expressão regionais deste sistema de sinalização têm sido correlacionados com a heterogeneidade da angiogênese nos gliomas (Rao *et al.*, 1996; Lakka *et al.*, 2005). Além disso, o aumento da expressão de VEGF é, pelo menos em parte, responsável pela perda da funcionalidade da barreira hematoencefálica e pelo aumento da permeabilidade microvascular desses tumores (Bergers G & Song, 2005; Lakka *et al.*, 2005; Esser *et al.*, 1998; Kevil *et al.*, 1998), mediada pelo receptor de VEGFR2, Flk-1/KDR (Mandriota *et al.*, 1995).

### **Angiogênese em gliomas**

A homeostase vascular é regida pelo equilíbrio dos estímulos pró-angiogênicos e anti-angiogênicos (Jain *et al.*, 2007). Durante a angiogênese fisiológica normal, os novos vasos sanguíneos amadurecem e se tornam estáveis. Tumores, que já foram analogamente comparados a “feridas que nunca cicatrizam”, ao contrário, perderam o balanço apropriado do controle positivo e negativo da angiogênese (Dvorak, 1986). Os vasos tumorais não se tornam maduros, permitindo o constante crescimento e brotamento de novos vasos na massa tumoral. De fato, GBMs são parcialmente definidos e distinguidos de astrocitomas de graus menores, pelo aparecimento de células endoteliais proliferativas e pela alta densidade vascular.

Nos gliomas a apresentação de regiões edematosas e hemorrágicas seria parcialmente explicada pela super produção de VEGF e pelo baixo recrutamento de pericitos, envolvidos na correta estabilização dos vasos recém formados (Bergers & Benjamin, 2003). Além disso,

os focos de necrose rodeados por células pseudopaliçadas são uma configuração relativamente única para glioblastomas. Recentemente, Rong *et al.* (2006), demonstraram que as células pseudopaliçadas estão submetidas a um estado severo de hipóxia, superexpressam HIF-1 e secretam fatores pró-angiogênicos como VEGF e IL-8.

Alguns trabalhos que descreveram a vascularização dos gliomas propõem que esta não seguiria exatamente o modelo clássico do *switch* angiogênico. Parece que nesses tumores a angiogênese não decorreria exclusivamente de uma necessidade de expansão da massa tumoral. Inicialmente as células tumorais gliais parasitariam e proliferariam em torno dos vasos sanguíneos do tecido cerebral normal, formando um glioma não encapsulado, de caráter invasivo, migrando ao longo dos vasos sanguíneos e que pode se tornar tão grande quanto um tumor dito angiogênico. No entanto, a convivência extensa com as células endoteliais dos vasos nativos culminaria, em algum momento da progressão tumoral, na morte destas células vasculares, levando à fase seguinte, de regressão vascular através apoptose mediada pela angiopoietina-2 (Ang-2). A involução desses vasos geraria morte das células tumorais e necrose, seguindo-se a hipóxia que leva ao aumento explosivo da expressão de VEGF, promovendo uma forte angiogênese na periferia tumoral (Holash *et al.*, 1999; Zagzag *et al.*, 2000). A evolução de um astrocitoma grau III para um glioblastoma grau IV poderia ser explicada por estas etapas, reforçadas por várias evidências experimentais e clínicas (Zagzag *et al.*, 2000; Bergers & Benjamin, 2003). Entretanto, pouco se sabe ainda sobre as mudanças genéticas e epigenéticas que acompanham a regressão vascular que acontece antes da fase angiogênica da progressão dos gliomas (Bergers & Benjamin, 2003).

Na fase angiogênica, o VEGF promove a proliferação endotelial ativando a via MAPK, aumenta a permeabilidade vascular ao promover a reorganização dos complexos caderina / catenina e o afrouxamento das junções aderentes entre células endoteliais (Esser *et al.*, 1998; Kevil *et al.*, 1998). Além disso, o VEGF leva à ativação da PI3K/AKT em uma via dependente de integrinas aumentando a migração e a sobrevivência das células (efeito anti-apoptótico) (Ferrara, 2004). O resultado final da sinalização do VEGF nesses tumores é a produção de vasos sanguíneos imaturos e altamente permeáveis (Jain *et al.*, 2007; Jain 2003).

Neste processo extremamente complexo, o papel da matriz extracelular (MEC) tumoral sobre as células endoteliais no microambiente dos gliomas ainda é pouco compreendido. No entanto, as transições de composição da MEC que acompanham a transformação de astrócitos normais em células de glioma e a grande importância que o contato de astrócitos com células endoteliais possui para a manutenção da integridade

vascular no tecido cerebral sugerem uma importante participação da MEC tumoral na angiogênese.

### **A matriz extracelular (MEC)**

A matriz extracelular (MEC) foi considerada durante muito tempo como uma estrutura estável e inerte que servia apenas como suporte mecânico para células e tecidos. Entretanto, diversas descobertas mudaram essa perspectiva e estabeleceram a importância da MEC nas últimas décadas. Inicialmente, estudos bioquímicos e moleculares revelaram a existência de quatro classes principais de moléculas na MEC: colágenos, proteoglicanos, glicoproteínas e elastina. Membros específicos de cada família foram encontrados distribuídos de maneira tecido-específica, implicando a matriz no desenvolvimento e função dos diferentes tecidos. Ainda, foram encontrados receptores de superfície celular específicos para os componentes da MEC, o que levou a associação da MEC com a biologia das células (Haralson & Hassel, 1995). A partir destas descobertas pudemos observar que a MEC é formada por um conjunto complexo de macromoléculas cuja integridade estrutural e composição são importantes na manutenção da arquitetura normal dos tecidos e na sua atividade específica. Finalmente, foi possível concluir também que componentes da MEC não funcionais e anormalidades na síntese da MEC levam a doenças, reforçando a sua importância (Haralson & Hassel, 1995).

Existem dois tipos de MEC: lâmina basal ou epitelial e a do tipo conjuntivo. A MEC do tipo conjuntivo caracteriza-se por ser muito abundante em relação ao número de células presentes, ocupando um grande volume. É composta por macromoléculas com funções principalmente estruturais como colágenos fibrosos (colágenos I, II, III, V e XI), proteoglicanos (como agrecan e versican) e elastina (Kreis & Vale, 1999).

A lâmina basal ou MEC epitelial é uma forma especializada de MEC e é diretamente responsável pelo comportamento das células com as quais está em contato. Localiza-se especificamente na face basal de células polarizadas, como células epiteliais e endoteliais e ocupa pouco volume. Esta matriz é constituída essencialmente por colágeno tipo IV, laminina e proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG), destacando-se o perlecan. Já foi extensivamente comprovado que os componentes de MEC controlam ativamente o crescimento, diferenciação, migração e viabilidade celular uma vez que o remodelamento da MEC se dá

devido à síntese e degradação de seus componentes dependendo do momento fisiológico (Kreis & Vale, 1999).

Através dos HSPGs, a MEC pode agir (1) seqüestrando fatores de crescimento ativos, protegendo-os de degradação, (2) como reservatório de fatores de crescimento latentes que serão ativados posteriormente, devido à ação enzimática durante o remodelamento da MEC ou (3) como moduladores do efeito de fatores de crescimento, aumentando a afinidade destes por seu receptor principal (Vlodavisky *et al.*, 1996, Saksela *et al.*, 1988, Jiang & Couchman, 2003).

### **Envolvimento da matriz extracelular na angiogênese**

As interações da MEC com as células endoteliais permitem que as mesmas se organizem em vasos sanguíneos. Durante a angiogênese, as células endoteliais devem aderir à MEC, proliferar, migrar, estabelecer polaridade, formar tubos e manter um formato celular apropriado, a angioarquitetura.

As células endoteliais em vasos quiescentes adultos expressam uma MEC do tipo lâmina basal, bastante semelhante às dos epitélios (Senger & Davis, 2011). No entanto, nos estágios precoces da angiogênese, como na resposta ao fator angiogênico VEGF, esta lâmina basal é degradada e os vasos se tornam mais permeáveis, permitindo o extravasamento de proteínas plasmáticas, como o fibrinogênio – rapidamente convertido em fibrina *in situ* – fibronectina, além do contato das células endoteliais com o colágeno intersticial (formador de fibras, no conjuntivo) presente no sub-endotélio. Assim, a lâmina basal íntegra é transitoriamente substituída por uma *matriz provisional* facilitadora do processo angiogênico. Na medida em que o processo prossegue e as estruturas vasculares recém-formadas se ramificam e formam seus lumens, a regeneração da lâmina basal – à base de colágeno tipo IV, não-fibroso e formador de redes - e o recrutamento de pericitos garantem a estabilidade dos novos vasos formados. Desta maneira, não apenas a ação de fatores solúveis angiogênicos, como FGF-2 e VEGF, determinam a dinâmica da angiogênese, mas o início e finalização deste processo de diferenciação celular são marcados por transições bastante típicas na composição matricial (Senger & Davis, 2011).

Ao longo do processo angiogênico, as células endoteliais utilizam diferentes integrinas capazes de reconhecer os componentes da matriz que disparam o evento de diferenciação.



Desta maneira, foram identificados importantes papéis para integrinas envolvidas no reconhecimento da fibronectina – a ser discutida na próxima seção em maiores detalhes – como as integrinas  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$  e  $\alpha 9\beta 1$  e, muito importantes, integrinas de cadeia  $\alpha v$  e reconhecedoras do colágeno intersticial (integrinas  $\alpha 1\beta 1$  e  $\alpha 2\beta 1$ ), molécula fibrosa típica do sub-endotélio e que se torna exposto às células após a degradação da lâmina basal (Senger *et al.*, 1997, 2002; Bayless *et al.*, 2000).

A perda da adesão à matriz levar à *anoikis* ou apoptose induzida por perda de ancoragem) (Frisch & Francis, 1994, Reddig & Juliano, 2005). Durante a angiogênese, um dos papéis fundamentais da MEC é garantir às células endoteliais uma adesão que seja permissiva à migração e proliferação. Nestas células, a sinalização que leva à *anoikis* está razoavelmente compreendida. O processo envolve a ativação de receptores de morte celular (sistema Fas-FasL), culminando com a clivagem proteolítica da Akt/proteína quinase B (PKB) (Bachelder *et al.*, 2001). A Akt/PKB é fundamental para a manutenção da viabilidade celular ao desativar proteínas pró-apoptóticas, principalmente as da via mitocondrial (Datta *et al.*, 1999).

O crescimento dos gliomas ocorre com um pronunciado remodelamento da MEC do tecido que o circunda. Este remodelamento matricial acontece de duas formas principais: 1) degradação proteolítica dos componentes do tecido normal adjacente; 2) síntese de novos componentes matriciais pelas células neoplásicas e estromais. O resultado final destes dois eventos é a geração de uma MEC tumoral que difere qualitativa e quantitativamente da MEC do tecido correspondente não-neoplásico (Castellani *et al.*, 2002).

As células de gliomas migram ao longo de fibras nervosas ou mesmo ao longo de vasos sanguíneos (Bellail *et al.*, 2004; Pallud *et al.*, 2005) usando-os como verdadeiros trilhos para se locomoverem. Neste último caso, o glioma estabelece interações com a MEC endotelial apesar de não atravessar a parede do vaso para dentro da corrente sanguínea. Em tumores cerebrais primários, o ácido hialurônico é superexpresso tanto na região mais interna do estroma quanto na região periférica do tumor. As glicoproteínas tenascina-C, trombospondina-1 e SPARC estão aumentadas dentro e em torno da parede dos vasos sanguíneos, e desempenham um papel importante na angiogênese tumoral. Outros componentes da MEC cerebral como vitronectina, osteopontina, laminina, fibronectina e BEHAB/brevican também são alteradas a fim de modular o crescimento, a proliferação e invasão do tumor (Higuchi *et al.*, 1993; Zagzag *et al.*, 1995).

## Fibronectina

A fibronectina é normalmente classificada em duas formas: fibronectina plasmática (p-fibronectina), uma forma solúvel, produzida por hepatócitos, que circula na corrente sanguínea em altas concentrações, e a fibronectina celular (c-fibronectina), produzida em tecidos onde é incorporada em uma matriz fibrilar. A c-fibronectina difere da p-fibronectina pela presença de domínios adicionais, incluindo o domínio tipo FNIII-B (EDB) e/ou A (EDA), que surgem a partir de splicing alternativo do pré-mRNA (Ffrench-Constant & Hynes, 1989; Peters *et al.*, 1996; White *et al.*, 2008)

A fibronectina celular é uma glicoproteína multifuncional, que auxilia a adesão das células à matriz, exercendo também importante função na migração, crescimento e diferenciação celular (revisito por Pankov & Yamada 2002 e Schwarztbauer, 2003). Esta glicoproteína normalmente apresenta-se como um dímero composto de cadeias de aproximadamente 250 KDa cada, ligadas covalentemente por um par de pontes dissulfeto na região C-terminal (Figura 3A) . Cada monômero consiste de três tipos de módulos repetidos: repetições tipo I, II e III (Hynes, 1990). Conjuntos diferentes destes módulos constituem os domínios de ligação para uma variedade de moléculas extracelulares e de superfície celular, entre elas: colágeno, glicosaminoglicanos, fibrina, integrinas, TSP-1 e a própria FN.

Diversos receptores para a FN já foram descritos, os principais pertencem à família das integrinas. A principal integrina envolvida é a  $\alpha 5 \beta 1$  (receptor clássico da FN), mas outras já foram identificadas no seu reconhecimento, como as integrinas  $\alpha 4 \beta 1$ ,  $\alpha 9 \beta 1$ ,  $\alpha 4 \beta 7$ ,  $\alpha v \beta 5$  e  $\alpha v \beta 3$ . O principal motivo estrutural da FN reconhecido por integrinas é o tripeptídeo RGD (Piersbacher & Ruolslathi, 1984).

A FN é um potente fator adesivo para a maioria das células. Estima-se que essa atividade esteja relacionada principalmente à capacidade desta glicoproteína induzir a formação de **adesões focais**. O receptor principal para a formação das adesões focais é a integrina  $\alpha 5 \beta 1$ , que reconhece a sequência RGD. Também na região C-terminal, encontra-se o principal sítio de ligação à heparina na FN (FN HepII) (McCarthy *et al.*, 1986) e é, na verdade, um importante sítio de reconhecimento para proteoglicanos de superfície, como o sindecan-4 (Woods & Couchman, 1994). O reconhecimento deste domínio da FN pelo sindecan-4, que atua como co-receptor nas adesões focais juntamente com a integrina  $\alpha 5 \beta 1$ , leva a formação de adesões focais ditas “maduras”, que permitem as células ficarem firmemente aderidas a MEC. É importante ressaltar que moléculas de FN se agregam

extracelularmente para formar fibrilas insolúveis, cuja organização é governada pelas células que as secretam (Schwarzbauer & DeSimone, 2011). As microfibrilas de FN, extracelularmente, facilitam o direcionamento de agregados de moléculas de integrinas em áreas restritas da membrana, ou “clusters”, que constituem as adesões focais, das quais partem as **fibras de estresse** (filamentos de actina tensionados, com disposição em feixes, interligando diferentes pontos de adesão focal). Portanto, a FN que induz adesão forte em células não-migratórias é aquela na forma microfibrilada; já a FN dispersa ou proteolisada na MEC – evento comum em tecidos tumorais - tem sido relacionada à indução de migração celular.

O importante papel da FN na fase do desenvolvimento e, principalmente, na formação do sistema cardiovascular, ficou bastante evidente através de estudos com modelos de animais *knockout*, seja para a própria FN ou para seus principais receptores do tipo integrinas (revisado por Astrof & Hynes, 2009). A ausência de FN leva a defeitos fatais durante a embriogênese, que variam com o *background* genético dos animais-modelo, mas que vão desde falhas no recrutamento de precursores endoteliais e mesenquimais, passando por defeitos de interação de células endoteliais com células murais e no estabelecimento de redes ramificadas. O fato de tais defeitos se produzirem em períodos que antecedem o surgimento do fluxo sanguíneo no embrião denotam que os mesmos se devem à falta primária da proteína, não sendo simplesmente uma consequência secundária resultante de uma força hemodinâmica diminuída nestes animais. Estudos nos quais foram usados animais que expressavam a FN normalmente, mas que foram tornados *knockout* para a expressão de diferentes cadeias de integrinas ligantes de FN mostraram que a maioria, se não todos os defeitos vasculares observados nos embriões, se devem à falta da integrina  $\alpha 5\beta 1$  (Astrof & Hynes, 2009). No sistema nervoso, a FN tem papel importante na orientação da migração de neurônios corticais durante a vida embrionária (Thierry *et al.*, 1984).

Apesar de não ser verdade para todos os tipos de tumores, um grande número de neoplasias evolui com diminuição da expressão de FN. Na verdade, a observação de que células transformadas com vírus oncogênicos expressavam menos de um antígeno de superfície, batizado posteriormente como FN, esteve na base da descoberta desta proteína (Hynes, 1973). A diminuição da expressão de FN por inúmeros tipos de câncer, incluindo os gliomas, conferiria à célula maior liberdade para se destacar do substrato e das células vizinhas. Assim, a redução da adesão parece ser crítica/essencial à tumorigênese (Ruoslahti, 1999).

Um grupo de proteínas de MEC de propriedades adesivas opostas as da FN, conhecidas como proteínas matricelulares, inclui, entre outras, a tenascina C (TN-C).

### **Proteínas Matricelulares**

As proteínas matricelulares são um grupo de proteínas da MEC cujo papel não seria propriamente estrutural, mas que atuam na “sintonia fina” da adesão de células à MEC. Membros deste grupo incluem as proteínas SPARC (*Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine*), tenascina-C (TN-C) osteopontina e as trombospondinas-1 e -2 (Kyriakides & Bornstein, 2003). Elas são expressas em altos níveis durante o desenvolvimento e em resposta a injúrias, funcionando como moduladoras das interações entre as células e componentes estruturais da MEC (colágenos, elastina, proteoglicanos etc). Possuem múltiplos módulos estruturais, ligando-se a vários receptores de superfície celular, fatores de crescimento, citocinas e proteases e geralmente levam a uma *desaderência* celular (Bornstein & Sage, 2002).

Vários sistemas experimentais demonstraram a importância fisiológica da coordenação dos sinais gerados pela MEC na proliferação celular e migração. A migração celular é diminuída em células exibindo forte adesão, caracterizada por abundância de fibras de estresse e adesões focais. Entretanto, células com fenótipo totalmente arredondado, não migram. Assim, a forte adesão impede a célula de liberar suas ligações entre o citoesqueleto e a matriz extracelular, enquanto a adesão fraca não gera a tração necessária para conduzir o movimento de célula. Desta forma, Murphy-Ullrich (2001) sugeriu que um *estado intermediário de adesão* seria mais favorável à migração celular, sendo as proteínas matricelulares as principais responsáveis por sua indução. A conformação celular, em particular uma morfologia aderida e espalhada, é essencial à sobrevivência (Re *et al*, 1994). Assim, o estado intermediário de adesão favoreceria não apenas a migração celular, mas também sua sobrevivência através da manutenção da morfologia e da sinalização por mediadores anti-apoptóticos intracelulares, como a quinase de adesão focal (FAK) (revisito por Murphy-Ullrich, 2001).

## Tenascina –C

Tenascinas são uma família de proteínas multiméricas de matriz extracelular (TN-C, TN-R, TN-W, TN-X ). A estrutura primária compartilha motivos comuns entre os subtipos desta glicoproteína, como as repetições amino-terminais, repetições tipo-EGF, domínios tipo III da fibronectina e domínios C-terminais globulares fibrinogênio-like (Hsia & Schwarzbauer, 2005).

A tenascina-C é uma glicoproteína hexamérica e cada monômero contém aproximadamente 200kDa associados covalentemente pelas suas porções amino-terminais ligadas por pontes dissulfeto (Figura 3B). Ela é composta por um domínio N-terminal de oligomerização, seguido por 14 e ½ repetições EGF-like, 8 repetições constantes tipo III da fibronectina e 9 repetições tipo III que sofrem splicing alternativo, e ainda 1 domínio globular C-terminal de homologia ao fibrinogênio (*fibrinogen-like*) (Jones *et al.*, 2000). A TN-C interage com diversos receptores de superfície celular como integrinas ( $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$ ,  $\alpha 9\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 6$ ), proteoglicanos de superfície e moléculas de adesão da família das imunoglobulinas além de componentes matriciais como fibronectina, heparina e colágeno.

Durante a embriogênese, a tenascina-C está presente no desenvolvimento da vasculatura de vários tecidos e órgãos. Em especial no desenvolvimento da córnea, células derivadas da crista neural destinadas a se tornarem endotélio, migram exatamente ao longo de um estroma rico em tenascina-C, sugerindo que a tenascina-C funciona como trilhos, guiando essas células (Kaplony *et al.*, 1991).

No entanto, na maioria dos tecidos adultos, apesar de ser muito reduzida ou ausente, a expressão de tenascina-C aumenta acentuadamente em condições patológicas, incluindo inflamação, cicatrização e câncer. Por exemplo, uma correlação positiva entre expressão de TN-C e a ocorrência de injúrias vasculares e cardíacas, além de nos ateromas, já está bastante demonstrada experimental e clinicamente (Midwood *et al.*, 2011). Estudos sugerem ainda que a TN-C favorece o acúmulo de depósitos de fibrina intravasculares e, portanto, os quadros de vaso-oclusão e trombose (Brellier *et al.*, 2011).

No contexto das neoplasias, muitos trabalhos sugerem que a TN-C tem um importante papel no crescimento tumoral, metástase e angiogênese. Em tumores de mama, a expressão de TN-C parece se correlacionar com fenótipos mais invasivos – por exemplo, que expressam mais metaloproteases, ou com tumores estrogênio-negativos mais agressivos (Hancox *et al.*,

2009; Guttery *et al.*, 2010). Para alguns tipos de tumores de cabeça e pescoço, a elevada expressão de TN-C tem sido identificada como fator de mau prognóstico e baixa sobrevivência (Wang *et al.*, 2011).

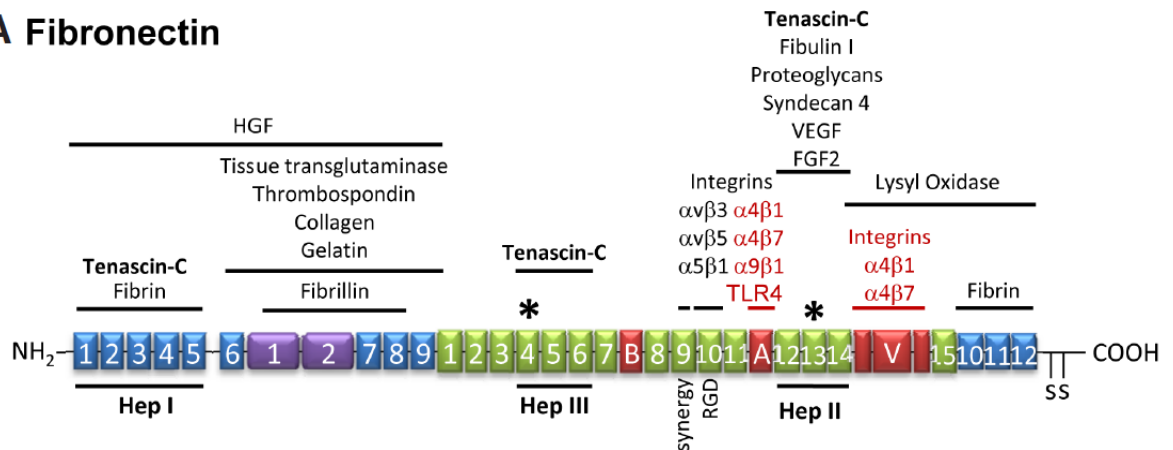
Em gliomas em geral, a elevada expressão de TN-C é correlacionada com um prognóstico ruim para o paciente (Leins *et al.*, 2003; Behrem *et al.*, 2005). Em astrocitomas de baixo grau e em oligodendromas, a TN-C tem sido encontrada em localização perivascular e proposta como um marcador de vasos tumorais. No entanto, não existem evidências inequívocas de que as células endoteliais sejam a fonte de TN-C perivascular, que pode ter sua origem nas células murais (pericitos). Já no caso particular dos GBM, foco principal da presente dissertação, a elevada expressão de TN-C pelas células tumorais faz com que a distribuição desta glicoproteína ocorra por toda a massa tumoral e não apenas ao redor dos vasos (Leins *et al.*, 2003).

A TN-C foi incluída recentemente em uma relação de 9 genes que possuem valor preditivo para a malignidade de células de GBM e para o potencial angiogênico destas (Colman *et al.*, 2011). No entanto, os mecanismos celulares envolvidos nos efeitos da TN-C sobre o crescimento tumoral e a angiogênese estão distantes de serem completamente compreendidos. Sabe-se que, em células de glioma, a TN-C parece estimular a proliferação celular ao competir com o sindecan-4 por um sítio de ligação à fibronectina (Huang *et al.*, 2001), com o provável relaxamento da adesão celular – por desestabilização das adesões focais - e ativação de diferentes vias de sinalização, como a via Erk/MAP quinase (Jones & Jones, 2000). O relaxamento das adesões focais também foi implicado na motilidade de células de GBM que expressam elevadas quantidades de TN-C (Hirata *et al.*, 2009).

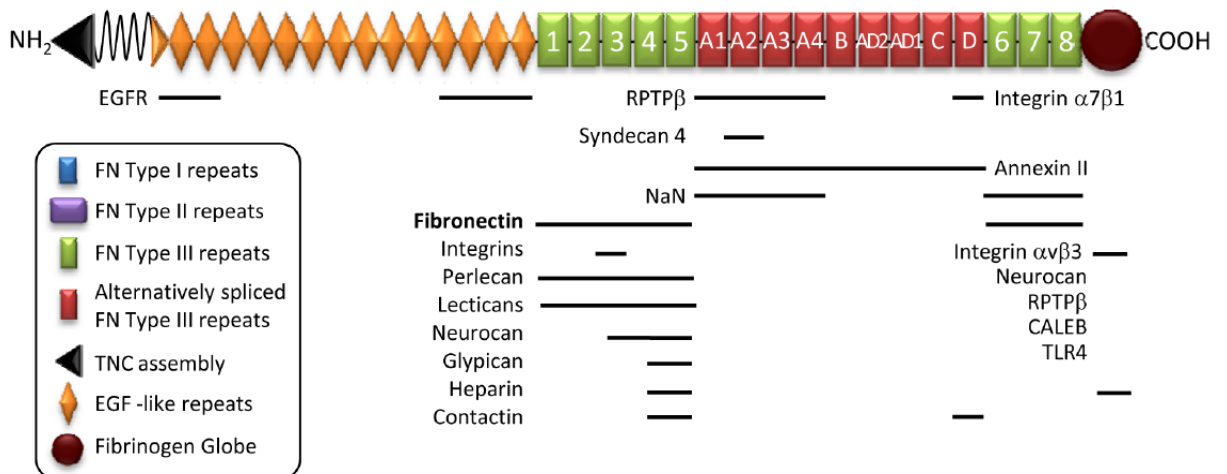
Estudos sobre a evolução dos genes da FN e da TN-C indicam que a parceria entre estas duas moléculas teve como consequência mais importante a aquisição do sistema vascular pelos vertebrados (Obberghen-Schilling *et al.*, 2011). Investigações sobre a morfogênese vascular, realizados em modelos de desenvolvimento, também apontam para uma divisão de tarefas entre estas duas proteínas para o estabelecimento de uma rede vascular funcional (Obberghen-Schilling *et al.*, 2011). No entanto, o impacto da TN-C tumoral sobre a morfogênese de vasos nos tecidos neoplásicos, bem como a sinalização celular envolvida neste processo, são tópicos ainda pouco conhecidos.

Figura 3 - Estrutura dos monômeros da Fibronectina e da Tenascina-C

## A Fibronectin



## B Tenascin-C



Legenda: (A) Fibronectina é uma proteína dimérica de 240-270KDa, composta por dois monômeros similares ou idênticos unidos por um par de pontes dissulfeto próxima a porção C terminal. (B) Tenascina-C é uma proteína formada por seis monômeros que se unem pela região N-terminal por pontes dissulfeto formando um hexâmero, 14,5 repetições da região EGF-like, 8 repetições tipo III da fibronectina constantes e mais de 9 originadas por *splicing* (A1-D), região fibrinogênio-like.

Fonte: Obberghen-Schilling *et al.*, 2011.

## Sinalização celular na angiogênese

As células endoteliais recebem múltiplas informações do seu microambiente, que as levam eventualmente a ingressar no processo de diferenciação celular para formação de novos vasos. Sinais angiogênicos promovem a proliferação, migração, resistência à apoptose e

mudanças no balanço proteolítico e na organização do citoesqueleto, através de etapas que culminam na formação de estruturas com lúmen capazes de carrear sangue para os tecidos.

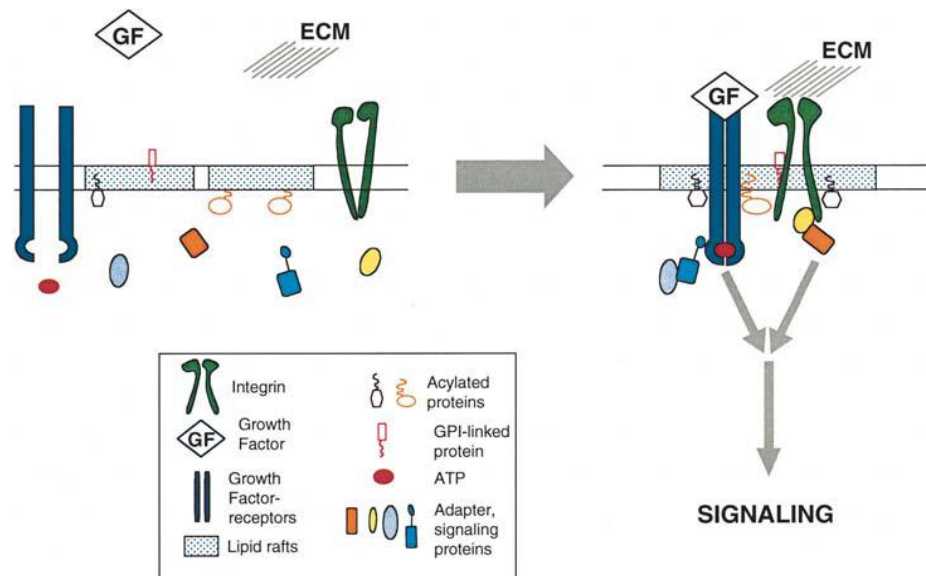
Nas últimas décadas, muitos conhecimentos foram acumulados sobre as vias de sinalização ativadas durante a angiogênese. Fatores angiogênicos como, por exemplo, VEGF e FGF são ativadores conhecidos de proliferação das células endoteliais, no entanto a interação destas células com a MEC através integrinas é igualmente importante para a eficiente ativação de vias de sinalização como a da MAPK, ERK1/ERK2 (Akiyama et al 1989; Meredith & Schwartz 1997; Takahashi et al, 1999; Giancotti & Ruoslahti 1999) (**Figura 4**). A expressão e atividade de ciclinas dependentes de quinase (CDKs), necessárias para a progressão do ciclo celular e, portanto, para a proliferação, são dependentes da adesão das células endoteliais a MEC (Fang et al 1996;. Zhu et al. 1996; Assoian 1997).

### **As Proteínas-Quinases C (PKCs)**

As proteínas quinases C (PKC) são uma família de quinases que fosforilam os resíduos de aminoácidos serinas e treoninas. As PKCs foram inicialmente identificadas como uma proteína quinase dependente de cálcio e fosfolipídio. Entretanto, pelo menos dez isoenzimas foram encontradas em mamíferos e agrupadas de acordo com sua homologia estrutural e característica de ativação (**Figura 5**). No Grupo 1, as isoenzimas "clássicas" (cPKCs) incluem as PKCs  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II, e  $\gamma$  são dependentes de cálcio para sua ativação e ativadas por diacilglicerol (DAG) ou pelo seu análogo, o éster de forbol (PMA); no Grupo 2, as PKCs "novas" (nPKCs), encontramos as PKCs  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ , e  $\theta$  que também são ativadas por DAG porém são independentes de cálcio. E constituindo o Grupo 3 estão as PKCs "atípicas" (aPKCs), compostas por  $\zeta$  e  $\lambda$ /1 são insensíveis a PMA/DAG e independentes de cálcio), podem ser ativadas por diferentes lipídeos como, por exemplo, a ceramida ( Wray *et al.*, 2008).



Figura 4 – Representação da integração de vias de sinalização por fatores de crescimento e interação célula- MEC mediada por integrinas



Fonte: Rüegg & Mariotti 2003

O domínio regulatório da PKC contém dois módulos conservados; o domínio C1 e o C2, eles podem se ligar a diferentes ativadores (Ono *et al.*, 1989). O domínio C1 possui uma região semelhante ao substrato de PKC que atua como um pseudosubstrato, de caráter regulatório (Soderling, 1990). Nesta região também estão os domínios semelhantes a *zinc finger*, que são importantes para ligação a DAG e PMA (Nishizuka, 1995; Pan & Coleman, 1990; Bell & Burns, 1991). Os sítios de ligação ao  $Ca^{2+}$  ficam na região C2. Diferente das PKCs convencionais, o domínio C2 das PKCs “novas” não possui aminoácido para a ligação de  $Ca^{2+}$ , enquanto que as PKCs atípicas não possuem o domínio C2 inteiro e contêm apenas um anel rico em cisteína no domínio C1 (Nishizuka, 1992; Schenk & Snaar-Jagalska, 1999; Shirai Y & Saito, 2002).

O domínio catalítico fica na posição C-terminal e é composto pela sítio de ligação a ATP (domínio C3) e o sítio de ligação ao substrato (domínio C4). Ao serem ativadas, as diferentes isoformas da PKC translocam para compartimentos sub-celulares específicos (Kraft *et al.*, 1982) e se ancoram a proteínas adaptadoras que são isoenzimas específicas denominadas de *Receptor for activated C kinase* (RACK). Além disso, as RACKs também são responsáveis por coordenar a interação das PKCs com seus substratos e proteínas de

sinalização, conferindo maior atividade catalítica e especificidade (Mochly- Rosen & Gordon, 1998; Khaner & Lopez, 1991).

Atualmente sabe-se que a ativação das diferentes isoformas de PKC está envolvida em diversos eventos celulares, como: proliferação (Matsuura *et al.*, 2004), diferenciação (Klug *et al.*, 1996), apoptose (Kraft *et al.*, 1982; Nishizuka, 1988; Keranen *et al.*, 1995), adesão celular, migração (Ron & Kazanietz, 1999), secreção (Sonnenburg *et al.*, 2001).

A função da PKC $\delta$ , por exemplo, pode variar bastante de acordo com o tipo celular em que está sendo expressa, os estímulos que levam à sua ativação, bem como à sua localização subcelular (Jackson & Foster, 2004). A PKC $\delta$  pode ter um efeito tanto pró- quanto anti-apoptótico e ainda um efeito tanto pró- quanto anti-proliferativo. Em algumas linhagens celulares a PKC $\delta$  inibe a progressão do ciclo celular o que pode ser compensado pela ativação da via das Src que leva à degradação da PKC $\delta$  (Zang *et al.*, 1997). A clivagem da PKC $\delta$  por caspases em um fragmento contendo apenas o domínio catalítico tem sido associada com a promoção de apoptose em alguns tipos celulares (Emoto *et al.*, 1995).

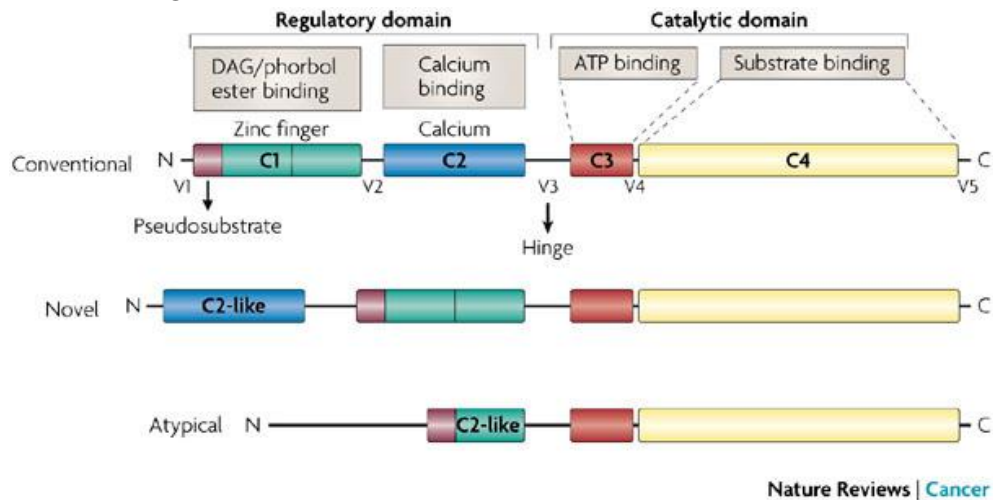
Apesar de já estar estabelecido que a ativação da proteína quinase C (PKC) é necessária para o crescimento, migração, adesão das células endoteliais, como também para a formação de vasos, o papel individual de cada isoforma de PKC nestes eventos não está bem definido. Esta dificuldade ocorre devido a natureza altamente conservada, principalmente, do domínio catalítico dessas isoformas, o que dificulta a especificidade dos inibidores. Assim, diferentes isoformas de PKC podem induzir aumento de expressão de VEGF em células não-vasculares em condições patológicas como diabetes, isquemia e tumorigênese. Este aumento de VEGF estimula a angiogênese endotelial por um mecanismo parácrino (Kawata *et al.*, 2001; Shih *et al.*, 1999; Suzuma *et al.* 2002; Young *et al.*, 2005). Wang *et al.*, 2002 demonstraram, através do uso de um oligonucleotídeo antisense específico para PKC $\alpha$ , que a inibição da PKC $\alpha$  em células endoteliais diminui a migração, adesão e formação do tubo *in vitro* além de inibir a neovascularização do miocárdio após uma isquemia *in vivo*. Xu e colaboradores (2007) demonstraram que a super-expressão de PKC $\alpha$ , em células endoteliais, estimula a produção de VEGF, aumentando a formação de estruturas tubulares *in vitro* por uma via autócrina.

## **As MAP-quinases do tipo ERK**

As MAP quinases são um grupo de enzimas que compartilham mecanismos reguladores geneticamente conservados e são ativados por dupla fosforilação em resíduos de treonina e tirosina por MAP quinase quinase (MAPKK ou MEK), que por sua vez são ativadas por MAP quinase quinase quinase (MAPKKK ou MEKK) pela fosforilação de resíduos de serina e treonina ( Lewis et al. 1998; Kyriakis & Avruch, 2001).

As ERKs são quinases pertencentes à família das MAP kinases que incluem, ainda, a JNK (quinase c-Jun amino terminal), p38 e ERK5(ou BMK-1). Apresentam duas isoformas, ERK1 e ERK2, que possuem 83% de homologia entre si e estão envolvidas com proliferação e diferenciação celular. (revisto por Krishna e Narang, 2008). Essas quinases transmitem sinais que resultam na fosforilação de muitas moléculas com funções críticas nas células como: fatores de crescimento, proteínas do citoesqueleto, fosfolipases, outras proteína-quinases e/ou enzimas reguladoras, as quais resultam no controle da proliferação e diferenciação assim como no metabolismo e apoptose (Johnson & Lapadat, 2003).

Figura 5 - Representação esquemática das estruturas e da classificação das isoformas de PKC



Legenda: A PKC possui 4 domínios conservados (C1-4): C1 contém 1 ou 2 motivos que formam o sítio de ligação do diacilglicerol ou éster de forbol. C2 contém o sítio de ligação para os ácidos lipídicos e de cálcio. C3 e C4 formam o sítio de ligação ao ATP e de substrato da unidade catalítica. O domínio C2 das PKCs novas não possui aminoácidos para a ligação ao cálcio. As PKCs atípicas têm somente um motivo rico em cisteína e o sítio de ligação do éster de forbol não foi detectado.

Fonte: Mackay & Twelves 2007

### Proteína-Quinase B (PKB/Akt)

Também chamadas de PKB, as Akt são um grupo de proteínas serina/treonina-quinase que têm um papel fundamental na regulação de processos celulares como crescimento, sobrevivência, angiogênese, apoptose e metabolismo celulares (Brazil & Hemmings 2011). Estas proteínas são ativadas por diversos fatores de crescimento, insulina e receptores de adesão como as integrinas principalmente  $\alpha v \beta 3$ . Brooks *et al.*, (1994) observaram que antagonistas contra integrinas  $\alpha v \beta 3$  perturbam a angiogênese ao promoverem apoptose de células endoteliais e conseqüentemente a regressão de estruturas tubulares em ensaios *in vivo*, demonstrando desta forma a importância dessas integrinas para a manutenção da viabilidade endotelial na angiogênese. Assim, sem aderência a MEC, a proliferação cessa e

a apoptose é induzida, ressaltando a importância fundamental de MEC para a angiogênese (Senger & Davis, 2011).

A via Akt/PKB ao ser ativada, pode promover a sobrevivência celular ao inativar proteínas como Bad, Bax e caspase 9.(Song *et al.*, 2005; Testa & Bellacosa 2001). Além disso, Aoudjit & Vuori em 2001 demonstraram o envolvimento do receptor de morte CD95(Fas) na indução de apoptose, possivelmente ao contribuir para a inativação da proteína-quinase B (PKB/Akt), proteínas-chave das vias de transdução que desativam proteínas pró-apoptóticas, principalmente as da via mitocondrial (Bachelder *et al.*, 2001).

### **Antecedentes do presente trabalho**

Dados recentes de nosso grupo contribuem para a compreensão da diferenciação angiogênica no ambiente tumoral. Alguns dos resultados desta dissertação de Mestrado fizeram parte desta publicação (Alves et al, 2011 – Anexo), na qual observamos que matrizes de glioma causam seletivamente a apoptose por desaderência (*anoikis*), e que a TN-C de origem tumoral e imobilizada em matrizes produzidas por gliomas em cultura está envolvida na seleção de uma sub-população endotelial resistente à apoptose, que se torna mais proliferativa, apesar de deficiente no processo tubulogênico (ou seja, na capacidade de formar estruturas com lúmen *in vitro*). A neutralização do domínio EGF-like da TN tumoral (Alves *et al.*, 2011), não foi capaz de impedir a *anoikis* endotelial. No entanto, reverteu parcialmente a deficiência tubulogênica da população que sobrevive, indicando que outros domínios desta glicoproteína poderiam estar envolvidos nestes efeitos. O fenótipo exibido por esta sub-população endotelial resistente à *anoikis* induzida por matrizes de gliomas está em concordância com o tipo de vascularização observada em muitos gliomas de alta malignidade, caracterizados por elevado índice de proliferação endotelial e com a predominância de vasos mal formados e hiperpermeáveis (Munn, 2003).

Na continuidade deste trabalho, procuramos explorar aspectos adicionais sobre o papel da TN-C na morfogênese vascular, com ênfase na sinalização celular que resulta no aumento da proliferação celular e no defeito na tubulogênese, resultantes do contato das células endoteliais com a matriz de gliomas, além de aprofundarmos a caracterização de outros domínios da TN-C envolvidos.

## 1 OBJETIVOS

### 1.1 Objetivos específicos

- a) Estudar a composição da matriz extracelular de astrócitos normais e neoplásicos com ênfase nas glicoproteínas FN e TN-C;
- b) Investigar os efeitos de substratos mistos, contendo proporções definidas de FN e TN-C, na adesão e tubulogênese endotelial;
- c) Identificar os domínios funcionais da TN-C envolvidos na regulação da morfogênese endotelial;
- d) Investigar as principais vias de sinalização em células endoteliais expostas a matrizes ricas em TN-C.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Cultura De Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana (HUVEC)

HUVECs primárias foram obtidas pelo 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). Os cordões foram colhidos e armazenados a 4°C em frascos com PBS pH 6,5 enriquecido com glicose 0,111 M, estéril e utilizados em até, no máximo, 24 horas após o parto. As células foram descoladas da parede da veia com a adição de colagenase 0,1% em PBS rico em glicose. Os cordões foram mantidos a 37°C por 10 minutos e após este tempo, as células foram coletadas em meio 199 (M199) complementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina 2 mM, bicarbonato de sódio 26 mM, fungizona 2,5µg/ml, penicilina 500U/ml e gentamicina 40 µg/ml. A suspensão celular foi submetida a uma centrifugação a  $180 \times g$  durante 10 minutos para sedimentação das células, que depois foram ressuspensas em M199 com SFB a 20 %. A suspensão celular foi distribuída em garrafas de cultura de 25cm<sup>2</sup> de área previamente recoberta com gelatina 1% estéril. As garrafas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida de CO<sub>2</sub> a 5%, até as culturas atingirem o estado de confluência e então repicadas com tripsina 0,025% diluída em uma solução contendo NaCl 0,14M, NaHPO<sub>4</sub> 9mM, KCl 3mM, vermelho de fenol 0,02% e ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) 0,02%- *solução versene* e imediatamente usadas nos experimentos aqui descritos.

### 2.2 Cultivo das linhagens celulares

Neste trabalho foi utilizada a linhagem de glioma humano U373 MG (descrito como astrocitoma grau III *in vitro* e de grau IV *in vivo*, ou GBM – ATCC, EUA) e de fibroblastos de gengiva humana FGH (Banco de Células do Rio de Janeiro, UFRJ). Essas células foram

crecidas em meio DMEM-F12 (Gibco, Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12) suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina e 500 µg/ml de penicilina/estreptomicina, 2,5 µg/ml de fungizona, mantidas em atmosfera úmida de CO<sub>2</sub> a 5% até atingirem confluência, para depois serem repicadas com tripsina 0,025% diluída em solução versene. O meio de cultura foi renovado a cada 2 – 3 dias.

### 2.3 Obtenção das matrizes extracelulares (MECs) imobilizadas livres de células

As linhagens U373 MG, FGH e as células primárias HUVECs foram cultivadas em estado confluência por 48 horas, em condições normais de cultura e então lavadas em M199 (HUVECs) ou DMEM-F12 (U373 MG e FGH) sem soro e lisadas com solução de Triton X-100 0,1%, NH<sub>4</sub>OH 0,1 M em PBS-Ca<sup>2+</sup> a 4<sup>o</sup>C, contendo inibidores de proteases – PMSF 1Mm e leupeptina 40 µM. Os restos celulares foram eliminados por lavagens sucessivas e delicadas com PBS-Ca<sup>2+</sup>, estéril e gelado. A rede protéica restante, invisível ao microscópio óptico, foi denominada *matriz imobilizada livre de células*, na qual foi possível detectar elementos da matriz extracelular por técnicas imunocitoquímicas. Em seguida, essas matrizes foram incubadas com PBS contendo 0,1% de BSA por 2 horas, a 37<sup>o</sup>C em atmosfera úmida de CO<sub>2</sub> a 5%.

### 2.4 Bloqueio de diferentes epítomos da tenascina-C

Após a obtenção das MECs imobilizadas de U373 MG em placa de 24 poços, estes foram saturados com PBS com 0,1% de BSA por 2 horas a 37<sup>o</sup>C em atmosfera úmida de CO<sub>2</sub> a 5%. Em seguida, incubamos as MECs com anticorpos neutralizantes contra diferentes epítomos da TN-C, em PBS, por 2 horas. Os seguintes anticorpos foram utilizados a 10 µg/ml: FNIII1-3 (MAB1911, Millipore, monoclonal), FNIII4-5 (MAB1923, Chemicon, monoclonal), FNIII 6-7 (MAB1918, Chemicon, monoclonal), FNIII-B (MAB1918, Millipore, monoclonal), policlonal (AB19011, Millipore). O anticorpo monoclonal contra EGF-like (clone BC-24, Sigma) foi usado na diluição de 1:500. O controle de isotipo IgG1 (Sigma) foi usado a 30



$\mu\text{g/ml}$ . Após o bloqueio destes sítios funcionais da TN-C, as MECs imobilizadas foram utilizadas nos ensaios.

## **2.5 Preparo de substratos mistos definidos de tenascina-C (TN-C) e fibronectina (FN)**

Os substratos foram preparados com fibronectina purificada (Invitrogen, Brasil) e TN-C isolada de meio condicionado derivada de glioma U251 (Chemicon / MilliporeCorp, Billerica, MA). Essas proteínas foram diluídas em tampão bicarbonato 10 mM, pH 9,5 e misturadas em proporções molares variando de 1:1 a 1:100 (FN:TN-C). As diferentes misturas foram incubadas em placa de 24 poços, *overnight* a 4<sup>0</sup>C. Em seguida, os substratos foram incubados com PBS contendo 0,1% de BSA, para saturação da superfície plástica, por 2 horas, a 37<sup>0</sup>C em atmosfera úmida de 5% CO<sub>2</sub>.

## **2.6 Incubação de células endoteliais com matrizes imobilizadas (livres de células) e/ ou substratos mistos FN/TN-C**

Após a obtenção das matrizes extracelulares de U373 MG, fibroblastos FGH, HUVECs e dos substratos mistos de FN/TN-C em placa de 24 poços em triplicata, as células endoteliais foram descoladas de seu substrato de cultura com tripsina 0,025% diluída em solução versene e plaqueadas sobre essas matrizes e substratos recentemente preparados (10<sup>5</sup>células /poço) em meio de cultura M199 contendo BSA 0,1%, foram incubadas a 37<sup>0</sup>C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após o tempo de 24 horas, as células foram tripsinizadas e quantificadas por contagem de cada poço em hemocitômetro.

## **2.7 Ensaio de tubulogênese com Matrigel™**

As HUVECs semeadas nas MECs nativas e/ou substratos mistos definidos de FN/TN-C foram tripsinizadas com tripsina 0,025% diluída em solução versene e plaqueadas (5 x 10<sup>4</sup>

células) sobre 50µl de Matrigel™ /poço (Becton & Dickinson) em placa de 96 poços, em M199 + 5% SFB por 16 horas. Após 16 horas sobre o gel, as células foram fixadas com glutaraldeído 1,1% em PBS por 15 minutos em temperatura ambiente (Zemani *et al.*,2005). A remoção do fixador foi feita por três lavagens longas com PBS. Não houve danos nas estruturas tubulares por esse tipo de fixação. O número total de ramificações (brotos ou prolongamentos celulares endoteliais, que resultam no aspecto em “rede” da diferenciação angiogênica) foi quantificado em pelo menos 5 campos representativo de cada poço. As condições foram realizadas em triplicatas.

## **2.8 Análise das vias de sinalização envolvidas na modulação da diferenciação angiogênica mediada por matrizes de glioma U 373 MG**

### **2.8.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida – SDS (PAGE-SDS) e Western Blotting**

Para a análise do padrão de ativação de proteínas de sinalização nas células endoteliais, extratos de HUVECs incubadas por 24 horas com as diferentes matrizes utilizadas neste trabalho foram analisados por *western blotting*. As células endoteliais foram plaqueadas sobre MECs imobilizadas de U373 MG e HUVEC em placas de 6 poços ( $6 \times 10^5$  células/poço) em meio 199 com 0,1% de BSA, *overnight* em atmosfera úmida 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Os poços foram lavados 3 vezes com meio 199 sem SFB para a retirada das células que não aderiram. Em seguida, as células foram incubadas com tampão de lise pH 7,5 (Tris 20mM, NaCl 150mM, Triton-100 1%) e inibidores de protease (PMSF 1mM e leupeptina 40µM) por 15 minutos a 4°C. O extrato resultante foi centrifugado e o sobrenadante diluído em tampão de amostra (TRIS 25 mM, glicerol 10%, azul de bromofenol (ABF) 0,02%, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 5% pH 6,8). As amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos. Foi utilizado um sistema eletroforese de mini-gel vertical (Mini-Protean II Tetra, BioRad). O gel fracionador foi preparado a 12% de acrilamida e o gel espaçador a 3% de acrilamida. O gel foi colocado em uma cuba com tampão Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1% e as amostras aplicadas ao gel no volume de 25µl/poço. Foi utilizado um padrão de peso molecular na faixa de 12 kDa a 225 kDa. A eletroforese foi desenvolvida na voltagem fixa de 100V até que o corante marcador da frente de migração (ABF) atingisse o fundo do gel. Os

componentes separados por peso molecular foram transferidos para uma membrana de PVDF (Imobilon-P, Millipore, São Paulo), utilizada segundo as recomendações do fabricante. Esta membrana foi previamente preparada através de incubações sequenciais com metanol absoluto, água destilada e tampão de transferência (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e metanol 20%). A membrana foi montada sobre o gel em um sistema de transferência Trans-Blot para mini-gel da Biorad. O sistema foi colocado em uma cuba com tampão de transferência e a transferência ocorreu por 90 minutos com voltagem de 100 V sob refrigeração. Após esse tempo, a membrana foi bloqueada *overnight* com BSA 5% em tampão TBS, a 4°C. Cada membrana foi incubada *overnight* a 4°C com o anticorpo para determinada proteína de interesse. Foram utilizados anticorpos contra as seguintes proteínas: p-PKC- $\alpha$ ; p-PKC- $\delta$ ; p-ERK (#4370S, rabbit); ERK (#4695, rabbit); p-Akt (4058S, rabbit) e Akt (#9272S, rabbit) (todos da Cell Signaling, EUA). Quando não disponível o anticorpo para as formas não fosforiladas, o controle quantitativo das bandas reveladas em cada condição foi realizado pela detecção de  $\beta$ -actina (Sigma). Após a incubação com anticorpos primários, as membranas passaram por sucessivas lavagens com TBS-Tween®20 0,05% e foi incubada com os anticorpos secundários conjugados a HRP (anti-Igs de camundongo ou coelho, 1:2000, Dako Patts, Suécia) por 1 hora. Após esse tempo, a membranas foram novamente lavadas com TBS-Tween®20 0,05%. Depois de lavada, a membrana foi incubada com um reagente de detecção da atividade da HRP (ECL, GE Healthcare Life Sciences, São Paulo) por quimioluminescência 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.

### 2.8.2 Tratamento das HUVECs com moduladores de isoformas de PKC

O ensaio de diferenciação tubulogênica em Matrigel descrito no item 2.8 foi realizado igualmente na presença de moduladores farmacológicos de PKCs. HUVECs foram semeadas sobre as diferentes matrizes imobilizadas e pré-tratadas ou não com PMA (16 nM), rotlerina (6 $\mu$ M) ou não com RO 320432 (10nM) por 30 minutos a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 3 lavagens com M199 sem SFB, essas células foram tripsinizadas e analisadas em um ensaio de tubulogênese com Matrigel.

## 2.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas com médias de 3 experimentos e o grau de significância das diferenças encontradas foi determinado através do teste T- Student, no programa Excel (Microsoft).

### 3 RESULTADOS

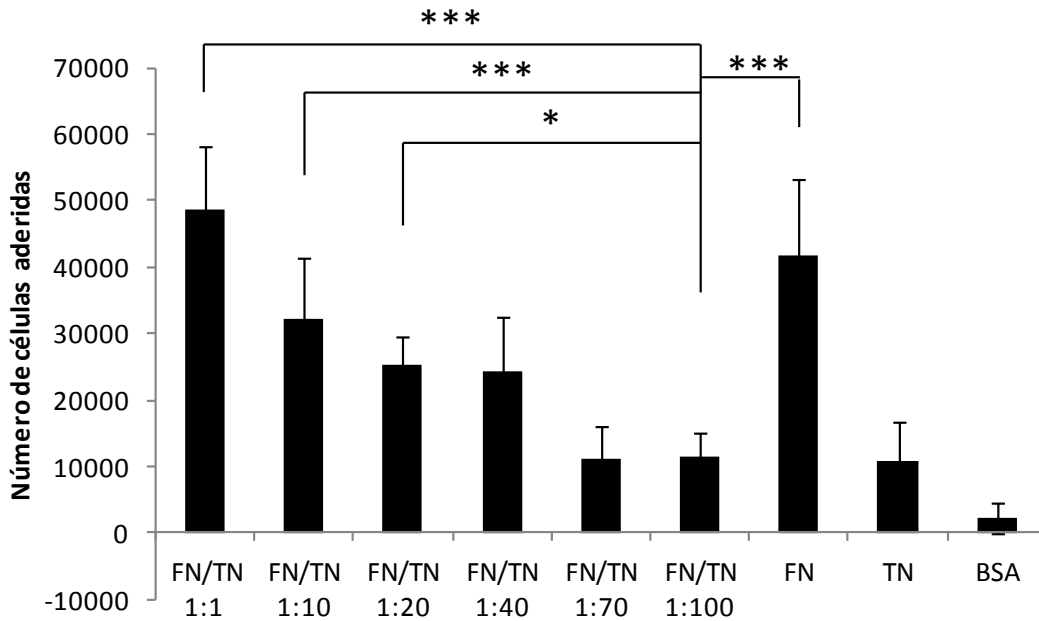
#### 3.1 Adesão e diferenciação de células endoteliais incubadas sobre substratos definidos de Fibronectina/ Tenascina-C

Conforme mencionamos ao final da **Introdução**, na presente dissertação buscamos nos aprofundar sobre os mecanismos celulares e a sinalização envolvida nos efeitos da matriz de gliomas sobre a diferenciação endotelial, iniciados por Alves (2007), que foram: (i) indução de apoptose induzida por desaderência (anoikis) e (ii) nas células endoteliais sobreviventes, aumento da capacidade proliferativa e aquisição de defeitos na tubulogênese. Naquele trabalho, foi demonstrado que diversas linhagens de astrocitomas de grau III e de glioblastomas expressavam elevados níveis de TN-C que excediam de 15 a quase 100 vezes os níveis de FN incorporada em suas matrizes. A linhagem U373 MG, que se caracteriza *in vitro* como um astrocitoma grau III e *in vivo* como um glioblastoma multiforme (GBM) - a forma mais agressiva dentre os gliomas – apresentou uma relação FN:TN-C de 1:94. A matriz de fibroblastos normais humanos (linhagem FGH, de gengiva), que não induziu *anoikis* endotelial, nem defeitos na tubulogênese de células endoteliais, apresentou uma relação FN:TN-C de 1:2,5.

Estes dados, obtidos apenas com matrizes imobilizadas secretadas pelas diferentes células, indicavam fortemente que o balanço entre FN e TN-C nestas matrizes era determinante para a seleção do fenótipo aberrante, nas células endoteliais que sobreviviam ao contato com a matriz neoplásica. Assim, uma etapa importante para demonstrar esta hipótese seria obter a reprodução destes fenótipos a partir de substratos definidos, que simulassem as composições relativas em FN e TN-C, tal como determinadas previamente para matrizes imobilizadas. Desta maneira, nós realizamos ensaios de adesão sobre substratos com diferentes proporções de FN e TN-C, que foram reproduzidas desde a equivalência molar relativa de ambas as proteínas (1:1) até 1:100. Os efeitos desses substratos mistos também foram comparados com substratos contendo apenas FN e TN-C. Neste ensaio também usamos matrizes secretadas por fibroblastos FGH (FN:TN-C = 1:2,5) (Alves *et al.*, 2011). A **Figura 6** representa a quantificação da adesão das HUVECs, após 24 horas de sua adição sobre os substratos de FN e TN-C. A incubação de HUVECs com matriz extracelular secretada por fibroblastos FGH, com o substrato misto de FN:TN na proporção de 1:1 e com FN pura não

altera significativamente a adesão celular, mas subseqüentes aumentos da TN-C no conteúdo dos substratos mistos na resulta na diminuição da adesão celular.

Figura 6 - O efeito da MEC de U373 na adesão celular é reproduzido por um substrato misto definido de FN/TN-C



Legenda :  $2 \times 10^5$  HUVECs foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo variáveis combinações de FN e TN-C em M199 com 0,1% BSA. Após 24 horas de adesão, as células foram tripsinizadas e quantificadas com azul de tripan por contagem em hemocitômetro (\* $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

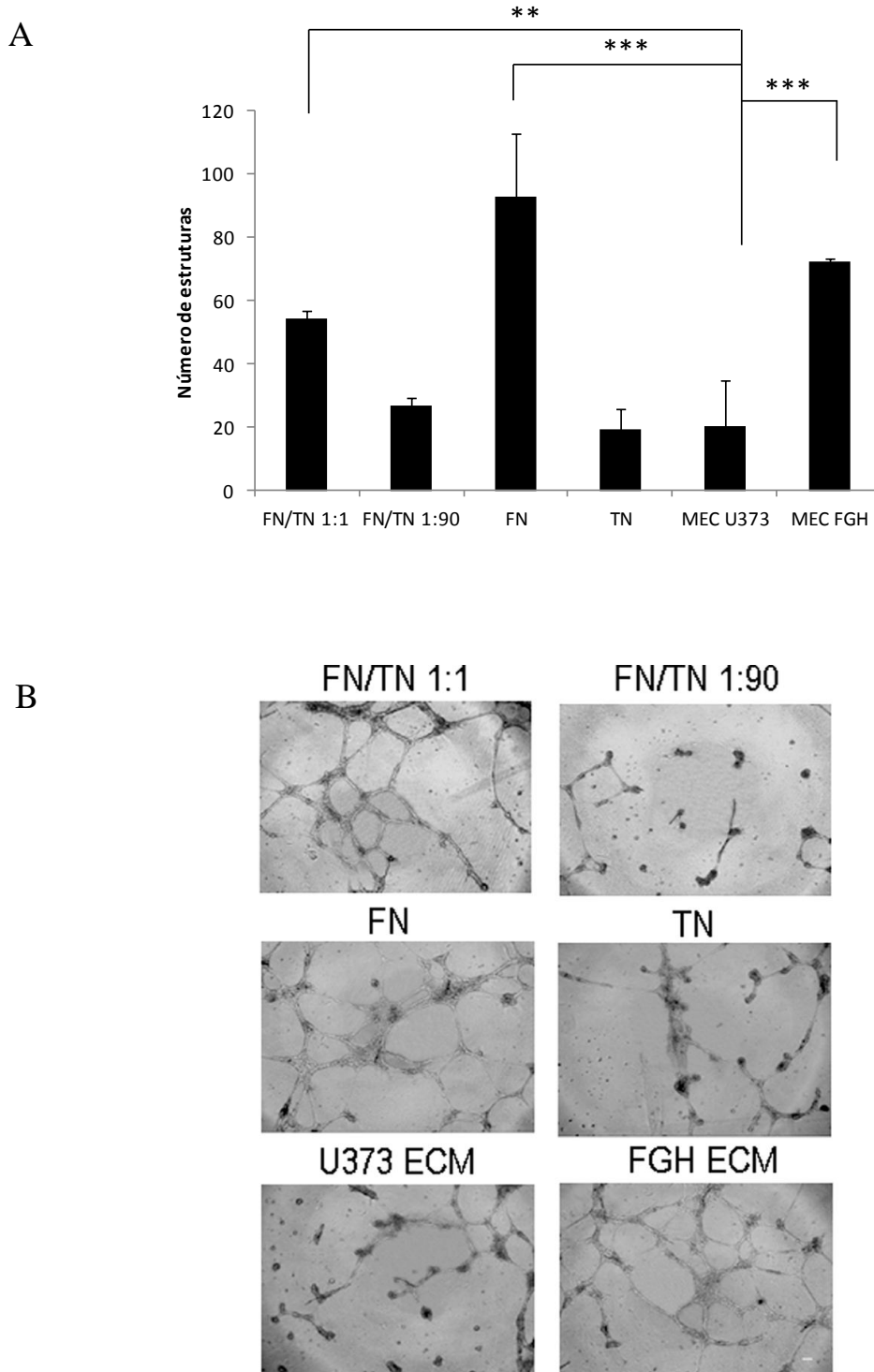
As células endoteliais incubadas por 24 horas nos substratos definidos com proporções variáveis de FN e TN-C foram também analisadas quanto à capacidade de diferenciação angiogênica (tubulogênese). Neste ensaio, as células endoteliais cultivadas sobre as matrizes de U373 MG, FGH e sobre os diferentes substratos mistos de FN e TN-C foram transferidas para o Matrigel®, um ambiente tridimensional que favorece a tubulogênese endotelial. Como pode ser observado na **Figura 7 (A e B)**, células endoteliais previamente incubadas por 24 horas em *substrato* misto rico em TN-C (FN:TN-C a 1:90) e em substrato puro de TN-C demonstraram ter menor capacidade tubulogênica e semelhante àquelas incubadas sobre matriz de U373 MG. Entretanto, as células endoteliais incubadas em substratos contendo baixas proporções de TN-C (FN:TN-C em relação 1:1 molar e matriz FGH) foram capazes de fazer tubulogênese corretamente.

Apesar do substrato puro de TN-C induzir uma deficiência na capacidade tubulogênica, os dados obtidos usando a matriz de fibroblastos FGH como um suporte de adesão e a combinação de ambas as moléculas definidas na proporção de 1:1 reforçam a hipótese de que o conteúdo de FN nessas matrizes pode modular ou mesmo anular os efeitos da TN-C na tubulogênese endotelial e que, portanto deve ser o balanço FN: TN-C que desempenha um papel fundamental na estabilidade de estruturas tubulares endoteliais.

### 3.2 Identificação dos domínios da TN-C envolvidos na modulação da tubulogênese

Em seguida, fomos averiguar o papel de diferentes domínios da TN-C nesta má formação de estruturas tubulares *in vitro*. Na etapa anterior deste trabalho, havíamos identificado a participação do domínio EGF-like N-terminal da TN-C na indução do defeito na tubulogênese (Alves *et al.*, 2011). No entanto, os chamados “domínios com homologia às repetições de tipo III da fibronectina (FNIII)”, presentes na tenascina-C, também têm sido envolvidos na regulação da diferenciação e proliferação celular (Tamaoki *et al.*, 2005).

Figura 7 - Ensaio de tubulogênese das HUVECs incubadas sobre substratos misto de FN/TN-C e sobre MECs derivadas de U373 e FGH



Legenda: (A) HUVECs previamente plaqueadas sobre MEC derivadas de FGH e U373 ou substratos mistos de FN/TN-C por 24 horas, foram tripsinizadas e então plaqueadas ( $5 \times 10^4$  cels/poço) sobre 50 $\mu$ l de Matrigel™ (teor reduzido em fatores de crescimento), em M199 5% SFB. Após 16 horas, o número total de estruturas tubulares foi quantificado. (B) Aspecto das estruturas tubulares das HUVECs após 24 horas sobre diferentes substratos. (\* $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).



Desta maneira, decidimos testar outras regiões da molécula. HUVECs foram incubadas sobre MECs de glioma U373 MG, bloqueadas ou não para diferentes epítomos da TN-C, com o uso de anticorpos específicos (usamos o isotipo IgG1 como controle). Observamos que ao bloquearmos os domínios FNIII 1-3, FNIII4-5 e as repetições *EGF-like* da região N-terminal da TN-C com os anticorpos neutralizantes, a capacidade tubulogênica das células endoteliais melhorou significativamente (**Figura 8**).

Sendo estas as repetições FNIII mais próximas ao domínio EGF-like previamente implicado nos efeitos da matriz de células U373 MG, este resultado sugere que os domínios mais próximos a região N-terminal da TN-C tenham um papel direto na morfogênese vascular.

### **3.3 Aquisição do defeito tubulogênico ao longo do tempo de incubação de células endoteliais com matrizes de células U373 MG**

Conforme já mencionado, a matriz de células U373 MG promove a desaderência de uma sub-população endotelial, que entra em apoptose. O descolamento se inicia lentamente a partir de 4-6 horas de ensaio, se acelerando acentuadamente após este tempo (Alves, 2011). No entanto, a cinética de aquisição do defeito tubulogênico, na sub-população que permanecia aderida e sobrevivendo ao contato com a matriz tumoral, não havia sido ainda analisada. A dinâmica deste processo é fundamental para o estudo dos eventos de sinalização envolvidos. As células endoteliais, HUVECs, foram então incubadas por diferentes tempos sobre a MEC de U373 MG e em seguida plaqueadas sobre Matrigel, para análise e quantificação de estruturas tubulares.

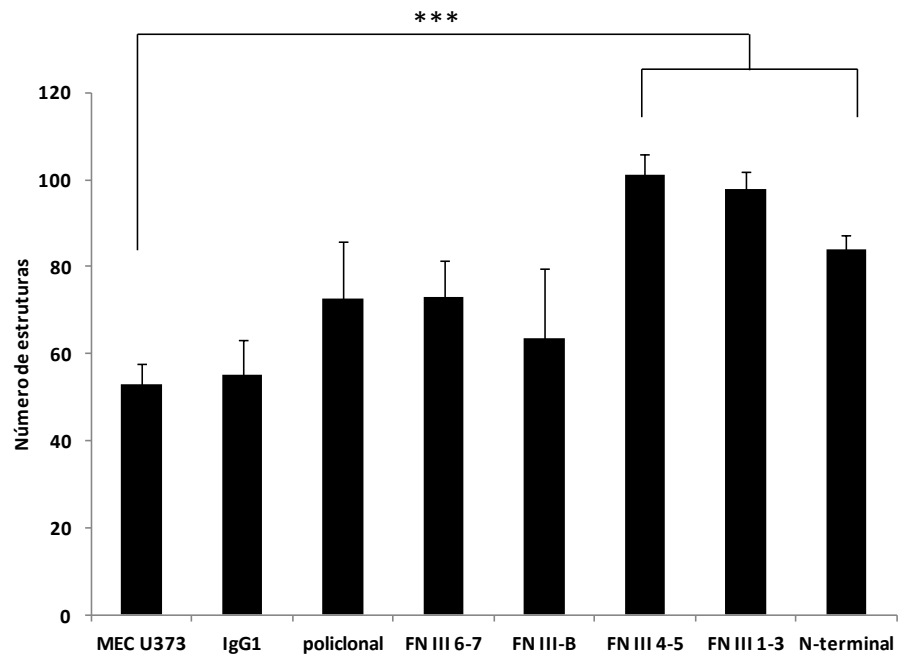
Observamos que a medida que, de forma semelhante ao que observamos com a cinética do processo de indução de *anoikis* pelas matrizes de U373 MG (Alves et al, 2011), a indução de defeitos na tubulogênese endotelial requer contatos mais longos do que 3 horas (**Figura 9**), sugerindo que este fenótipo disfuncional na tubulogênese das HUVECs requeira processos de sinalização que dependam de expressão de proteínas ou que envolvem vias ativadas tardiamente, nos processos de diferenciação celular.

Figura 8 - Papel de diferentes domínios da TN-C na indução do defeito tubulogênico em células endoteliais

A

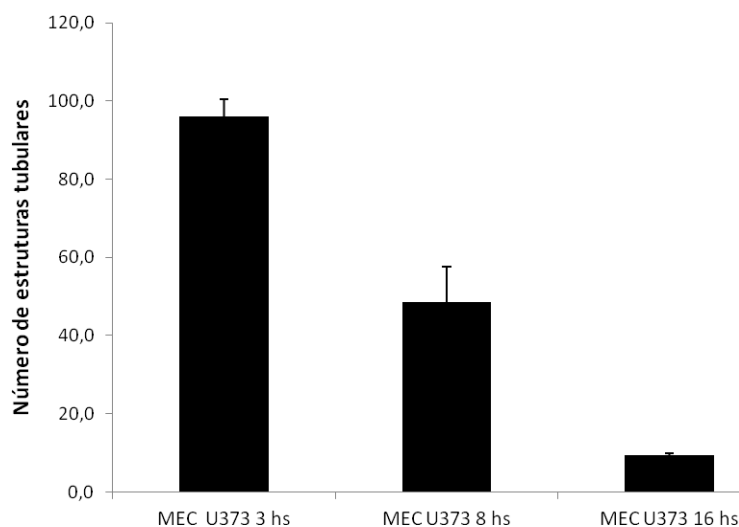


B



Legenda: (A) Estrutura em domínios do monômero da tenascina-C. (B) HUVECs foram plaqueadas sobre matrizes de células U373 MG pré-tratadas com anticorpos neutralizantes contra diferentes epítomos da TN-C, por 24 horas. Em seguida, as células endoteliais foram tripsinizadas e semeadas ( $5 \times 10^4$  células/poço) sobre 50 $\mu$ l de Matrigel™ (reduzido em fatores de crescimento), em M199 5% SFB (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Figura 9 - Aquisição do defeito tubulogênico ao longo do tempo



Legenda: HUVECs plaqueadas sobre as MECs de U373 por diferentes tempos (3, 8 e 16 horas) em M199 com 0,1% de BSA, foram tripsinizadas e plaqueadas sobre 50  $\mu$ l de Matrigel com fator de crescimento reduzido, em M199 com 5% SFB ( $5 \times 10^4$  células/poço). Após 16 horas, as estruturas tubulares foram quantificadas (\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 3.4 Análise dos Processos de Sinalização em Células Endoteliais incubadas com matriz de células U373 MG

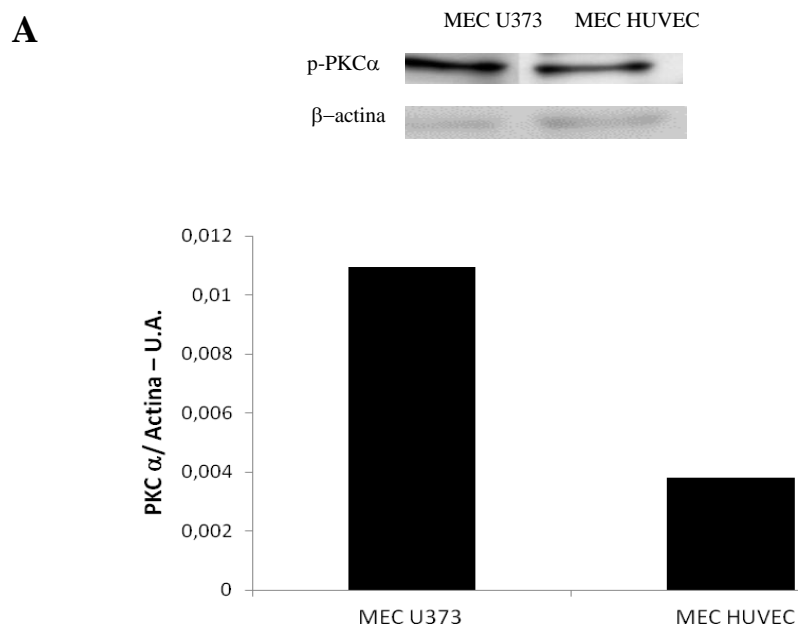
Sabendo que as células endoteliais incubadas por, no mínimo, 16 horas com a matriz de células de astrocitoma/GBM U373 MG perdem a competência para formar tubos e se tornam mais proliferativas, nesta etapa passamos a investigar vias de sinalização que têm sido descritas com algum envolvimento nestes processos celulares. A sinalização celular implicada na angiogênese tem sido elucidada principalmente com base, por um lado, em estudos dos mecanismos de ação de fatores angiogênicos, como o VEGF e no estudo de modelos de cultura 3D, como os de matrigel e de géis de colágeno e fibrina (Muñoz-Chápuli *et al.*, 2004; Davis & Senger, 2011). As principais vias identificadas como essenciais neste processo são as mediadas por quinases da família das proteínas quinase C (PKCs), as MAP quinases do tipo ERK e a proteína quinase B/Akt.

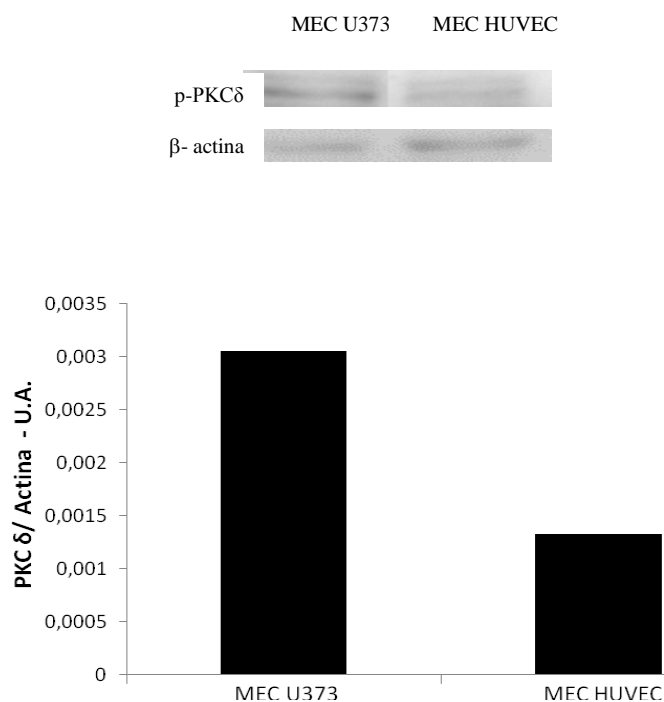
A família das proteína-kinase C (PKC) tem sido descritas com um papel importante na regulação da proliferação e diferenciação celular e, em particular, da diferenciação angiogênica (Klug *et al.*, 1996; Yoshiji *et al.*, 1999; Armstrong, 2004). Mais especificamente,

nos interessamos pelas isoformas PKC- $\alpha$  e PKC- $\delta$  e por isso resolvemos investigar se a interação destas células com as MECs da linhagem U373 MG modularia estas quinases. Incubamos as HUVECs sobre MEC de U373 MG e de HUVEC (controle autólogo) por 24 horas e em seguida analisamos seus extratos celulares através da técnica de *western blotting*, com auxílio de anticorpos específicos.

A **Figura 10A** mostra os perfis de fosforilação obtidos quando a PKC- $\alpha$  foi analisada com um anticorpo que reconhece o sítio de fosforilação T638 – treonina 638. A análise das bandas reveladas por *western blotting* mostra que a incubação de células endoteliais com matrizes do astrocitoma /GBM U373 MG leva ao aumento de fosforilação no sítio T638, quando comparamos ao perfil obtido para células endoteliais incubadas em matriz autóloga. Na ausência de fosforilação em uma segunda treonina, situada no sítio ativo, a T497, a fosforilação na T638 pode significar desativação da PKC- $\alpha$  por fosfatases (Bornancin e Parker, 1996). Para a isoforma PKC- $\delta$  (**Figura 10B**), o aumento da fosforilação no sítio T505 em células endoteliais incubadas com matriz de células U373 MG é indicativo inequívoco de ativação da enzima.

Figura 10 - Análise de sítios de fosforilação de PKC $\alpha$  e PKC $\delta$  em células endoteliais incubadas sobre matrizes imobilizadas



**B**

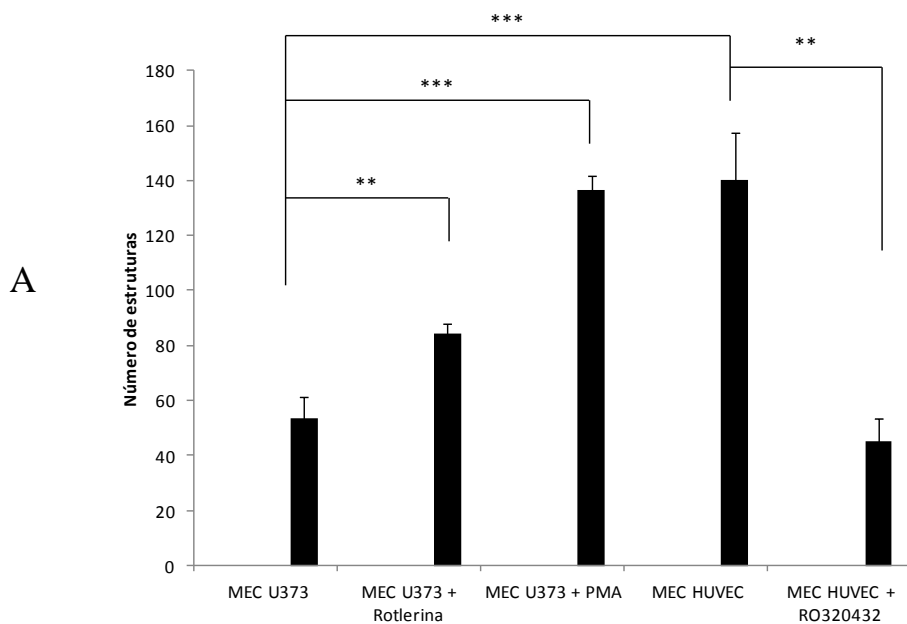
Legenda:  $6 \times 10^5$  HUVECs foram semeadas em placa de 6 poços contendo MECs nativas de U373 e de HUVECs. Após 24 horas de adesão, os extratos celulares foram analisados por *western blotting*, usando anticorpos contra sítios específicos de fosforilação (n=3, representação de um experimento típico e reprodutível).

Outra abordagem para estudo do estado de ativação destas isoformas de PKC é o uso de moduladores farmacológicos seletivos. Assim, células endoteliais incubadas 24 horas com diferentes matrizes foram pré-tratadas durante os 30 minutos finais deste período com inibidores seletivos de PKCs ou com o ativador PMA (éster de forbol-miristato). Os resultados são mostrados na **Figura 11A e 11B**. Observamos que as HUVECs semeadas sobre MEC de células U373 MG tratadas com PMA 16 nM (ativador de PKCs do grupo 1 e do grupo 2), ou com rotlerina 6  $\mu$ M (inibidor seletivo de PKC $\delta$ ), recuperaram a capacidade de formar tubos quando comparadas com o controle (HUVECs incubadas sobre MEC de U373 MG) sem tratamento. Além disso, as HUVECs semeadas sobre a MEC autóloga tratada com RO 320432 10nM (inibidor seletivo de PKC $\alpha$ ) mostrou-se deficiente na capacidade de formar tubos quando comparada com o controle (HUVECs semeadas sobre MEC de HUVEC sem tratamento). Desta forma, podemos sugerir que a PKC $\delta$  exerce um efeito antagônico à PKC $\alpha$  e que a MEC de glioma tem um importante papel na indução de um fenótipo disfuncional das HUVECs, por um processo dependente de PKC $\alpha$ . Esses dados revelam ainda que o defeito na

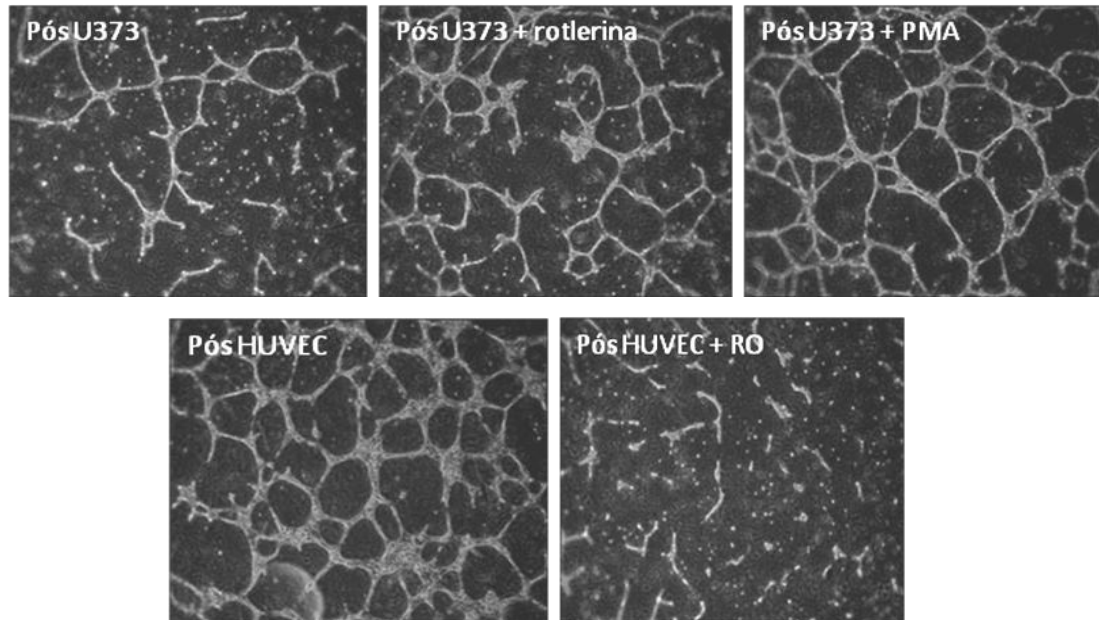
tubulogênese, gerado pelo contato prolongado das células endoteliais com matrizes de astrocitomas e GBM, é reversível pela intervenção nas vias de ativação de PKCs.

Outra característica das células endoteliais que adquiriram deficiência no processo tubulogênico foi a capacidade de se tornarem cerca de 5 vezes mais proliferativas que HUVECs incubadas com matrizes mais permissivas à tubulogênese (autóloga ou de fibroblastos FGH) (Alves et al, 2011). Assim, investigamos também se a MEC de células U373 MG induziria mudanças nas vias de sinalização envolvidas com proliferação e sobrevivência celular, como as vias da ERK1/2 e Akt/PKB. (**Figura 12A e 12B**). Observamos que as HUVECs semeadas sobre MEC de U373 MG, quando comparadas com células semeadas na sua própria MEC apresentaram uma maior fosforilação tanto de ERK1/2 quanto de Akt, em sítios compatíveis com a ativação destas quinases.

Figura 11- Ensaio de tubulogênese de HUVECs plaqueadas sobre MECs de células U373 MG e HUVECs pré-tratadas com inibidores e ativadores das PKCs

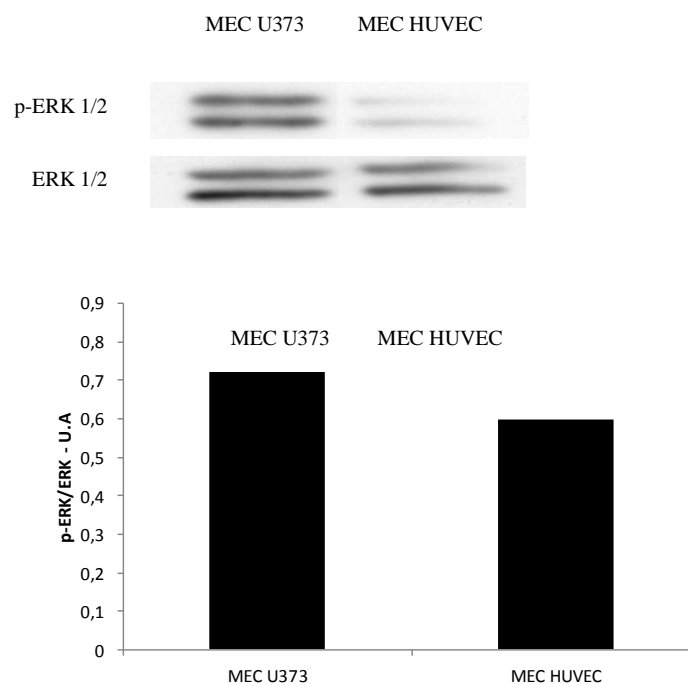


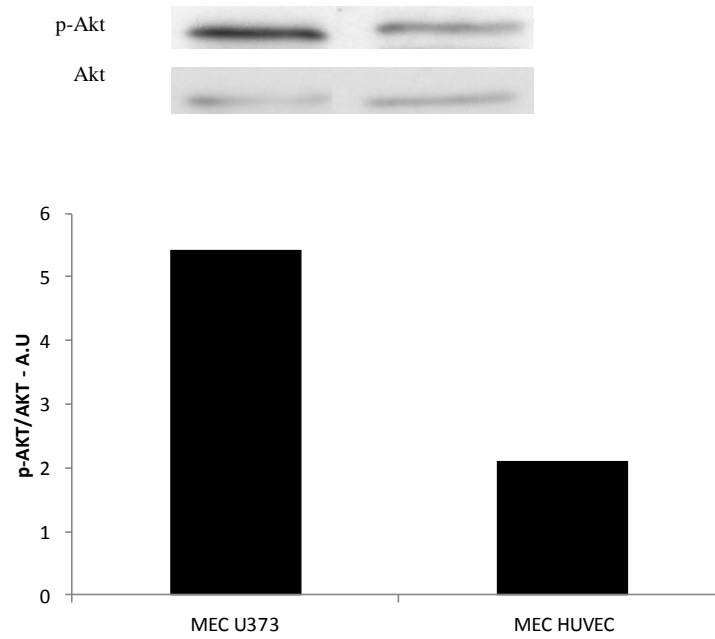
B



Legenda: (A) HUVECs foram plaqueadas sobre as MECs de U373 e HUVEC, após 24 horas foram incubadas com PMA, rotlerina e RO320432 por 30 minutos. Em seguida as células foram tripsinizadas e semeadas ( $5 \times 10^4$  células) sobre  $50\mu\text{l}$  de Matrigel™ (teor reduzido em fatores de crescimento), em M199 5% SFB. (B) Aspecto das estruturas tubulares das HUVECs após o tratamento com inibidores ou ativadores da PKC (\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Figure 12 - Análise da modulação das vias de sinalização ERK 1/2 e Akt por MECs nativas





Legenda:  $6 \times 10^5$  HUVECs foram semeadas em placa de 6 poços contendo MECs nativas de U373 MG e de HUVECs. Após 24 horas de incubação, os extratos celulares foram preparados e analisados por *western blotting*, usando anticorpos contra sítios específicos de fosforilação ativadores (n=3, representação de um experimento típico e reprodutível).



## 4 DISCUSSÃO

A estabilidade dos vasos maduros, em tecidos adultos, depende basicamente de três mecanismos: (i) interação endotelial célula-célula através de uma forte adesão mediada por moléculas de adesão celular; (ii) interação célula endotelial-pericitos e (iii) interação das células endoteliais com os componentes de uma lâmina basal íntegra (Re *et al.*, 1994; Brooks *et al.*, 1994; Frisch *et al.*, 1996). A monocamada endotelial contínua é formada por células ligadas umas às outras por diferentes tipos de estruturas adesivas ou junções intracelulares. Estas junções são estruturas complexas formadas por moléculas transmembranares adesivas ligadas a uma rede de proteínas citoplasmáticas – o citoesqueleto. Com base na caracterização morfológica e funcional é possível distinguir três tipos junções nas células endoteliais: junções oclusivas (*tight junctions*), junções aderentes e junções *gap* ou junções comunicantes (Michiels, 2003). Mudanças no padrão de distribuição dessas estruturas adesivas são essenciais para processos como migração celular e permeabilidade vascular (Michiels, 2003).

Eventos celulares como crescimento, morfogênese, adesão, diferenciação e sobrevivência são o resultado da integração de sinais químicos e biofísicos do ambiente que circunda a célula. Interações entre a célula e a matriz extracelular (MEC) são uma das principais fontes desses sinais ambientais (Eckes *et al.*, 2010). A MEC é um arranjo complexo de glicoproteínas, colágenos, proteoglicanos e fatores de crescimento que atuam não apenas como um substrato físico para a fixação e organização das estruturas celulares, mas também como um mediador de sinalização intracelular através de receptores de superfície celular que reconhecem essas moléculas da MEC. As integrinas constituem os receptores mais abundantes que medeiam às interações das células animais com a MEC. Diversas moléculas (ligantes) se ligam ao domínio extracelular das integrinas. Estas últimas têm suas caudas citoplasmáticas conectadas por proteínas vinculadoras ao citoesqueleto, ligando desta forma, o ambiente externo ao ambiente intracelular permitindo assim a transdução de sinais em ambas as direções (Erler & Weaver, 2009).

As moléculas da MEC, juntamente com o sistema de sinalização célula-célula, representam uma parte importante do desenvolvimento e remodelamento dos vasos no microambiente tumoral (Lu, *et al.*, 2006; Kass, *et al.*, 2007; Arroyo *et al.*, 2010). A matriz é fundamental para a formação de novos vasos sanguíneos em várias etapas do

processo. Primeiramente, ela serve como um suporte tridimensional maleável pelo qual as células endoteliais podem sinalizar através de forças tensionais, orientando o alinhamento das células que se ligam e formam verdadeiros cordões multicelulares (Davis & Camarillo 1995; Vernon & Sage, 1995). Além disso, a MEC pode fornecer importantes sinais envolvidos na modulação da morfogênese das células endoteliais. Por exemplo, células endoteliais semeadas em um ambiente tridimensional de colágeno I, *in vitro*, assumem uma morfologia fusiforme e ficam alinhadas em cordas de forma semelhante aquelas observadas na angiogênese *in vivo* (Dellos *et al.*, 1982; Montesano *et al.*, 1983; Jackson *et al.*, 1994; Richard *et al.*, 1998; Sweeney *et al.*, 1998; Helan & Senger, 2003). Essas cordas amadurecem e originam tubos com lumens através da formação e coalescência de vacúolos intracelulares, em conjunto com a proteólise da MEC (Davis e Camarillo, 1996). Estudos *in vitro* indicam que a proteólise da MEC cria verdadeiros túneis neste ambiente tridimensional, que guiam e facilitam o recrutamento de células murais, formação da membrana basal e estabilização dos vasos (Chun *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2007; Stratman *et al.*, 2009). A desestabilização da interação célula endotelial-matriz parece ser suficiente para iniciar apoptose dependente de caspases e culminar em rápida involução das estruturas vasculares (Re *et al.*, 1994; Meredith *et al.*, 1993). A adesão à matriz extracelular protege células endoteliais da apoptose mediada por Fas/FasL, ao passo que células mantidas em suspensão ficam suscetíveis à apoptose mediada por Fas (Aoudjit & Vuori, 2005).

Fatores de crescimento angiogênicos geralmente têm afinidade por heparan-sulfato e se ligam aos proteoglicanos de heparan-sulfato na superfície das células endoteliais, que atuam como co-receptores no processo de sinalização destes fatores, favorecendo a ligação destes aos seus receptores-tirosina quinase de alta afinidade, disparando uma cascata de sinalização intracelular. (Hynes 2009; Somanath *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010). Podem ainda se ligar à MEC e desempenhar diferentes funções, dependendo da composição desta matriz. Além disso, a ligação de fatores angiogênicos diretamente a componentes da MEC como colágeno e fibrina leva à ativação dos estágios iniciais do processo angiogênico, enquanto a interação com componentes da lâmina basal promove a estabilização vascular (Senger & Davis, 2011).

A maioria das glicoproteínas da MEC promove a adesão celular e reorganização do citoesqueleto, atuando prioritariamente como *elementos estruturais*, ainda que também envolvidas na diferenciação e na sobrevivência celular, como por exemplo, a fibronectina, laminina, colágeno fibroso (tipos I, II e III principalmente nos tecidos conjuntivos) ou formadores de redes (tipo IV, na lâmina basal) e vitronectina. No entanto, existe outra classe de proteínas da MEC, as *proteínas matricelulares*, que funcionam como

reguladores – ou um tipo de “sintonia fina” - das interações célula-matriz mediadas pelos elementos estruturais, atuando principalmente em contextos de remodelagem tecidual. Estas proteínas incluem tenascinas, SPARC (proteína ácida secretada e rica em cisteína) e trombospondinas-1 e 2 (TSPs) e galectinas, todas apresentando alta expressão durante o desenvolvimento normal, em situações de reparo tecidual e no crescimento tumoral (Murphy-Ullrich, 2001).

No contexto dos gliomas, a MEC secretada por células destes tumores difere qualitativa e quantitativamente da MEC do cérebro adulto normal (Ruoslahti, 1999; Castellani *et al.*, 2002; Bellail *et al.*, 2004). Nos tumores cerebrais primários, o ácido hialurônico e diversos outros componentes, têm sua expressão aumentada, tanto no estroma tumoral quanto nas bordas da lesão (Bellail *et al.*, 2004). TN-C, TSP-1 e SPARC se tornam mais expressos na parede vascular e nos tecidos circundantes dos vasos (Higuchi *et al.*, 1993; Zagzag *et al.*, 1995, 1996; Sage, 1997), sugerindo o envolvimento destas proteínas na angiogênese destes tumores. Em gliomas, a MEC pode apresentar diferentes graus de expressão de TN-C, porém sua presença é correlacionada com um péssimo prognóstico para o paciente (Herold-Mende, *et al.*, 2002; Leins *et al.*, 2003; Hirata, *et al.*, 2009). Além disso, sua expressão aumenta com a gradação do tumor e se correlaciona inversamente com a expressão de FN.

O importante papel da FN na morfogênese vascular em tecidos nervosos foi descrito muito recentemente, em um estudo que demonstrou que interações com a FN astrocítica, tanto dependentes quanto independentes de integrinas, são essenciais para a correta formação da rede de capilares na retina, durante o desenvolvimento (Stenzel *et al.*, 2011). As proteínas matricelulares podem antagonizar as atividades pró-adesivas da FN (Frisch *et al.*, 1996; Delaney *et al.*, 2006). Isso ocorre porque substratos formados apenas por proteínas matricelulares só são capazes de assegurar as fases iniciais e intermediárias da adesão celular, enquanto a adesão focal e a formação das fibras de estresse, características da adesão celular forte, são raramente observadas.

A TN-C é uma proteína matricelular-ícone, por ter a capacidade de induzir a célula a um *estado intermediário de adesão*, que facilita a migração, proliferação e a diferenciação celular (Orend, 2005; Midwood, 2011). Esta proteína pode promover a desaderência das células à FN, por levar à desestabilização das adesões focais (Murphy-Ullrich *et al.*, 1991; Chiquet-Ehrismann *et al.*, 1988; Huang *et al.*, 2001; Orend *et al.*, 2003). Estudos recentes envolvendo uma grande amostragem de gliomas revelaram que a forte coloração perivascular de TN-C está associada a malignidade do tumor, diferenciação de células mesenquimais e angiogênese. Desta forma, sugeriu-se que a TN-C pode constituir um confiável marcador e

potencial alvo terapêutico para esses tumores (Herold-Mende *et al.*, 2002 ; Colman *et al.*, 2011).

Conforme ficou evidente na análise do perfil de componentes matriciais secretados pela linhagem de glioma U373 MG, os níveis de TN-C são quase 100 vezes superiores aos níveis de FN, uma proporção qualitativamente inversa à detectada na matriz endotelial, rica em FN e desprovida de TN-C. Os dados obtidos com esta e outras matrizes nativas analisadas - matriz de fibroblastos de vários gliomas de origem diversas, conforme descrito por Alves e colaboradores (2011) indicaram que a predominância da TN-C sobre FN, em níveis pelo menos 15 vezes maiores, resultava em comprometimento da capacidade tubulogênica das células endoteliais. Mesmo sabendo que a matriz da linhagem U373 MG possuía outros componentes moleculares, além de FN e TN-C (Alves *et al.*, 2011) resolvemos tentar validar as observações realizadas com matrizes nativas, utilizando para tanto a estratégia de simular somente as proporções relativas de FN e TN-C encontradas em tais matrizes, em detrimento de outros componentes como TSP-1, colágeno tipo IV, colágeno tipo VI e laminina. Inicialmente, tentamos reproduzir o protocolo de confecção dos substratos mistos FN:TN-C conforme descrito por Huang e colaboradores (2001), no qual as duas proteínas eram incubadas sequencialmente nos suportes de cultura, com a FN sendo a primeira a ser incubada (“coating” por sobreposição). No entanto, nestas condições de preparo dos substratos mistos, a adesão foi equivalente em todas as condições, não importando a proporção FN:TN-C empregada (dados não mostrados). Como tal resultado inesperado nos pareceu um artefato, decidimos, como segundo procedimento, fazer as misturas de FN e TN-C em um tubo, com as duas proteínas em solução, antes de transferir a mistura para as placas de polistireno. Com esta modificação técnica, conseguimos simular as proporções FN:TN-C de todas as matrizes investigadas no presente estudo, alcançando resultados com os substratos mistos, nos experimentos de adesão e tubulogênese, exatamente equivalentes aos obtidos com as matrizes livres de células. Alguns autores mostraram que, durante a morfogênese vascular, FN e TN-C são expressas de forma concomitante, em proporções bastante reguladas que seriam fundamentais para a organização do vaso recém-formado (Van Obberghen-Schilling *et al.*, 2011), sugerindo que a TN-C atue regulando a formação de fibrilas de FN indutoras de adesões focais. Especulamos, portanto, que a estratégia de simular as proporções de FN:TN-C em fase solúvel, antes de permitir a adsorção das misturas nas superfícies plásticas, possa ter favorecido interações, entre as duas moléculas, mais semelhantes às que ocorrem durante o processo de deposição das matrizes imobilizadas.

Ao mimetizarmos a proporção FN:TN-C presente na MEC de células U373 MG, reproduzimos o efeito desta matriz não apenas na adesão celular, mas também na tubulogênese endotelial e sugerimos que o mecanismo na base desse efeito biológico pode ser a interferência da TN-C nas propriedades adesivas de FN. A modulação da adesão celular tornou-se um mecanismo bem conhecido que influencia na *anoikis*, proliferação, migração e diferenciação celular (Murphy-Ullrich, 2001). Mecanismos de interferência da TN-C em função da FN têm sido descritos em diferentes contextos celulares. Em fibroblastos, a TN-C liga-se à FN e inibe a célula adesão de forma RGD-independente (Chiquet-Ehrismann *et al.*, 1988). A ligação do syndecan-4 a um domínio C-terminal (Hep II) da FN, tem um papel crucial na estabilização da adesão focal (Woods & Couchman, 1994), em cooperação com a interação das integrinas com o domínio RGD (principalmente a integrina  $\alpha 5\beta 1$ ). Em células tumorais, incluindo gliomas, a TN-C aumenta a taxa de proliferação celular ao se ligar na FN exatamente no mesmo sítio desta proteína que é reconhecido pelo syndecan-4 (Huang *et al.*, 2001). Portanto, é concebível que o efeito da TN-C na matriz de glioma ou nos suportes mistos definidos utilizados no presente trabalho possa também envolver a modulação da interação entre integrinas e o syndecan-4 com FN.

Embriões *knockout* para FN apresentam defeito na vasculogênese, com clara insuficiência nas etapas de formação lúmen (Astrof & Hynes, 2009). Em órgãos epiteliais, a FN organizada na superfície da célula através de um mecanismo-dependente da integrina  $\alpha 5\beta 1$  mostrou-se essencial para o estabelecimento de um padrão correto das estruturas ramificadas (Sakai *et al.*, 2003). A FN parece estar envolvida na estabilização, maturação e morfogênese dos vasos ao funcionar como uma plataforma de sinalização celular promovendo a apresentação de citocinas angiogênicas às células endoteliais (Vouret-Craviari *et al.*, 2004; Hynes RO 2009).

Na MEC de vasos quiescentes, a TN-C é fracamente expressa ou indetectável. No entanto, é altamente expressa após a injúria do vaso (Obberghen-Schilling *et al.*, 2011) como também na angiogênese de diversas patologias incluindo diabetes, aneurisma da aorta, (Castellón *et al.*, 2002; Jallo *et al.*, 1997; Paik *et al.*, 2004), aterosclerose (Fischer, 2007), colite ulcerativa (Dueck *et al.*, 1999), doença inflamatória intestinal (Geboes *et al.*, 2001), doença de Crohn (Riedl *et al.*, 2001), vasculite (Gindre *et al.*, 1995) e câncer. Recentemente, Berndt e colaboradores relataram a distribuição da TN-C e FN em diferentes carcinomas, utilizando anticorpos específicos para as suas diferentes variantes. A FN foi preferencialmente localizada no lado luminal e a TN-C no lado extra-luminal da membrana basal vascular (Berndt *et al.*, 2010).

No entanto, evidências sugerem que a alta expressão perivascular de TN-C no microambiente tumoral está relacionada com a instabilidade dos vasos (Berndt *et al.*, 2010). Recentemente esta proteína matricelular foi associada a má-formação arteriovenosa cerebral, uma patologia caracterizada por conexões diretas entre artérias, veias de drenagem que são responsáveis pela hemorragia subaracnóide (Bicer *et al.*, 2010). Foi demonstrado também que as repetições FNIII da tenascina-C interferem com fibrilogênese da fibronectina, e o seu domínio globular fibrinogênio-like carboxi-terminal é capaz de potencializar esta interação (Liabeuf *et al.*, 2011). Levando em consideração que os gliomas, em particular os glioblastomas, são tumores que apresentam uma rede vascular bastante desarranjada e subfuncional e que possuem matrizes ricas em TN-C e pobres em FN, parece tentador sugerir que o balanço alterado de FN/TN-C possa influenciar também a formação de estruturas vasculares, levando a um fenótipo disfuncional. Nossos resultados mostraram uma importante contribuição de substratos ricos em TN-C na formação de redes tubulares defeituosas *in vitro* e sugerimos que a presença de grandes quantidades desta molécula no microambiente do tumor possa fornecer pistas adicionais para elucidar o mecanismo de ramificação endotelial. Desta forma, decifrar a ação coordenada dessas duas glicoproteínas é fundamental para compreender como o papel da matriz na vascularização caótica tumoral.

A TN-C tem sido extensivamente implicada tanto no crescimento quanto na angiogênese tumoral. Entretanto, os mecanismos celulares pelos quais esta proteína afetaria a angiogênese são complexos e ainda não estão totalmente compreendidos. Nosso grupo demonstrou (Alves *et al.*, 2011) que a MEC secretada pela linhagem U373 MG era permissiva à adesão e à viabilidade endotelial nas primeiras horas de cultivo. Porém, a partir de 6 horas de contato com a matriz tumoral rica em TN-C, uma sub-população de células endoteliais morria por *anoikis*, enquanto a sub-população que sobrevivia se tornava mais proliferativa. No entanto, naquele trabalho não verificamos se a aquisição do defeito na tubulogênese apresentava uma dinâmica semelhante à observada no processo de *anoikis*. Resolvemos então avaliar o efeito da MEC de glioma na tubulogênese dessas HUVECs em diferentes tempos (3, 8 e 16 horas). Observamos que as HUVECs que ficaram em contato por apenas 3 horas com a MEC de glioma conseguiram fazer estruturas tubulares adequadamente, porém quando cultivadas por tempos maiores (8 e 16 horas), ficavam cada vez mais deficientes na formação de estruturas tubulares. Estes resultados nos indicam que o efeito da sinalização da MEC de glioma sobre as HUVEC aparece a partir de aproximadamente 6 horas de cultivo, sugerindo que o defeito na tubulogênese depende da síntese de novas proteínas pelas células e que sinalização prolongada provocada pela MEC nas HUVECs resulta no

acúmulo de produtos que levam ao aumento da proliferação celular, porém às custas da diminuição da capacidade dessas células de formar estruturas tubulares.

Buscando entender melhor a interferência da TN-C no processo tubulogênico, incubamos as MECs de glioma com anticorpos específicos contra diferentes domínios da TN-C, em seguida semeamos as células endoteliais sobre essas matrizes e analisamos a sua capacidade tubulogênica. Observamos que as HUVECs semeadas sobre MECs de glioma bloqueadas para os domínios: FNIII 1-3, FNIII 4-5 e EGF-like, recuperaram parcialmente a sua capacidade tubulogênica. Este resultado sugere que esses domínios da TN-C estão envolvidos na sinalização que leva à má organização de estruturas tubulares da célula endotelial *in vitro* na matriz de glioma.

A família das proteína-quinases C (PKCs) são proteínas que estão envolvidas no cruzamento de muitas vias de sinalização e por isso participam de diversas respostas celulares como diferenciação, proliferação e apoptose (Steinberg, 2007). Muitos estudos têm demonstrado um papel central dessas proteínas na angiogênese. Kinsella e colaboradores (1992) foram os primeiros a mostrar que o tratamento de células endoteliais humanas com PMA, um potente ativador de PKCs, levava ao aumento de tubulogênese nessas células. A ativação de PKC por ésteres de forbol foi posteriormente relatada como indutor angiogênico por outros grupos (Montesano & Orci, 1985; Morris *et al.*, 1988, Tsopanoglou *et al.*, 1993). Existe ainda um relato demonstrando que a PKC $\alpha$  induz a expressão de VEGF em células endoteliais em estado de diferenciação tubulogênica (Xu *et al.*, 2008).

No entanto, diferentes isoformas desta proteína podem ter funções únicas e até mesmo opostas durante a formação dos vasos. Wuang *et al.*, (2002) demonstraram que a super-expressão de PKC  $\delta$  em células endoteliais de ratos inibiu a diferenciação endotelial em matrigel, enquanto a inibição/ diminuição de expressão de PKC  $\alpha$  em células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) inibiu a formação de vasos *in vitro* e a neovascularização do miocárdio *in vivo*. Além disso, em melanomas, a redução da densidade vascular pelo uso de terapias anti-angiogênicas induzem a hipóxia dessas células tumorais que compensatoriamente aumentam o mimetismo vascular, por um mecanismo dependente de PKC $\alpha$  (Vartanian *et al.*, 2010)

Considerando a participação dessas isoformas na tubulogênese, resolvemos investigar se a sinalização gerada pela MEC de gliomas nas células endoteliais envolveria essas PKCs. Analisando o extrato celular das HUVECs semeadas em MEC autóloga e em MEC de glioma por *western blotting*, observamos que HUVECs incubadas com a MEC de glioma apresentavam um aumento de fosforilação de PKC $\delta$  no sítio catalítico, compatível a ativação

desta isoforma. Observamos ainda um aumento de fosforilação de PKC $\alpha$  em um sítio que não está envolvido na atividade catalítica desta isoforma (T638), mas que controla a sua taxa de inativação por fosfatases: a fosforilação isolada nesta treonina, sem que a treonina 497 no sítio catalítico (T497) também esteja fosforilada, não garante a total ativação desta isoforma, uma vez que apenas a fosforilação em ambos os sítios mantém a enzima na conformação mais resistente à ação de fosfatases celulares (Bornancin & Parker, 1996).

Assim, é possível que o aumento de fosforilação detectado na T638 seja compatível com a desativação da isoforma PKC $\alpha$ . Esta hipótese é reforçada pelo fato do tratamento dessas células com PMA recuperar totalmente a capacidade de formar estruturas tubulares, revertendo o efeito da sinalização da MEC de glioma. Apesar do PMA ser considerado como ativador genérico de todas as PKCs dos Grupos 1 e 2 (isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  e  $\theta$ ), este éster de forbol tem sido preferencialmente relacionado com a potente ativação da PKC $\alpha$ , em células endoteliais em processo de diferenciação angiogênica (Xu *et al.*, 2007). Em nosso modelo, ainda que a PKC $\delta$  possa ter sido também ativada pelo PMA, possibilidade que não podemos excluir com base nos dados aqui apresentados, tivemos evidências de que a ativação da isoforma  $\alpha$  deve direcionar o processo de tubulogênese, uma vez que o tratamento com inibidor seletivo de PKC $\delta$  (rotlerina), também resultou em uma significativa recuperação na capacidade tubulogênica.

Ao tratarmos as HUVECs semeadas sobre a MEC autóloga – permissiva à tubulogênese - com inibidor seletivo de PKC $\alpha$ , RO 320432, observamos uma grande redução na capacidade tubulogênica. Desta forma, podemos sugerir que a sinalização gerada pela MEC do astrocitoma U373 MG leva à deficiência na habilidade de formar estruturas tubulares nas células endoteliais, por um mecanismo que interfere na ativação da PKC $\alpha$ . A fim de confirmar esta hipótese, precisamos ainda validar as presentes observações através da análise da localização sub-celular da isoforma PKC $\alpha$ , que é direcionada à membrana plasmática em células que estão com esta via ativada (Steinberg, 2007), bem como analisar o estado de fosforilação da treonina 497, que está localizada no sítio catalítico e que efetivamente traduz o estado de ativação da PKC $\alpha$ .

Já foi descrito que a TN-C induz o estado de adesão intermediário e, conseqüentemente, aumenta a proliferação celular, ao interferir com o reconhecimento da FN pelo sindecan-4, essencial para o processo de formação e amadurecimento das adesões focais (Huang *et al.*, 2001; ). Esta é uma das possibilidades que investigaremos nas etapas futuras deste trabalho, uma vez que nosso grupo tem estudado o papel do sindecan-4 nas ações de outra glicoproteína



matricelular, a trombospondina-1, durante o processo angiogênico (Ferrari do Outeiro-Bernstein *et al.*, 2002; Nunes *et al.*, 2008). Além disso, já foi descrito, em células endoteliais, que a PKC $\delta$  inibe a ativação da PKC $\alpha$  mediada pelo domínio citoplasmático do sindecán-4, sinalização esta que é essencial ao processo de organização das adesões focais, após o reconhecimento da FN por este co-receptor de adesão (Murakami *et al.*, 2002). A se confirmar que o sindecán-4 está envolvido na aquisição do defeito tubulogênico de células endoteliais observado em matrizes ricas em TN-C, a interferência na atividade biológica deste proteoglicano da superfície celular emerge com um mecanismo geral de indução do estado intermediário de adesão, promovido pelas proteínas matricelulares.

Ao lado das PKCs  $\alpha$  e  $\delta$ , observamos também que a sinalização da MEC de glioma nas células endoteliais levou ao aumento de fosforilação de ERK1/2 e Akt. Este resultado corrobora nossos dados recentemente publicados (Alves *et al.*, 2011) no qual demonstramos que as células endoteliais que sobrevivem a MEC de gliomas se tornam mais proliferativas. Estas vias estão classicamente relacionadas com proliferação e sobrevivência endotelial, induzida por fatores angiogênicos como o VEGF e FGF (Karar & Maity, 2011), através de seus receptores tirosina-quinases (RTKs). Os RTKs, após ativados pelos seus ligantes e sofrerem auto-fosforilação e dimerização, tornam-se assim capazes de interagir e ativar um grande número de moléculas citoplasmáticas envolvidas crucialmente na regulação da proliferação e da sobrevivência celular. O VEGF, por exemplo, pode levar, através de múltiplas possibilidades, à ativação de ERK a partir de seu RTK, o VEGFR-2/Kdr: PLC- $\gamma$   $\rightarrow$  PKC  $\rightarrow$  Raf  $\rightarrow$  MEK  $\rightarrow$  ERK, que também pode se iniciar como Ghb/Shc/Sos  $\rightarrow$  Ras  $\rightarrow$  Raf  $\rightarrow$  MEK  $\rightarrow$  ERK, além de ativar a via PI3K  $\rightarrow$  Akt  $\rightarrow$  mTOR (Cook *et al.*, 2010).

Na verdade, as vias que levam à ativação de ERK e Akt também estão envolvidas com a proliferação e resistência à apoptose das próprias células tumorais, pois vários RTKs que têm como ligantes fatores de crescimento que atuam em células tumorais, dos quais o EGF é um exemplo clássico, agem através deste tipo de receptor, ativando essencialmente as mesmas vias descritas para o VEGF em células endoteliais. Desta maneira, o campo de estudo e desenvolvimentos de novos inibidores de RTKs, os inibidores de tirosina-quinase ou TKIs, ganhou um grande impulso nas últimas duas décadas, tanto com o objetivo de inibir a angiogênese quanto para bloquear os diferentes estágios da progressão tumoral, como migração celular, proliferação e metástase (revisto por Cook *et al.*, 2010; Carmeliet e Jain, 2011; Karar & Maity, 2011).

Dentre os TKIs multi-alvo, capazes de bloquear RTKs de fatores de crescimento tumorais e angiogênicos, podemos destacar o Sorafenib (inibidor de VEGFR-2, PDGFR- $\beta$  e Raf-quinase, principalmente); alguns antagonistas são anticorpos neutralizantes modificados, como o Cetuximab, um inibidor de EGFR. Dentre os inibidores da via de ERK, moléculas têm sido desenvolvidas para bloquear etapas acima de ERK, como inibidores das proteínas Ras, Raf, e MEK, muitos deles já sendo testados em ensaios clínicos (Chappell *et al.*, 2011).

A via que leva à ativação de Akt também tem sido alvo de intensos estudos para desenvolvimento de bloqueadores, em células com fenótipo resistente à apoptose. As fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K) geram o segundo mensageiro fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), que ativa as serina/treonina-quinases PDK1 e Akt (Karar & Maity, 2011). Por sua vez, Akt, além de prevenir a apoptose endotelial ao inativar a via de apoptose mitocondrial, conforme mencionado na **Introdução**, também controla a síntese de proteínas e o crescimento celular ao levar à fosforilação de mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos). Os complexos da proteína mTOR estão envolvidos na indução de HIF1 $\alpha$  e, conseqüentemente, no aumento da expressão de VEGF pelas células no microambiente tumoral (Karar & Maity, 2011). Trabalhos recentes demonstraram que a ativação sustentada da via Akt induziu a formação de estruturas tubulares anormais que se assemelham às aberrações dos vasos tumorais (Bajaj *et al.*, 2010). Algumas moléculas têm sido estudadas e desenvolvidas contra componentes desta via, visando inibir tanto o crescimento tumoral como a angiogênese (Karar & Maity, 2011; Chappel *et al.*, 2011).

Além do papel dos fatores de crescimento, sabe-se que a resposta das células a estes fatores também é fortemente modulada pelas integrinas (Struli & Akhtar, 2009). Exemplos da cooperação entre integrinas e fatores de crescimento, no contexto da angiogênese, podem ser mencionados, como a cooperação entre VEGFR-2 as integrinas  $\alpha v \beta 3$  e os receptores de colágeno  $\alpha 1 \beta 1$  e  $\alpha 2 \beta 1$ : células endoteliais aderidas através da  $\alpha v \beta 3$  se mostram mais responsivas aos efeitos angiogênicos do VEGF (Soldi *et al.*, 1999), que envolve uma interação direta do VEGFR-2 e a cadeia  $\beta 3$  (Mahabeleshwar *et al.*, 2006 -); por outro lado, a ativação de células endoteliais pelo VEGF é aumentada pela adesão das integrinas  $\alpha 1 \beta 1$  e  $\alpha 2 \beta 1$  (Senger *et al.*, 2002). Assim, a resposta angiogênica, tanto nos tecidos normais em processo de reparo, quando na transformação neoplásica, parece depender de uma complexa integração entre sinais solúveis e ligados à MEC.

No nosso modelo de interação do endotélio com matrizes de gliomas, ainda não investigamos o papel das diversas integrinas que reconhecem as duas principais proteínas

implicadas nos efeitos observados sobre a tubulogênese endotelial. Nossos dados atuais sugerem que os efeitos sejam talvez mais devidos à falta do engajamento correto da integrina  $\alpha 5 \beta 1$  (receptor preferencial da FN) do que da ativação de outras integrinas, talvez devido a uma interferência na ativação do sindecan-4, conforme sugerimos anteriormente. No entanto, a participação de integrinas que interagem com a TN-C precisa ser abordada nas etapas futuras deste trabalho.

A **normalização** de vasos tem sido descrita como uma proposta alternativa à terapia anti-angiogênica ao melhorar a estrutura e função dos vasos sanguíneos, diminuindo a hipóxia e permitindo maior acesso às drogas terapêuticas (Goel *et al.*, 2011). Esta proposta vinha apresentando uma recepção controversa por parte da comunidade científica envolvida na pesquisa da angiogênese, por parecer se opor à visão clássica de que bastaria privar os tumores sólidos de suas fontes de oxigênio e nutrientes para causar a ablação total da vascularização tumoral, tal como preconizado pelo pioneiro das pesquisas em angiogênese, Judah Folkman, nos anos 70 (revisto por Cao *et al.*, 2011). No entanto, a experiência clínica das terapias anti-angiogênicas tem produzido, no melhor dos quadros, apenas modestas melhoras na sobrevivência de pacientes de diversos tipos de câncer, dentre eles os acometidos por glioblastomas (Norden *et al.*, 2009). No pior dos cenários, a inibição terapêutica da angiogênese levou à identificação de um fenômeno indesejável, que é o da seleção de clones resistentes à própria terapia e ao recrudescimento de tumores, porém apresentando células mais migratórias e invasivas (Rahman *et al.*, 2010; de Groot *et al.*, 2010; Bergers & Hanahan, 2008; Pàez-Ribes *et al.*, 2010). Assim, sugerimos que melhora na capacidade tubulogênica das HUVECs, obtida com o bloqueio desses domínios da TN-C matricial de gliomas, poderia ser considerada como uma nova possibilidade estratégica de **normalização** da vasculatura tumoral, com a vantagem da TN-C se constituir também como alvo anti-tumoral direto, uma vez que esta glicoproteína é também um forte estimulador da proliferação e migração de células tumorais (Orend, 2005).

## CONCLUSÕES

- a) Células endoteliais semeadas sobre suportes de FN:TN-C obtidos a partir das proteínas purificadas e com composições miméticas da de matrizes celulares nativas (livres de células) reproduzem os mesmos efeitos destas últimas, demonstrando que o balanço entre FN e TN-C, em detrimento de outros componentes matriciais, desempenha um papel fundamental na tubulogênese endotelial;
- b) O bloqueio de domínios da TN-C da MEC de U373 MG (FNIII 1-3, FNIII 4-5 e N-terminal), recuperou parcialmente a capacidade das células endoteliais de formar tubos;
- c) A matriz da linhagem U373 MG dispara uma cascata de sinalização intracelular que aumenta a fosforilação em Thr 638 (um possível sítio inibitório) da PKC $\alpha$  e induz a ativação de PKC  $\delta$ ;
- d) O efeito antagônico dessas isoformas de PKCs na tubulogênese foi confirmado pelo PMA (possivelmente pela ativação sustentada da isoforma PKC $\alpha$ ) e pelo inibidor de PKC $\delta$  (rotlerina), ambos capazes de recuperar a capacidade da células endoteliais de formarem tubos. O tratamento de HUVECs semeadas sobre sua própria matriz com um inibidor de PKC $\alpha$  (RO320432), diminuiu significativamente a tubulogênese endotelial;
- e) A MEC da linhagem U373 MG também levou à ativação das vias ERK e Akt, provavelmente responsáveis pela sustentação do comportamento proliferativo e pela viabilidade celular observados em células endoteliais incubadas com estas matrizes.

### **Este trabalho tem como próximas etapas:**

- a) Estudar a expressão diferencial e a regulação de receptores de adesão de células endoteliais susceptíveis e resistentes à apoptose induzida por matrizes de glioma ricas em TN-C, com ênfase em no papel de integrinas e do proteoglicano sindecan-4;
- b) Investigar a regulação do ciclo celular e da apoptose em células endoteliais expostas à matrizes de gliomas, com ênfase na expressão/regulação de ciclinas, CDKs, CKIs, caspases, bem como a possibilidade de aquisição de um fenótipo senescente, já descrito por outros grupos para os capilares de gliomas;

- c) Aprofundar o estudo sobre o papel de isoformas de PKCs, ERK e Akt, nos efeitos da matriz extracelular de gliomas na capacidade tubulogênica de células endoteliais, com ênfase nos tempos iniciais de contato com matrizes ricas em TN-C (substratos definidos e matrizes tumorais);
- d) Estudar o papel da via de sinalização Dll4/Notch, envolvida na regulação do brotamento/ramificação vascular (*sprouting*).

## REFERÊNCIAS

- Abbott, NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood brain barrier permeability. *J Anat.* 2002; 200:629-638.
- Akiyama SK, Yamada SS, Chen WT, Yamada KM. (Analysis of fibronectin receptor function with monoclonal antibodies: Roles in cell adhesion, migration, matrix assembly, and cytoskeletal organization. *J Cell Biol.* 1989;109:863–875.
- Alves, T. R., da Fonseca, A. C. C., Nunes, S. S., da Silva, A. O., Dubois, L. G. F., Faria, J., Kahn, S. A., et al. Tenascin-C in the extracellular matrix promotes the selection of highly proliferative and tubulogenesis-defective endothelial cells. *Experimental cell research.* 2011;317(15): 2073-85.
- Arroyo AG, Iruela-Arispe ML. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovasc Res.* 2010;86(2):226-35.
- Assoian RK. Anchorage-dependent cell cycle progression. *J Cell Biol.*1997;136: 14.
- Astrof, S. and Hynes, R.O. Fibronectins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis.* 2009;12: 165-175.
- Bachelder, R. E., Crago, A., Chung, J., Wendt, M. A., Shaw, L. M., Robinson, G., & Mercurio, A. M. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer research.* 2001;61(15): 5736-40.
- Bajaj A, Zheng Q, Adam A, Vincent P, Pumiglia K. Activation of endothelial ras signaling by passes senescence and causes abnormal vascular morphogenesis. *Cancer Res.* 2010;70(9):3803-12.
- Bart, J; Groen, HJM; Hendrikse, NH; de Graaf, WTA; Vaalburg, W; de Vries, EGE. The bloo-brain barrier and oncology: new insights into function and modulation. *Cancer Treatment Reviews.* 2000;26:449-462.
- Bayless KJ, Salazar R, Davis GE. RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the a(v)b(3) and a(5)b(1) integrins. *Am J Pathol.* 2000;156: 1673–1683.
- Behrem, S; Zarkovic, K; Eskinja, N; Jonic, N. Distribution pattern of tenascin-C in glioblastoma:correlation with angiogenesis and tumor cell proliferation. *Pathol Oncol Research.* 2005;11: 229-235.
- Bellail, AC; Hunter, SB; Brat, DJ; Tan, C; Van Meir, EG. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2004;36:1046-1069.
- Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro*

Oncol. 2005; 7:452–464.

Bergers, G., & Benjamin, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews. Cancer.* 2003;3(6): 401-10.

Berndt A, Köllner R, Richter P, Franz M, Voigt A, Berndt A, Borsi L, Giavazzi R, Neri D, Kosmehl H. A comparative analysis of oncofetal fibronectin and tenascin-C incorporation in tumour vessels using human recombinant SIP format antibodies. *Histochem Cell Biol.* 2010;133(4):467-75.

Bicer A, Guclu B, Ozkan A, Kurtkaya O, Koc DY, Necmettin Pamir M, Kilic T. Expressions of angiogenesis associated matrix metalloproteinases and extracellular matrix proteins in cerebral vascular malformations. *J Clin Neurosci.* 2010;17(2):232-6.

Bornancin F, Parker PJ. Phosphorylation of protein kinase C-alpha on serine 657 controls the accumulation of active enzyme and contributes to its phosphatase-resistant state. *J Biol Chem.* 1997;272(6):3544-9.

Bornstein, P., & Sage, E. H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Current opinion in cell biology.* 2002;14(5), 608-16.

Brahimi-Horn C, Berra E, Pouyssegur J. Hypoxia: the tumor's gateway to progression along the angiogenic pathway. *Trends Cell Biol.* 2001;11:S32–S36.

Brellier, F., Hostettler, K., Hotz, H.-R., Ozcakir, C., Çöloğlu, S. A., Togbe, D., Ryffel, B., et al. Tenascin-C triggers fibrin accumulation by downregulation of tissue plasminogen activator. *FEBS letters.* 2011;585(6), 913-20.

Bremnes RM, Veve R, Hirsch FR et al. The E-cadherin cell–cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. *Lung Cancer.* 2002; 36:115–124.

Brooks, P. C., Montgomery, A. M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R. A., Hu, T., Klier, G., & Chersesh, D. A. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell.* 1994;79(7):1157-64.

Burns, D. J., & Bell, R. M. Protein kinase C contains two phorbol ester binding domains. *The Journal of biological chemistry.* 1991; 266(27):18330-8.

Cao Y, Arbiser J, D'Amato RJ, D'Amore PA, Ingber DE, Kerbel R, Klagsbrun M, Lim S, Moses MA, Zetter B, Dvorak H, Langer R. Forty-year journey of angiogenesis translational research. *Sci Transl Med.* 2011;3(114):114

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000; 407:249–257

Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011;473(7347):298-307.

Castellani, P; Borsi, L; Camemolla, B; Biro, A; Dorcaratto, A; Viale, GL; Neri, D; Zardi, L Differentiation between high- and low-grade astrocytoma using a human recombinant antibody to the extra domain-B of fibronectina. *American J Pathol.* 2002;161: 1695-1700.

Castellon R, Caballero S, Hamdi HK, Atilano SR, Aoki AM, Tarnuzzer RW, Kenney MC, Grant MB, Ljubimov AV. Effects of tenascin-C on normal and diabetic retinal endothelial cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(8):2758-66

Chappell JC, Wiley DM, Bautch VL. Regulation of blood vessel sprouting. *Semin Cell Dev Biol.* 2011;22(9):1005-11.

Chen TT, Luque A, Lee S, Anderson SM, Segura T, Iruela-Arispe ML. Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells. *J Cell Biol.* 2010;188: 595–609.

Chiquet-Ehrismann R, Kalla P, Pearson CA, Beck K, Chiquet M. Tenascin interferes with fibronectin action. *Cell.* 1988;53(3):383-90.

Colman, H., Zhang, L., Sulman, E. P., McDonald, J. M., Shooshtari, N. L., Ivera, A., Popoff, S., et al. A multigene predictor of outcome in glioblastoma. *Neuro-oncology.* 2010;12(1): 49-57.

Cook KM, Figg WD. Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. *CA Cancer J Clin.* 2010;60(4):222-43

Datta, S. R., Brunet, A., & Greenberg, M. E. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & development.* 1999;13(22): 2905-27.

Davis GE, Camarillo CW. Regulation of endothelial cell morphogenesis by integrins, mechanical forces, and matrix guidance pathways. *Exp Cell Res.* 1995;216: 113–123.

Davis GE, Koh W, Stratman AN. Mechanisms controlling human endothelial lumen formation and tube assembly in three-dimensional extracellular matrices. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2007;81: 270–285.

Del Maestro RF, Megyesi JF, Farrell CL. Mechanisms of tumor-associated edema: a review. *Can J Neurol Sci.* 1990;17:177–183.

Delaney CE, Weagant BT, Addison CL. The inhibitory effects of endostatin on endothelial cells are modulated by extracellular matrix. *Exp Cell Res.* 2006;312(13):2476-89

Delvos U, Gajdusek C, Sage H, Harker LA, Schwartz SM. Interactions of vascular wall cells with collagen gels. *Lab Invest.* 1992; 46: 61–72.

Dueck M, Riedl S, Hinz U, Tandara A, Möller P, Herfarth C, Faissner A. Detection of tenascin-C isoforms in colorectal mucosa, ulcerative colitis, carcinomas and liver metastases. *Int J Cancer.* 1990;82(4):477-83.

Dvorak, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine.* 1986;315(26), 1650-9.

Eckes B, Nischt R, Krieg T. Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2010;11:3-4.



Emoto, Y., Y. Manome, et al. Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *Embo J.* 1995;24:6148-56.

Eng, LF; Ghirnikan, RS; lee, YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP - thirty-one years (1969-2000) *Neurochem Res.* 2000;25: 1439-51.

Erler JT, Weaver VM. Three-dimensional context regulation of metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2009;26(1):35-49.

Esser S, Lampugnani MG, Corada M et al. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci.* 1998;111(13):1853–1865.

F. Re, A. Zanetti, N. Polentarutti, L. Lanfrancone, E. Dejana, F. Colotta. Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells, *J. Cell Biol.* 1994;127 537–546.

Fang F, Orend G, Watanabe N, Hunter T, Ruoslahti E. Dependence of cyclin E-CDK2 kinase activity on cell anchorage. *Science* 1996;271: 499–502.

Farin PW, Crosier AE, Farin CE. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology.* 2001;55:151–170

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Ver.* 2004;25:581–611.

Ferrari do Outeiro-Bernstein MA, Nunes SS, Andrade AC, Alves TR, 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.* 2002;21(4):311-24.

Ffrench-Constant, C. and Hynes, R.O. Alternative splicing of fibronectin is temporally and spatially regulated in the chicken embryo. *Development.* 1989;106: 375-388.

Figarella-Branger, D; Bouvier, C. Classification anatomopathologique des gliomes: faits et controversies. *Bulletin du cancer.* 2005;92:301-309.

Fina, L., Molgaard, H. V., Robertson, D., Bradley, N. J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D. R., et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood.* 1990;75(12), 2417-26.

Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, Chorianopoulos E, Liesenborghs L, Koch M, De Mol M, Autiero M, Wyns S, Plaisance S, Moons L, van Rooijen N, Giacca M, Stassen JM, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P. Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell.* 2007;131(3):463-75.

Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995;1: 27-31.

- Forsyth PA, Wong H, Laing TD et al .Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Br JCancer*. 1999;79:1828–1835
- Frisch, S. M., & Francis, H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *The Journal of cell biology*. 1994;124(4): 619-26.
- Gaengel, K., Genové, G., Armulik, A., & Betsholtz, C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(5), 630-8.
- Geboes K, El-Zine MY, Dalle I, El-Haddad S, Rutgeerts P, Van Eyken P. Tenascin and strictures in inflammatory bowel disease: an immunohistochemical study. *Int J Surg Pathol*. 2001;9(4):281-6.
- Giancotti F. G. and Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science*. 1999; 285: 1028–1032.
- Gindre D, Peyrol S, Raccurt M, Sommer P, Loire R, Grimaud JA, Cordier JF. Fibrosing vasculitis in Wegener's granulomatosis: ultrastructural and immunohistochemical analysis of the vascular lesions. *Virchows Arch*. 1995;427(4):385-93.
- Goel S, Duda DG, Xu L, Munn LL, Boucher Y, Fukumura D, Jain RK. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev*. 2011;91(3):1071-121.
- Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:475–502.
- Guttery, D.S., Shaw, J.A., Lloyd, K., Pringle, J.H. and Walker, R.A. Expression of tenascin-C and its isoforms in the breast. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29: 595-606.
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*.1996;86:353–364.
- Hancox, R. A., Allen, M. D., Holliday, D. L., Edwards, D. R., Pennington, C. J., Guttery, D. S., Shaw, J. A., et al. Tumour-associated tenascin-C isoforms promote breast cancer cell invasion and growth by matrix metalloproteinase. *Breast Cancer Res*. 2009;11(2):24
- Helan MC, Senger DR. Collagen I initiates endothelial cell morphogenesis by inducing actin polymerization through suppression of cyclic AMP and protein kinase A. *J Biol Chem*. 2003;278: 327–334.
- Held-Feindt, J., Lütjohann, B., Ungefroren, H., Mehdorn, H. M., & Mentlein, R. Interaction of transforming growth factor-beta (TGF-beta) and epidermal growth factor (EGF) in human glioma cells. *Journal of neuro-oncology*. 2003;63(2): 117-27.
- Higuchi M, Ohnishi T, Arita N, Hiraga S, Hayakawa T. Expression of tenascin in human gliomas: its relation to histological malignancy, tumor dedifferentiation and angiogenesis. *Acta Neuropathol*. 1993;85:481-7.
- Hirata E, Arakawa Y, Shirahata M, Yamaguchi M, Kishi Y, Okada T, Takahashi JA,

- Hochberg FH, Pruitt A. Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. *Neurology*. 1990;30:907-11.
- Holash J, Maisonpierre PC, Compton D et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*. 1999; 284:1994–1998
- Hsia, HC; Schwarzbauer, JE. Meet the tenascins: multifunctional and mysterious. *J Biol Chem*. 2005;280: 26641-26644.
- Huang W, Chiquet-Ehrismann R, Moyano JV, Garcia-Pardo A, Orend G. Interference of tenascin-C with syndecan-4 binding to fibronectin blocks cell adhesion and stimulates tumor cell proliferation. *Cancer Res*. 2010;61(23):8586-94.
- Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. 2009;326(5957):1216-9.
- Hynes, R. O. Alteration of cell-surface proteins by viral transformation and by proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1973;70(11), 3170-4.
- Hynes, R. O. In vitro splicing of fibronectin pre-mRNAs. *Nucleic Acids Res*. 1990;18 (14):4089-4097.
- Jackson CJ, Knop A, Giles I, Jenkins K, Schrieber L. VLA-2 mediates the interaction of collagen with endothelium during in vitro vascular tube formation. *Cell Biol Int*. 1994;18: 859–867.
- Jackson, D. N. e D. A. Foster. The enigmatic protein kinase Cdelta: complex roles in cell proliferation and survival. *Faseb J*. 2004;18 (6): 627-36.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. Identification by Morphologic and Immunologic Criteria. *J. Clin. Invest*. 1973;52: 2745-2756.
- Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 2003;9:685–693.
- Jain RK, di Tomaso E, Duda DG et al (2007) Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci* 8:610–622
- Jallo GI, Friedlander DR, Kelly PJ, Wisoff JH, Grumet M, Zagzag D. Tenascin-C expression in the cyst wall and fluid of human brain tumors correlates with angiogenesis. *Neurosurgery*. 1997;41(5):1052-9.
- Jiang, X. & Couchman, J.R. Perlecan and tumor angiogenesis. *J. Histochem. Cytochem*. 2003;51 (11):1393-1410
- Jones PL, Jones FS. Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. *Matrix Biol*. 2000;19:581-96.

Kaplony, A., Zimmermann, D. R., Fischer, R. W., Imhof, B. A., Odermatt, B. F., Winterhalter, K. H., & Vaughan, L. Tenascin Mr 220,000 isoform expression correlates with corneal cell migration. *Development* 1991;112(2): 605-14.

Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci.* 2011;4:51.

Kass L, Erler JT, Dembo M, Weaver VM. Mammary epithelial cell: influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(11):1987-94

Kawata H, Yoshida K, Kawamoto A, Kurioka H, Takase E, Sasaki Y et al. Ischemic preconditioning upregulates vascular endothelial growth factor mRNA expression and neovascularization via nuclear translocation of protein kinase C epsilon in the rat ischemic myocardium. *Circ Res.* 2001; 88:696–704.

Keranen, L. M., E. M. Dutil, et al. Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol.* 1995;5(12): 1394-1403.

Kevil CG, Payne DK, Mire E et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *J Biol Chem.* 1998; 273:15099–15103

Khaner, H., Lopez, J., & Smith, B. L. Intracellular receptors for activated protein kinase C. Identification of a binding site for the enzyme. *The Journal of biological chemistry.*1991; 266(23), 14866-8.

Kim CH, Bak KH, Kim YS, Kim JM, Ko Y, Oh SJ, Kim KM, Hong EK. Expression of tenascin-C in astrocytic tumors: its relevance to proliferation and angiogenesis. *Surg Neurol.*2000;54:235-40.

Kinsella JL, Grant DS, Weeks BS, Kleinman HK. Protein kinase C regulates endothelial cell tube formation on basement membrane matrix, Matrigel. *Exp Cell Res.*1992; 1:56-62.

Kleihues P, Soylemezoglu F, Schauble B, Scheithauer BW, Burger PC. Histopathology, classification and grading of gliomas. *Glia.* 1995;15: 211-221.

Kleihues, P., & Sobin, L. H. World Health Organization classification of tumors. *Cancer.* 2000;88(12), 2887.

Kleihues, P., Louis, D. N., Scheithauer, B. W., Rorke, L. B., Reifenberger, G., Burger, P. C., & Cavenee, W. K. The WHO classification of tumors of the nervous system. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2002;61(3): 215-25

Klug, M. G., M. H. Soonpaa, et al. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest.* 1996;98 (1): 216-24.

Kraft, A. S., W. B. Anderson, et al. Decrease in cytosolic calcium/phospholipiddependent protein kinase activity following phorbol ester treatment of EL4 thymoma cells. *J Biol Chem.*1982; 257 (22)13193-6

Kyriakides, T. R., & Bornstein, P. Matricellular proteins as modulators of wound healing and the foreign body response. *Thrombosis and haemostasis*. 2003;90(6), 986-92.

Lakka SS, Gondi CS, Rao JS. Proteases and glioma angiogenesis. *Brain Pathol*. 2005; 5:327–341

Lampugnani, M. G., Resnati, M., Raiteri, M., Pigott, R., Pisacane, A., Houen, G., Ruco, L. P., et al. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *The Journal of cell biology*. 1992;118(6): 1511-22.

Laterra J, Guerin C, Goldstein GW. Astrocytes induce neural microvascular endothelial cells to form capillary-like structures in vitro. *J Cell Physiol*. 1990;144(2):204-15

Leins A, Riva P, Lindstedt R, Davidoff MS, Mehraein P, Weis S. Expression of tenascin-C in various human brain tumors and its relevance for survival in patients with astrocytoma. *Cancer*. 2003; 98: 2430–2439.

Lewis, T. S., Shapiro, P.S., Ahn, N. G. Signal transduction through MAP kinase cascade. *Adv. Cancer Res*. 1998;74:49-139.

Liabeuf S, Barreto DV, Kretschmer A, Barreto FC, Renard C, Andrejak M, Choukroun G, Massy Z. High circulating levels of large splice variants of tenascin-C is associated with mortality and cardiovascular disease in chronic kidney disease patients. *Atherosclerosis*. 2011;215(1):116-24.

Lindahl P, Johansson BR, Leveen P et al. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*. 1997; 277:242–245.

Louis, D N, Holland, E. C., & Cairncross, J. G. Glioma classification: a molecular reappraisal. *The American journal of pathology*. 2001;159(3), 779-86.

Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*. 2007;114(2), 97-109.

Louis, David N. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annual review of pathology*. 2006;1, 97-117.

Lu YG, Ding LC, Zhou HY, Deng SS, Wang QM, Xiong RH, Yang HJ. The expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in transplanted tumor of salivary adenoid cystic carcinoma cell lines. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*. 2006;15(5):526-30.

Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD et al. Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 1995;270:9709–9716.

Matsuda M, Hashimoto N. Endogenous tenascin-C enhances glioblastoma invasion with reactive change of surrounding brain tissue. *Cancer Sci*. 2009;100: 1451–1459.

- Matsuura, K., H. Wada, et al. Cardiomyocytes fuse with surrounding noncardiomyocytes and reenter the cell cycle. *J Cell Biol.* 2004;167 (2): 351-63.
- McCarthy, J. B., Hagen, S. T., & Furcht, L. T. Human fibronectin contains distinct adhesion- and motility-promoting domains for metastatic melanoma cells. *The Journal of cell biology.*1986; 102(1): 179-88.
- Mercier, Frederic. Astroglia as a modulation interface between meninges and neurons” *Glia-Neuronal Signaling.* Ed Glenn I. Hatton and Valdimir Parpura 2004;125-163
- Meredith JE, Schwartz MA. Integrins, adhesion and apoptosis. *Trends Cell Biol.* 1997;7: 146–150.
- Michiels, C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol.* 2003; 196: 430-443.
- Midwood, K. S., Hussenet, T., Langlois, B., & Orend, G Advances in tenascin-C biology. *Cellular and molecular life sciences.* 2011; 68(19): 3175-99.
- Munn, LL. Aberrant vascular architecture in tumor and its importance in drug-based therapies. *Drugs Discovery Today.* 2003;8: 396-403.
- Mochly-Rosen, D. e A. S. Gordon. Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *Faseb J.* 1998; 12 (1): 35-42.
- Montesano R, Orci L, Vassalli P. In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *J Cell Biol.* 1983; 97: 1648– 1652.
- Montesano R, Orci L. Tumor-promoting phorbol esters induce angiogenesis in vitro. *Cell.* 1985;42 (2):469-77.
- Morris PB, Hida T, Blackshear PJ, Klintworth GK, Swain JL. Tumor-promoting phorbol esters induce angiogenesis in vivo. *Am J Physiol.* 1988; 254 (2.1):318-22.
- Munn, LL. Aberrant vascular architecture in tumor and its importance in drug-based therapies” *Drugs Discovery Today* 2003;8: 396-403.
- Murphy-Ullrich JE, Lightner VA, Aukhil I, Yan YZ, Erickson HP, Höök M. Focal adhesion integrity is downregulated by the alternatively spliced domain of human tenascin. *J Cell Biol.* 1991;115(4):1127-36.
- Murphy-Ullrich, J. The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *The J Clin Investigation.* 2001;107: 785-790.
- Nishizuka, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science.* 1992; 258(5082), 607-14.
- Nishizuka, Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *The FASEB journal* 1995; 9(7): 484-96.

- Nishizuka, Y. (1988) The heterogeneity and differential expression of multiple species of the protein kinase C family. *Biofactors*. 1988;1(1): 17-20.
- Norden AD, Drappatz J, Muzikansky A, David K, Gerard M, McNamara MB, Phan P, Ross A, Kesari S, Wen PY. An exploratory survival analysis of anti-angiogenic therapy for recurrent malignant glioma. *J Neurooncol*. 2009;92(2):149-55.
- Nunes SS, Outeiro-Bernstein MA, Juliano L, Vardiero F, Nader HB, Woods A, Legrand C, Morandi V. Syndecan-4 contributes to endothelial tubulogenesis through interactions with two motifs inside the pro-angiogenic N-terminal domain of thrombospondin-1. *J Cell Physiol*. 2008;214(3):828-37.
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2005;64(6):479-89
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer science*. 2009;100(12): 2235-41.
- Ono, Y., Fujii, T., Igarashi, K., Kuno, T., Tanaka, C., Kikkawa, U., & Nishizuka, Y. Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(13): 4868-71.
- Orend G, Huang W, Olayioye MA, Hynes NE, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin-C blocks cell-cycle progression of anchorage-dependent fibroblasts on fibronectin through inhibition of syndecan-4. *Oncogene*. 2003;22(25):3917-26.
- Orend, G. Potential oncogenic action of tenascin-C in tumorigenesis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2005;37: 1066-1083
- Paik DC, Fu C, Bhattacharya J, Tilson MD. Ongoing angiogenesis in blood vessels of the abdominal aortic aneurysm. *Exp Mol Med*. 2004;36(6):524-33.
- Pallud, J; Devaux, B; Daumas-Duport, C; Oppenheim, C; Roux, FX. Glioma dissemination along the corticospinal tract. *Journal of neuro-oncology* 2005;73: 239-240.
- Pan, T., & Coleman, J. E. GAL4 transcription factor is not a “zinc finger” but forms a Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> binuclear cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(6): 2077-81.
- Pankov, R. and Yamada, K.M. (2002). Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*. 2002; 115: 3861-3863.
- Peters, J.H., Chen, G.E. and Hynes, R.O. Fibronectin isoform distribution in the mouse. II. Differential distribution of the alternatively spliced EIIIB, EIIA, and V segments in the adult mouse. *Cell Adhes Commun*. 1996;4: 127-148.

Pierschbacher, M. D., & Ruoslahti, E. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*. 1984; 81(19): 5985-8.

Plate, KH; Risau, W. Angiogenesis in malignant gliomas. *Glia*. 1995;15: 339-347.

Reddig, P. J., & Juliano, R. L. Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer metastasis reviews*. 2005;24(3): 425-39.

Richard L, Velasco P, Detmar M. A simple immunomagnetic protocol for the selective isolation and longterm culture of human dermal microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res*. 1998; 240: 1–6.

Riedl S, Tandara A, Reinshagen M, Hinz U, Faissner A, Bodenmüller H, Buhr HJ, Herfarth C, Möller P. Serum tenascin-C is an indicator of inflammatory bowel disease activity. *Int J Colorectal Dis*. 2001;16(5):285-91.

Risau, W. Differentiation of endothelium. *FASEB J*. 1995;9(10):926-33.

Ron, D. e M. G. Kazanietz. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *Faseb J*. 1999;13(13):1658-76.

Rong Y, Durden DL, Van Meir EG et al. Pseudopalisading necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65:529–539.

S.M. Frisch, K. Vuori, E. Ruoslahti, P.Y. Chan-Hui. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase, *J. Cell Biol*. 1996;134 793–799

Sakai T, Larsen M, Yamada KM. Fibronectin requirement in branching morphogenesis. *Nature*. 2003;423(6942):876-81.

Saksela, O. Moscateli, V.; Sommer, A. & Rifkin, D. B. Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J. Cell Biol*. 1988;107 (2):743-751.

Schenk, P. W., & Snaar-Jagalska, B. E. Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochimica et biophysica acta*. 1999;1449(1), 1-24.

Schwarztbauer, J. E. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J. Cell Sci*. 2003;116 (16):3269-3276.

Sehler, J. L., Corbett, S. A., Wenk, M. B., & Schwarzbauer, J. E. Modulation of cell-extracellular matrix interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998;857, 143-54.

Senger DR, Claffey KP, Benes JE, Perruzzi CA, Sergiou AP, Detmar M. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: Regulation through  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$  integrins. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94: 13612–13617.



Senger, D. R., & Davis, G. E. Angiogenesis. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2011;3(8) 005090.

Shih SC, Mullen A, Abrams K, Mukhopadhyay D, Claffey KP. Role of protein kinase C isoforms in phorbol ester-induced vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells. *J Biol Chem.* 1999;274: 15407–15414.

Shirai, Y., & Saito, N. Activation mechanisms of protein kinase C: maturation, catalytic activation, and targeting. *Journal of biochemistry.* 2002;132(5): 663-8.

Soderling, T. R. Protein kinases. Regulation by autoinhibitory domains. *The Journal of biological chemistry.* 1990;265(4): 1823-6.

Soldi R, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G, Bussolino F. Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO J.* 1999;18(4):882-92.

Somanath PR, Ciocea A, Byzova TV. Integrin and growth factor receptor alliance in angiogenesis. *Cell Biochem Biophys.* 2009;53: 53–64.

Song, J. J., & Lee, Y. J. (2005). Dissociation of Akt1 from its negative regulator JIP1 is mediated through the ASK1-MEK-JNK signal transduction pathway during metabolic oxidative stress: a negative feedback loop. *The Journal of cell biology.* 2005;170(1), 61-72.

Sonnenburg, E. D., T. Gao, et al. The phosphoinositide-dependent kinase, PDK-1, phosphorylates conventional protein kinase C isozymes by a mechanism that is independent of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 2001;276(48):45289-97.

Steinberg R, Harari OA, Lidington EA, Boyle JJ, Nohadani M, Samarel AM, Ohba M, Haskard DO, Mason JC. A protein kinase Cepsilon-anti-apoptotic kinase signaling complex protects human vascular endothelial cells against apoptosis through induction of Bcl-2. *J Biol Chem.* 2007;282(44):32288-97

Stenzel D, Lundkvist A, Sauvaget D, Busse M, Graupera M, van der Flier A, Wijelath ES, Murray J, Sobel M, Costell M, Takahashi S, Fässler R, Yamaguchi Y, Gutmann DH, Hynes RO, Gerhardt H. Integrin-dependent and -independent functions of astrocytic fibronectin in retinal angiogenesis. *Development.* 2011;138(20):4451-63.

Stratman AN, Malotte KM, Mahan RD, Davis MJ, Davis GE. Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood* 2009;114: 5091–5101.

Streuli CH, Akhtar N. Signal co-operation between integrins and other receptor systems. *Biochem J.* 2009;418(3):491-506.

Suárez I, Bodega G, Rubio M, García-Segura LM, Fernández B. Astroglial induction of in vivo angiogenesis. *J Neural Transplant Plast.* 1994;5(1):1-10.

Suzuma I, Suzuma K, Ueki K, Hata Y, Feener EP, King GL et al. Stretch-induced retinal vascular endothelial growth factor expression is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C (PKC)- $\zeta$  but not by stretch-induced ERK1/2, Akt, Ras, or classical/ novel PKC pathways. *J Biol Chem.* 2002; 277:1047–1057.

Sweeney SM, Guy CA, Fields GB, San Antonio JD. Defining the domains of type I collagen involved in heparin-binding and endothelial tube formation. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95: 7275–7280.

Takahashi, T., Fukuda, K., Pan, J., Kodama, H., Sano, M., Makino, S., Kato, T., et al. Characterization of insulin-like growth factor-1-induced activation of the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. *Circulation research* 1999; 85(10), 884-91.

Testa, J. R., & Bellacosa, A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98(20), 10983-5.

Thiery, JP; Duband, JL; Tucker, G; Darribere, T; Boucaut, JC. The role of fibronectin in cell migration during early vertebrate embryogenesis. *Prog. Clin, Biol, Res.* 1984;151: 187-198.

Tsopanoglou NE, Pipili-Synetos E, Maragoudakis ME. Protein kinase C involvement in the regulation of angiogenesis. *J Vasc Res.*1993; 30(4):202-8.

Van Obberghen-Schilling, E., Tucker, R. P., Saupe, F., Gasser, I., Cseh, B., & Orend, G. Fibronectin and tenascin-C: accomplices in vascular morphogenesis during development and tumor growth. *The International journal of developmental biology* 2011;55(4-5), 511-25.

Vartanian A, Stepanova E, Grigorieva I, Solomko E, Baryshnikov A, Lichinitser M. VEGFR1 and PKC $\alpha$  signaling control melanoma vasculogenic mimicry in a VEGFR2 kinase-independent manner. *Melanoma Res.* 2011;21 (2) :91-8.

Vecchi, A., Garlanda, C., Lampugnani, M. G., Resnati, M., Matteucci, C., Stoppacciaro, A., Schnurch, H., et al. Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *European journal of cell biology* 1994;63(2): 247-54

Vernon RB, Sage EH. Between molecules and morphology: Extracellular matrix and creation of vascular form. *Am J Pathol.* 1995;147: 873–883.

Vlodavisky, I.; Miao, H. Q.; Medalion, B.; Danagher, P. & Ron, D. Involvement of heparan sulfate and related molecules in sequestration and growth promoting activity of fibroblast growth factor. *Cancer Metastasis.*1996;15 (2):177-186.

Vouret-Craviari V, Boulter E, Grall D, Matthews C, Van Obberghen-Schilling E. ILK is required for the assembly of matrix-forming adhesions and capillary morphogenesis in endothelial cells. *J Cell Sci.* 2004;117(19): 4559-69

Wang A, Nomura M, Patan S, Ware JA. Inhibition of protein kinase C $\alpha$  prevents endothelial cell migration and vascular tube formation in vitro and myocardial neovascularization in vivo. *Circ Res.* 2002;90: 609–616.

Wang, Y.-cai, Zhang, D.-Z., He, L.-hong, Ding, Y., & Shan, L.-qun. Establishment and primary application of sandwich ELISA method to detect tenascin-C. *Chinese journal of cellular and molecular immunology*. 2011;27(6), 694-6.

White, E.S., Baralle, F.E. and Muro, A.F. New insights into form and function of fibronectin splice variants. *J Pathol*. 2008; 216: 1-14.

Woods, A., & Couchman, J. R. Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Molecular biology of the cell*.1994;5(2), 183-92.

Xian, X., Håkansson, J., Ståhlberg, A., Lindblom, P., Betsholtz, C., Gerhardt, H., & Semb, H. Pericytes limit tumor cell metastasis. *J Clin Invest*. 2006;116(3): 642-51

Xu H, Czerwinski P, Hortmann M, Sohn HY, Förstermann U, Li H. Protein kinase C alpha promotes angiogenic activity of human endothelial cells via induction of vascular endothelial growth factor. *Cardiovasc Res*. 2008;78(2):349-55.

Xu, H., Czerwinski, P., Hortmann, M., Sohn, H.-Y., Förstermann, U., & Li, H. Protein kinase C alpha promotes angiogenic activity of human endothelial cells via induction of vascular endothelial growth factor. *Cardiovascular research*. 2008;78(2), 349-55.

Ying, Q. L., J. Wray. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*. 2008;453 (7194) .519-23.

Yonenaga, Y., Mori, A., Onodera, H., Yasuda, S., Oe, H., Fujimoto, A., Tachibana, T., et al. Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients. *Oncology*. 2005;69(2), 159-66.

Young TA, Wang H, Munk S, Hammoudi DS, Young DS, Mandelcorn MS et al. Vascular endothelial growth factor expression and secretion by retinal pigment epithelial cells in high glucose and hypoxia is protein kinase C dependent. *Exp Eye Res*. 2005;80:651–662.

Zagzag D, Amirnovin R, Greco MA et al. Vascular apoptosis and involution in gliomas precede neovascularization: a novel concept for glioma growth and angiogenesis. *Lab Invest*.2000;80:837–849.

Zagzag D, Friedlander DR, Miller DC, Dosik J, Cangiarella J, Kostianovsky M, Cohen H, Grumet M, Greco MA. Tenascin expression in astrocytomas correlates with angiogenesis.*Cancer Res*.1995; 55:907-14.

Zang, Q., Z. Lu, et al. Association between v-Src and protein kinase C delta in v-Src-transformed fibroblasts. *J Biol Chem*. 1997;272(20)13275-80.

Zhu X, Ohtsubo M, Bohmer RM, Roberts JM, Assoian RK. 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*.1996;133: 391–403.