



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

Aline Oliveira da Silva

**Regulação da diferenciação angiogênica endotelial por matrizes
de gliomas humanos**

Rio de Janeiro

2016

Aline Oliveira da Silva

Regulação da diferenciação angiogênica endotelial por matrizes de gliomas humanos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

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

Rio de Janeiro

2016

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

S586 Silva, Aline Oliveira da.
 Regulação da diferenciação angiogênica endotelial por matrizes de gliomas humanos / Aline Oliveira da Silva. – 2016.
 150 f.

Orientadora: Verônica Maria Morandi da Silva.

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

1. Matriz extracelular – Teses. 2. Endotélio - Teses. 3. Neovascularização – Teses. 4. Glioma. 5. Vesículas Extracelulares. I. Silva, Verônica Maria Morandi da. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 611.1:616.018.74

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Aline Oliveira da Silva

Regulação da diferenciação angiogênica endotelial por matrizes de gliomas humanos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 30 de agosto de 2016.

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

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Tatiana Almeida Simão

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Thereza Fonseca Quirico-Santos

Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. José Garcia Ribeiro Abreu Junior

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2016

Dedico esta tese, com todo o meu amor e gratidão, aos meus pais Cirlania (*in memoriam*) e Lênio. Espero ser merecedora de todo esforço e amor dedicados a mim, em especial à minha formação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque eu sei que Ele esteve comigo durante esta caminhada.

À minha querida mãe, pelo seu amor incondicional demonstrado em todas as suas atitudes, pelo seu exemplo de vida e por todo esforço dedicado à minha formação. Eu continuo por você...

Ao meu pai, meu amigo, que procurou me dar toda tranquilidade e suporte necessários para a conclusão deste trabalho.

Aos meus familiares que sempre torceram por mim, em especial a vovó Cléa.

Ao meu noivo, Leandro, por ser essa pessoa tão amável, que me completa e me faz feliz.

À minha orientadora Verônica, pela paciência, conselhos e experiências nesses 10 anos de convivência e por ter sido tão compreensiva nos momentos que mais precisei.

À Prof^a Camila por todo apoio, atenção e pelas dicas durante os seminários e apresentação de resultados.

À minha amiga Vivi, pelas conversas, conselhos, ajuda em experimentos e, principalmente por ser essa pessoa tão especial. A sua amizade foi um presente que a UERJ me deu.

Ao Edward, uma pessoa maravilhosa, que sempre está disposto a ajudar com os experimentos, protocolos e discussão de resultados, pelas palavras de incentivo e pelos momentos de descontração.

A Lailita, pela amizade, por ser um exemplo de perseverança, determinação e serenidade e por toda ajuda na bancada.

Andreza, Marcela, Thayane, Taíze e Bonelli por fazerem do laboratório um ambiente mais alegre, e, acima de tudo, pela amizade!

Ao Marcos Temperini, pela sua organização, comprometimento e pelas lindas HUVECs que utilizei durante todo este trabalho. Ninguém “faz” HUVEC como vc!

A tia Mariléia pela sua eficiência e cuidado com os materiais e por sempre me avisar quando acaba de fazer aquele cafezinho revigorante.

Aos demais membros do Labangio Chico e Deborah, pelo apoio técnico.

Aos amigos queridos da 2005/1, por todos os momentos alegres e inesquecíveis!! Dos 8 aos 80!!!

Ao Victor, Gislene e Marco Aurélio, por toda ajuda com as questões burocráticas.

À Prof Deborah Schechtman, por me receber em seu laboratório, pela colaboração e por disponibilizar os peptídeos utilizados neste trabalho.

Ao professor André Mencialha por aceitar revisar este trabalho e pelas dicas.

Aos membros da Banca Examinadora por aceitarem avaliar este trabalho.

Aos vizinhos de laboratório: Rafaela, Maurício, Humberto, Aline, Marcinha, Claudinha, Angela, Pamela, Bia, e aos professores Marcelo, Gisele, Anderson, Daniel, Jaqueline, Prescilla e Gabi, pelo bom convívio e auxílio.

À Mônica, Rose e ao Stênio, por toda a ajuda.

À equipe da Anatomia Patológica do Hospital maternidade Carmela Dutra, pela cessão de cordões umbilicais.

À FAPERJ e à CAPES pelo suporte financeiro

A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho inicial.

Albert Einstein

RESUMO

SILVA, Aline Oliveira da. *Regulação da diferenciação angiogênica endotelial por matrizes de gliomas humanos*. 2016. 150f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A matriz extracelular (MEC) é essencial na angiogênese e responsável por induzir vias de sinalização essenciais para a migração, invasão, proliferação e sobrevivência das células endoteliais. A tenascina-C (TN-C), uma proteína matricelular-ícone, está envolvida na proliferação e angiogênese tumoral. A MEC de astrocitomas de alto grau (III e IV) possui elevada quantidade de TN-C, que interfere com a glicoproteína adesiva fibronectina (FN), desestabilizando as adesões focais e induzindo a proliferação celular em gliomas. Estudos prévios pelo nosso grupo mostraram que células de astrocitoma humano produzem uma matriz rica em TN-C, que induz importantes defeitos na tubulogênese endotelial em parte das células endoteliais incubadas com essa matriz, enquanto outra sub-população sofre anoikis (apoptose induzida por desaderência). Na Parte I, confirmamos indicações prévias de que o aumento de expressão de TN-C em astrócitos humanos é parte crucial da transformação tumoral, uma vez que astrócitos normais sintetizam uma matriz rica em FN que não induz defeitos na tubulogênese. Observamos também que células endoteliais que aderem à MEC tumoral expressam maior quantidade de integrina $\alpha 9 \beta 1$ e possuem uma cinética de ativação de FAK e ERK alterada, sugerindo a ativação de integrinas diferentes daquelas ativadas pela matriz autóloga. A MEC de astrocitoma induz a diminuição da expressão de FGFR1 e sindecan-4, diminuindo consequentemente a ativação da via de PKC α , necessária para a formação adequada de estruturas tubulares. As células endoteliais deficientes na formação de estruturas tubulares também apresentaram um aumento na ativação de PKC δ . Verificamos ainda que a matriz de astrocitoma aumenta a expressão de VEGFR2, bem como a migração de células endoteliais em resposta ao VEGF-A. Porém, este fator de crescimento angiogênico potencializa o defeito tubulogênico. Levantamos então a hipótese de que a matriz rica em TN-C atue na seleção de um fenótipo endotelial compatível com as células líderes (*tip cells*): as células líderes, altamente migratórias, guiam a formação dos novos ramos em direção a pistas angiogênicas, enquanto células da haste (*stalk cells*) são importantes para o amadurecimento da parede vascular e para a formação de lúmen. A análise transcriptômica de células endoteliais condicionadas pela matriz de astrocitoma mostrou a indução de diversos genes-chave para o fenótipo líder, como *AQP1*, *DLL4*, *EFNB2*, *MMP14* e *PLXD1*. Na Parte II, investigamos se células endoteliais cuja anoikis foi induzida pela matriz rica em TN-C também desempenham um papel na tubulogênese. Observamos que meios condicionados contendo células apoptóticas estimulavam significativamente a tubulogênese. A caracterização dos meios condicionados mostrou que células endoteliais incubadas com a MEC tumoral liberam aproximadamente 3 vezes mais vesículas extracelulares (VEs) do que as células endoteliais incubadas com a MEC autóloga. A presença dessas vesículas contribuiu tanto para a migração da célula endotelial como para o aumento da formação das estruturas tubulares. Desta forma, sugerimos que a MEC rica em TN-C desempenhe um papel fundamental na organização da angioarquitetura dos vasos de astrocitomas, caracterizada pela grande quantidade de vasos aberrantes, compondo uma rede vascular caótica e sub-funcional.

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

ABSTRACT

SILVA, Aline Oliveira da. *Regulation of endothelial angiogenic differentiation by matrices of human gliomas*. 2016. 150f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016

The extracellular matrix (ECM) is an essential component of angiogenesis, responsible for triggering crucial signaling pathways leading to endothelial cell migration, invasion, proliferation and survival. Tenascin-C (TN-C) is an iconic matricellular protein involved in the regulation of tumor cell migration and angiogenesis. ECM secreted by high grade (III and IV) astrocytomas contains elevated amounts TN-C, which interferes of the adhesive activity of fibronectin, by destabilizing focal adhesions, thus stimulating glioma proliferation. We have previously shown that TN-C rich matrices, produced by human astrocytoma cells, selected a tubulogenesis-defective endothelial cell subpopulation, while inducing anoikis – a particular type of cell death triggered by cell detachment - of another endothelial subpopulation. In Part I, we confirmed that the increase of TN-C by human astrocytes is a crucial part of tumoral transformation, since normal astrocytes, in contrast with astrocytoma cells, synthesize a FN-rich ECM, which does not elicit tubulogenic defects in endothelial cells. We also observed that cells able to adhere on U-373 MG astrocytoma matrix express more $\alpha 9\beta 1$ integrin, besides exhibiting altered kinetics for FAK and ERK activation, when compared to endothelial cells incubated with their autologous immobilized ECM. We also found that the incubation of endothelial cells with astrocytoma ECM led to a decrease of both FGFR1 and syndecan-4 expression, which work as partners in the activation of PKC α signaling. On the other hand, the activation of PKC δ in tubulogenesis-defective endothelial cells was increased in the same condition, suggesting an antagonistic role for both PKC isoforms in endothelial tubulogenesis. These data were confirmed with the use of selective and specific inhibitors and activators of PKC isoforms. Additionally, we found that the astrocytoma matrix increases VEGFR2 expression and endothelial migration induced by VEGF-A. Surprisingly, the tubulogenic defect was potentiated by VEGF-A. The last result led us to hypothesize that the matrix secreted by astrocytoma cells promoted the enrichment of a tip cell-like endothelial phenotype. Tip cells are highly migratory endothelial cells, expressing high levels of VEGFR2 and specialized in guiding neo-vessels towards angiogenic cues. However, an excess of tip cells over stalk cells in a nascent structure precludes branch formation and stabilization. We performed a whole functional genome analysis (transcriptome sequencing) and found that endothelial cells primed by their incubation with TN-C-rich ECM expressed increased the expression of toolkit genes for tip cell phenotype, such as *AQP1*, *DLL4*, *EFNB2*, *MMP14* e *PLXD1*. In Part II, we devoted attention to the endothelial cell subpopulation that undergoes anoikis when incubated with the matrix secreted by U-373 MG cells. Initially, we observed that the conditioned medium (CM) containing apoptotic cells stimulated tubulogenesis of TDECs (for tubulogenesis-defective endothelial cells), in a Matrigel assay. Further characterization of conditioned media showed a near three-fold increase in extracellular vesicles (EVs) in the CM of cells incubated on astrocytoma ECM, as compared with autologous ECM. EVs significantly contributed to tubulogenesis and migration of TDECs. Overall, our work strongly suggests that TN-C rich matrices play a fundamental role in the establishment of dysfunctional vascular networks prevailing in high grade astrocytomas.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Incidência de tumores cerebrais malignos	17
Figura 2 - Progressão e classificação de gliomas humano segundo a WHO.....	22
Figura 3 - Mecanismos de vascularização em gliomas humanos.....	29
Figura 4 - Estrutura dos monômeros da Fibronectina e da Tenascina-C.....	39
Figura 5 - Principais mecanismos que regulam a adesão celular mediada por integrina.....	41
Figura 6 - Integração de vias de sinalização envolvidas na angiogênese.....	43
Figura 7 - Representação esquemática das estruturas e da classificação das isoformas de PKC.....	45
Figura 8 – Esquema proposto para ativação das diferentes isoformas de PKC.....	46
Figura 9 - Ilustração esquemática de mecanismos de seleção de células tip pela modulação de diferentes componentes da via de sinalização do VEGF e Notch-Dll4.....	50
Figura 10 - Modulação da atividade da PKC α dependente de Syndecan-4.	52
Figura 11 - Representação esquemática dos subtipos de vesículas extracelulares.....	53
Figura 12 - Mecanismos de transferência do conteúdo das vesículas extracelulares.....	54
Figura 13 - Representação esquemática do painel de moléculas que podem ser transportadas pelas vesículas extracelulares e os efeitos biológicos.....	56
Figura 14 - Figura ilustrativa de uma câmara de Boyden modificada.....	64
Tabela 1 - Sequências senso e anti-senso dos siRNAs utilizados.....	67
Figura15 - Microambiente angiogênico e os fenótipos da diferenciação endotelial.....	72
Figura 16 - Síntese de FN e TN-C por astrócitos humanos normais: comparação com células de astrocitoma U-373 MG e células endoteliais da veia umbilical humana.....	73
Figura 17 - Efeito das diferentes MECs nativas sobre a adesão endotelial.....	74
Figura 18 - Efeito da matriz extracelular de astrócitos humanos normais na tubulogênese endotelial.....	75
Figura 19 - Análise da cinética de ativação de FAK e ERK e da expressão da integrina $\alpha 9\beta 1$ das células endoteliais incubadas sobre as diferentes matrizes imobilizadas.....	77

Figura 20 - Análise da expressão de sindecán-4 e FGFR1	79
Figura 21 - Papel da matriz extracelular na tubulogênese endotelial, em resposta ao FGF-2...	80
Figura 22 - Análise da distribuição celular da PKC α em células endoteliais moduladas pela MEC.....	81
Figura 23 - Modulação da distribuição celular da PKC α pela matriz extracelular.....	82
Figura 24 - Efeito de moduladores de PKC na diferenciação angiogênica <i>in vitro</i> das células endoteliais pré-incubadas com diferentes MECs.....	83
Figura 25 - Análise da expressão de VEGFR2, em células endoteliais pré-incubadas com MECs imobilizadas.....	84
Figura 26 - Papel da matriz extracelular na migração endotelial em resposta ao VEGF-A.....	85
Figura 27 - Papel da matriz extracelular na tubulogênese endotelial em resposta ao VEGF-A.....	86
Figura 28 – Cinética de aquisição do defeito tubulogênico, em células endoteliais pré-incubadas com MEC tumoral.....	87
Tabela 2 - Genes relacionados ao fenótipo endotelial de células líderes induzidos pela matriz de astrocitoma U-373 MG.....	88
Figura 29 - Sinalização "Inside -out" promove ativação da integrina e aumenta a afinidade ao ligante.....	118
Figura 30 - Função da efrina-B2 em células endoteliais líderes.....	120
Figura 31 - Modelo da função de Sema3E–Plexina-D1 na modulação da via Notch/Dll4 por um mecanismo de <i>feedback</i> negativo induzido por VEGF.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt ou PKB	Proteína quinase B (<i>protein kinase B</i>)
BCA	ácido biciconínico
BCRJ	banco de células do Rio de Janeiro
BSA	albumina de soro bovino
CE	célula endotelial
DAG	diacilglicerol
DMEM-F12	dulbecco's modified eagle médium/F12
EDTA	ácido etileno-diamino-tetra-acético
EGF	fator de crescimento epidermal
ELISA	“enzyme-linked immunosorbent assay”
EPC	célula endotelial progenitora
ERK	proteínas quinases reguladas por estímulos extracelulares (<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>)
FAK	quinase de adesão focal
FGF	fator de crescimento de fibroblastos (<i>fibroblast growth factor</i>)
FGFR1	Receptor -1 do fator de crescimento de fibroblastos
FN	fibronectina
GAG	glicosaminoglicano
GBM	glioblastoma
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
HIF1 α	fator induzido por hipóxia-1
HRP	horseradish peroxidase
HUCCF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
HUVEC	célula endotelial de veia umbilical humana

KCl	Cloreto de potássio
kDa	quilodalton
LN	laminina
M	Molar
M199	meio 199 para cultura de células endoteliais
mA	miliampere
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>)
MB	membrana basal
MEC	matriz extracelular
MMP	metaloproteinase
nM	nanomolar
NaCl	Cloreto de sódio
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
OPD	O-Phenylenediamine dihydrochloride
PBS	tampão salina fosfato (NaCl 1,37 M, Na ₂ HPO ₄ 5 mM, KCl 40 mM, KH ₂ PO ₄ 1mM ph 6,5)
PBS-Ca ⁺²	tampão salina fosfato 0,001M CaCl ₂
PDGFR-β	Receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas (<i>Beta- type platelet derived growth factor receptor</i>)
PKD1	proteína-quinase dependente de fosfatidilinositol-1
PI3K	fosfatidilinositol 3- quinase (<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>)
PIP2	fosfatidilinositol bifosfato (<i>Phosphoinositide- Biphosphate</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>)
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
PVDF	fluoreto de polivinilideno
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
SEMA3A	semaforina 3A
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
U-373 MG	linhagem de astrocitoma humano
V	Volts
VE	vesícula extracelular
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

	INTRODUÇÃO	16
1	OBJETIVOS	57
1.1	Geral	57
1.2	Específicos	57
2	METODOLOGIA	58
2.1	Cultura de células endoteliais da veia umbilical humana	58
2.2	Cultivo das linhagens celulares	59
2.3	Obtenção das matrizes extracelulares imobilizadas livres de células	59
2.4	Dosagem qualitativa e semi-quantitativa de proteínas matriciais secretadas por ELISA indireto	60
2.5	Ensaio de adesão de células endoteliais às matrizes imobilizadas livres de células	61
2.6	Isolamento e quantificação de vesículas extracelulares (VEs)	61
2.7	Ensaio tridimensional de tubulogênese em Matrigel™	61
2.8	Ensaio de migração endotelial	63
2.9	Análise das vias de sinalização envolvidas na modulação da diferenciação angiogênica mediada por matrizes de atrocioma U-373 MG	64
2.9.1	<u>Fracionamento celular para análise de distribuição de PKCs</u>	64
2.9.2	<u>Análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS (PAGE-SDS) e Western Blotting</u>	65
2.9.3	<u>Análise celular por microscopia confocal</u>	66
2.9.4	<u>Silenciamento de expressão de RNA mensageiro</u>	67
2.10	Análise dos transcritos diferentemente expressos nas células endoteliais em contato com as diferentes matrizes	68
2.10.1	<u>Extração do RNA</u>	68
2.10.2	<u>Preparo das bibliotecas</u>	68
2.10.3	<u>Pré-processamento e montagem</u>	69
2.10.4	<u>Mapeamento</u>	69
2.10.5	<u>Análise de expressão</u>	70
2.11	Análise estatística	70

3	RESULTADOS.....	71
3.1	Breve contexto de nossos dados prévios: Sinalização celular na tubulogênese endotelial.....	71
3.1.1	<u>O padrão de expressão de FN e TN-C por astrócitos humanos normais é oposto ao apresentado por células de astrocitomas.....</u>	73
3.1.2	<u>Análise da adesão de células endoteliais à matriz de astrócitos normais.....</u>	74
3.1.3	<u>Efeito da MEC da linhagem de astrocitoma U-373 MG na diferenciação angiogênica de células endoteliais.....</u>	74
3.1.4	<u>Efeito das diferentes matrizes extracelulares sobre a sinalização dependente de adesão em células endoteliais.....</u>	75
3.1.5	<u>Efeito das diferentes matrizes extracelulares sobre a expressão de FGFR1 e sindecan-4.....</u>	78
3.1.6	<u>Papel da matriz extracelular na expressão de VEGFR2 por células endoteliais</u>	83
3.2	Parte II- Artigo: Extracellular vesicles isolated from endothelial cells undergoing anoikis promote endothelial tubulogenesis and migration: a possible autocrine angiogenic mechanism induced by tumor microenvironment.....	89
4	DISCUSSÃO.....	112
	CONCLUSÕES.....	126
	REFERÊNCIAS.....	128

INTRODUÇÃO

Gliomas

Os gliomas são tumores que se formam a partir da transformação maligna de astrócitos, oligodendrócitos ou de seus progenitores (Jovcevska *et al.* 2013). Constituem os mais comuns tumores cerebrais, correspondendo a mais de 70% de todos os neoplasmas do sistema nervoso central (SNC) (Ohgaki e Kleihues, 2005).

Fatores de risco para gliomas são largamente desconhecidos, exceto para as síndromes hereditárias como a neurofibromatose, esclerose tuberosa, esclerose múltipla, síndrome de Li Fraumeni, síndrome de Turcot e Síndrome de Cowden, bem como radiação ionizante. Entretanto, essas doenças hereditárias e radiações são ocorrências raras, representando as causas de menos de 10% de todos gliomas, sugerindo que anormalidades genéticas mais complexas combinadas com fatores ambientais desconhecidos podem predispor indivíduos ao desenvolvimento de glioma (Hofer *et al.* 2014).

Esses tumores variam consideravelmente na morfologia, localização, alterações genéticas e resposta à terapia (Ohgaki *et al.* 2009). Em geral, são tumores muito invasivos e infiltrantes, embora não metastáticos (Hochberg e Puitt, 1980).

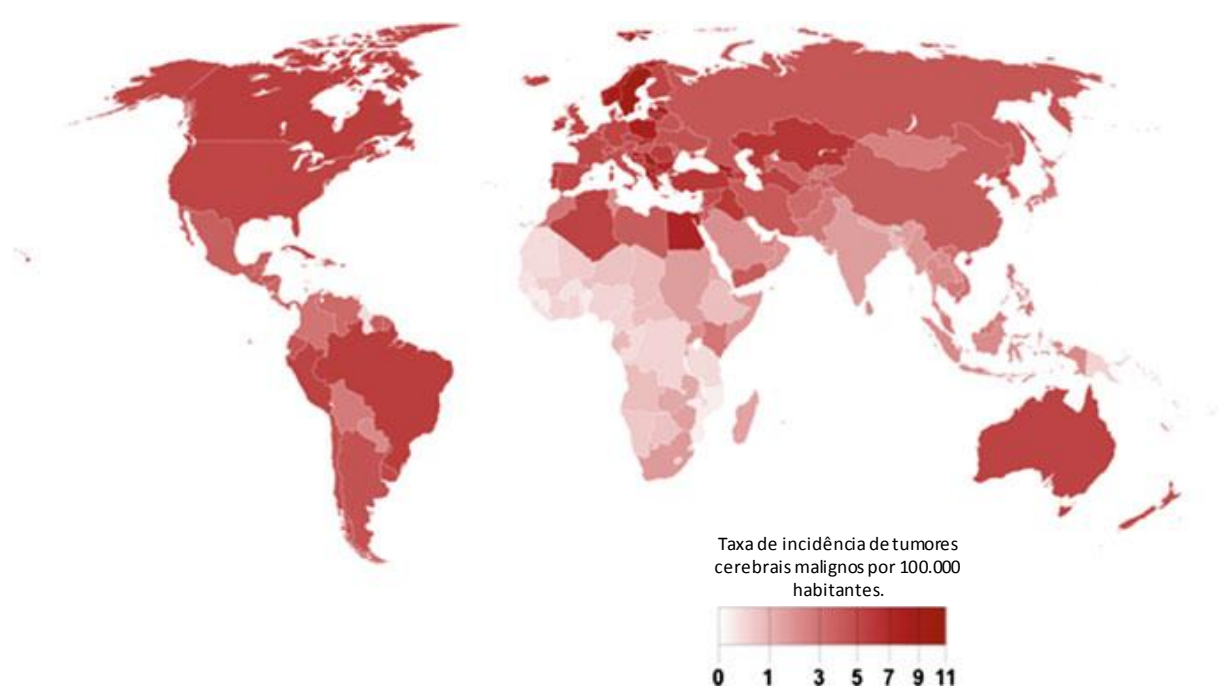
Epidemiologia dos Gliomas

As taxas de incidência de glioma, ou seja, a taxa de glioma recém-diagnosticados, variam significativamente por tipo histológico, idade, sexo, raça, etnia e localização geográfica. Em geral, os gliomas são mais comuns com o aumento da idade, sexo masculino, raça branca e etnias não-hispânicas (Ostrom *et al.* 2014).

O tipo mais comum de glioma é denominado glioblastoma multiforme (GBM), que varia em taxa de incidência 0,59-3,69 por 100.000 pessoas. Astrocitomas anaplásico e GBM, têm maior incidência em indivíduos entre 75-84 anos de idade enquanto os oligodendrogliomas e oligoastrocitomas são mais comuns em indivíduos entre 35-44 anos de idade (Ostrom *et al.* 2015).

A incidência de câncer no cérebro varia significativamente entre os países, assim como os métodos de apuração e vigilância. As taxas de incidência variam ao longo do tempo e por sexo, onde os homens têm taxas de incidência mais elevadas em comparação com as mulheres. A incidência de câncer de cérebro é mais elevada na Europa (5,5 por 100.000 habitantes), América do Norte (5,3 por 100.000 habitantes), Austrália / Nova Zelândia (5,3 por 100.000 habitantes), oeste da Ásia (5,2 por 100.000 habitantes), e norte da África (5 por 100.000 habitantes). É menor na região Centro-Sul da Ásia (1,8 por 100.000 habitantes), África Subsaariana (0,8 por 100.000 habitantes) e Oceania (0,5 por 100.000 habitantes, excluindo a Austrália e a Nova Zelândia) (GLOBOCAN 2012). Entretanto as menores taxas de incidência nos países em desenvolvimento podem ser parcialmente explicadas pelo sub-registro de casos (Ostrom *et al.* 2015).

Figura 1 - Incidência de tumores cerebrais malignos)/ 100.000 pessoas em 2012



Legenda: Taxa de incidência de tumores malignos por 100.000 habitantes (homens e mulheres) por país
Fonte: Adaptado de GLOBOCAN, 2012.

Classificação dos Gliomas

A classificação de 2007 estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) tem 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; Okada, *et al.* 2009).

Segundo esta classificação, os gliomas são divididos em quatro graus crescentes de malignidade (Figura 2), baseado na histologia: grau 1 (astrocitoma pilocítico), grau II (astrocitoma difuso), grau III (astrocitoma anaplásico ou AA) e grau IV (GBM) (Rousseau *et al.* 2008), sendo as duas últimas consideradas de grau elevado ou maligno e representando cerca de 75 % dos casos (Grant *et al.* 2014).

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.* 2007). Os GBMs se encaixam no grau mais maligno dos astrocitomas e podem surgir *de novo*, ou evoluir a partir de gliomas de baixo grau (Grant *et al.* 2014).

Os critérios histopatológicos considerados incluem: atipia nuclear, mitoses, proliferação endotelial, necrose, expressão da proteína de citoesqueleto vimentina e da proteína ácida 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*); perda ou mutação do gene p53, (Plate e Risau, 1995; Mentlein e Held-Feindt, 2003), além de evidências clínicas como: progressão, idade do paciente e localização cerebral (Branger e Bouvier, 2005; Pfister e Witt, 2009).

Com nestes critérios, os 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 (Pfister e Witt, 2009). Esses tumores apresentam ainda infiltração difusa das estruturas cerebrais adjacentes e distantes, tendem a recorrer após ressecção cirúrgica e estão frequentemente associados com a progressão para outros tipos histológicos malignos - astrocitoma anaplásico (grau III) - e

eventualmente, GBM secundário (grau IV) (Louis *et al.* 2007; Ohgaki *et al.* 2005; Pfister e Witt, 2009).

O astrocitoma difuso (grau II) 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 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 (Cavenee, 2000; Branger *et al.* 2010; Vehlow *et al.* 2013).

GBMs primários que se formam *de novo* e os GBMs secundários que se formam a partir da transformação maligna de gliomas de baixo grau parecem ser histologicamente idênticos (Ohgaki e Kleihues, 2007). 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 observado 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. Desta forma, foi proposto que os GBMs primário e secundário representam duas entidades clínicas distintas (Bralten e French, 2011; Hirose *et al.* 2013).

No entanto, as distinções tornam-se turvas quando se considera o quadro clínico marcante e as 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 (Miller e Perry, 2007; Pouratian *et al.* 2008).

Entretanto, as características clínicas e o prognóstico dos pacientes com glioma de grau II –III e GBM (grau IV) não estão refletidos com precisão pelas características histológicas. Por exemplo, astrocitomas de grau II e III possuem um comportamento clínico altamente variável e isto não é adequadamente previsto apenas com base na classificação da OMS de

2007. Enquanto alguns são indolentes, outros progridem rapidamente para GBM. Torna-se claro então a necessidade do desenvolvimento de uma nova classificação (Bralten e French, 2011; Hirose *et al.* 2013).

Nas últimas décadas, técnicas moleculares possibilitaram a caracterização de perfis genéticos de diversos tipos de tumores. Alguns marcadores moleculares têm-se demonstrado úteis na identificação de subtipos de gliomas, assim como no prognóstico e na escolha do tratamento (Grant *et al.* 2014).

A classificação de tumores do SNC da WHO de 2016, rompeu com o princípio do diagnóstico baseado inteiramente em microscopia, incorporando parâmetros moleculares para a classificação destes tumores (Louis DN *et al.* 2016). O uso de parâmetros fenotípicos e genotípicos integrados, adiciona um nível de objetividade para o diagnóstico de entidades biologicamente mais homogêneas, levando a melhoria na triagem dos pacientes e determinações mais precisas de prognóstico e tratamento. No entanto, esta classificação também cria um grupo de tumores que não se enquadra nestas entidades mais definidas, denominado NOS, que deverão ser posteriormente estudados (Louis DN *et al.* 2016).

Interessantemente, enquanto no passado todos os tumores derivados de astrócitos (astrocitomas) foram agrupados juntos, atualmente todos os gliomas difusos (astrocitário ou oligodendroglial) estão agrupados, tendo como base não apenas seu padrão de crescimento e comportamento, mas principalmente as mutações genéticas compartilhadas nos genes IDH1 e IDH2. Adicionalmente, mutações somáticas nos genes *TP53* e *ATRX* como também a codeleção de braços cromossômicos 1p e 19q (1p / 19q) têm sido implicados como marcadores clinicamente relevantes (*The Cancer Genome Atlas Research Network et al.* 2015; Louis DN 2016).

Em glioblastomas, apesar dos subtipos GBM primário e GBM secundário compartilharem características morfológicas e histológicas, suas arquiteturas genômicas diferem consideravelmente (Ohgaki *et al.* 2007). Os GBMs primários são caracterizados por amplificações de *EGFR* ou mutações ativadoras, perda do cromossomo 10q (PTEN), bem como 9p21 (locus *CDKN2A* que codifica p16Ink4) (Furnari *et al.* 2007; Ohgaki *et al.* 2007). Já os GBMs secundários apresentam mutações genéticas no gene supressor de tumor *TP53* e *IDH*, perda de heterozigosidade (LOH) do cromossomo 10q, bem como anormalidades na p16 e Rb (Furnari *et al.* 2007; Ohgaki *et al.* 2007). Especificamente, as mutações *IDH* são um marcador molecular de diagnóstico definitivo de GBMs secundários. Desta forma, os GBMs são divididos de acordo com a classificação de 2016 da OMS em: (1) GBM IDH-tipo selvagem (cerca de 90% dos casos), que corresponde mais frequentemente com o GBM

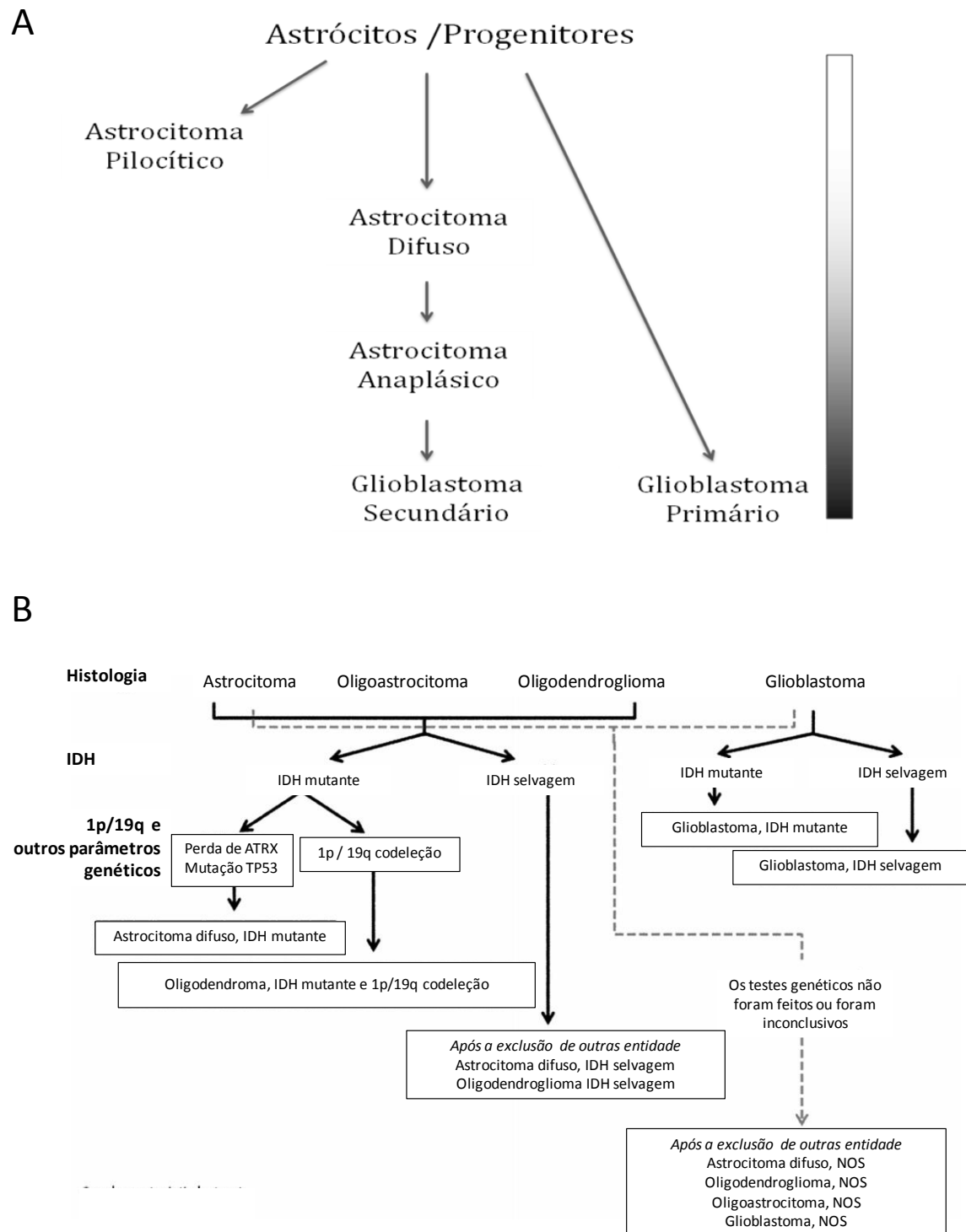
primário ou *de novo*, predominante em pacientes com mais de 55 anos de idade (Ohgaki H, Kleihues P, 2013); (2) GBM IDH-mutante (Cerca de 10% dos casos), corresponde praticamente ao GBM secundário com um histórico de evolução de tumores de graus menores e surge preferencialmente em jovens pacientes (Ohgaki H, Kleihues P, 2013) e (3) GBM NOS, GBM em que a avaliação do gene IDH não pôde ser executada. A necessidade de traçar os perfis genéticos para uma melhor caracterização desses tumores tem como objetivo desenvolver estratégias terapêutica direcionadas.

Diversas evidências têm demonstrado que uma pequena população de células-tronco, chamadas de células-tronco tumorais (CTTs), são responsáveis pela iniciação e contínuo crescimento do tumor (Dick, 2008). Estas células contribuem para a resistência terapêutica e são consideradas a causa mais provável de recidiva (Bao *et al.* 2006; Ortensi *et al.* 2013; Liu *et al.* 2006). As CTTs foram identificadas e validadas em vários tipos de tumores sólidos, tais como: câncer de mama, cólon, pâncreas, pulmão e em GBMs (Oliveira *et al.* 2010; Yi *et al.* 2008; Bao *et al.* 2010; Ignatova *et al.* 2002; Sanai *et al.* 2005).

A molécula CD133 foi identificada e amplamente utilizada como um marcador para caracterizar população CTTs em GBMs (Liu *et al.* 2009; Fan *et al.* 2010; Yan *et al.* 2011). No entanto, sua expressão é observada em células epiteliais maduras do lúmen de ductos em vários órgãos adultos, indicando que CD133 pode não ser um marcador específico para CTTs (Shmelkov *et al.* 2008). Recentemente, outro potencial marcador de CTTs, CD90, foi identificado em GBM. O nível de expressão de CD90 foi altamente correlacionado com gliomas de alto grau, com expressão significativamente mais elevada nestes tumores mais malignos do que em gliomas de baixo grau. Curiosamente, CD90 e CD133 foram marcadores co-expressos na GBM, no qual 100 % das células CD133⁺ eram também CD90⁺, mas apenas uma parte das células CD90⁺ foram positivas para CD133, indicando que as células tronco tumorais CD133⁺ em GBM *in vivo* são uma subpopulação de células CD90⁺ (He *et al.* 2011). Outros marcadores de superfície, tais como CD15 e NG2, ainda estão sob investigação (Svendsen *et al.* 2011; Read *et al.* 2009).

Recentemente Nie e colaboradores (2015) apontaram a tenascina-C (TN-C), uma proteína de matriz extracelular, como um promissor marcador prognóstico para GBM, assim como um marcador de CTTs em gliomas, uma vez que sua expressão aumenta com o grau de malignidade desses tumores e diminui com a diferenciação das CTTs em GBM.

Figura 2 - Progressão e classificação de gliomas humano segundo a WHO



Legenda: A- Classificação de 2007 da WHO – *World Health Organization*. A gradação dos tons de cinza no retângulo à direita representa a progressão da malignidade dos tumores com base nas características histopatológicas. B –Classificação de 2016 da WHO- integração de critérios fenotípicos e genotípicos
 Fonte: Adaptado de Louis, D. N *et al.*, 2016

Características da rede vascular em gliomas

A formação de vasos é um processo altamente dinâmico, que possui um papel fundamental no transporte de oxigênio e de nutrientes, retirada de resíduos celulares e participa da regulação do fluxo sanguíneo. A vasculatura normal é organizada como uma rede hierarquia de artérias, arteríolas, capilares, vênulas e veias (Aird, 2012).

Nos capilares, os vasos sanguíneos são formados por uma fina camada de células endoteliais cercadas por pericitos e, em grandes vasos como artérias e arteríolas, as células endoteliais estão associadas a células de músculo liso (Aird, 2012). As células endoteliais cerebrais estão diretamente associadas com astrócitos e expressam proteínas de junções oclusivas, resultando na formação da barreira hematoencefálica (Obermeier *et al.* 2013; Jain *et al.* 2007). Os astrócitos, bem como os fatores de crescimento produzidos no microambiente cerebral, regulam a integridade desta barreira (Obermeier *et al.* 2013).

As células endoteliais da vasculatura normal são geralmente quiescentes com apenas 0,01 % de células em divisão (Carmeliet *et al.* 2000; Jhaveri *et al.* 2014). Isto é possível devido ao equilíbrio entre fatores pró- angiogênicos e anti – angiogênico (Wong *et al.* 2009). Desta forma, a regulação dos níveis de fatores de crescimento é a chave para a apropriada formação dos vasos sanguíneos.

Em contraste com os vasos sanguíneos normais, a vascularização tumoral, particularmente em gliomas, é altamente proliferativa resultando em anormalidades estruturais (Jain *et al.* 2007; Carmeliet *et al.* 2000). Esses tumores possuem vasos altamente heterogêneos e não estão em conformidade com a fisiologia da microvasculatura do tecido cerebral normal. Além disso, os capilares cerebrais normais possuem aproximadamente 3 a 5µm de diâmetro enquanto nos gliomas, os capilares apresentam diâmetros variando entre 3 e 40µm. Vários autores sugerem 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; Brahimi-Horn *et al.* 2001; Hanahan e Folkman, 1996).

Estudos de microscopia eletrônica identificaram 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 *et al.* 2000; Lindahl *et al.* 1997).

Células murais são componentes essenciais para a maturação e estabilidade dos vasos sanguíneos (Xian *et al.* 2006; Jhaveri *et al.* 2014). 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, que 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 consequentemente alta densidade vascular, a atividade angiogênica dentro da massa do glioma diminui progressivamente para o centro do tumor (Forsyth *et al.* 1999; Carmeliet e 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% (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 (Jhaveri *et al.* 2014; Bergers e 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

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. Nos gliomas a apresentação de regiões edematosas e hemorrágicas seria parcialmente explicada pela superprodução de VEGF e pelo baixo recrutamento de pericitos, envolvidos na correta estabilização dos vasos recém formados (Bergers e Benjamin, 2003). Além disso, os focos de necrose rodeados por células pseudopaliçadas são uma configuração relativamente única para GBMs (Rahman *et al.* 2010). Rong e colaboradores (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. Desta forma, os GBMs são caracterizados por uma abundante e aberrante vasculatura.

Em gliomas, os processos de cooptação vascular, *sprouting* angiogênico e vasculogênese pós-natal têm sido extensivamente descritos. No entanto, recentemente, tornou-se claro que além destes, o mimetismo vascular e a transdiferenciação endotelial de células de glioblastoma também contribuem para a formação de vasos nestes tumores (Hardee e Zagzag, 2012).

Cooptação Vascular

Temporalmente, a cooptação vascular é o primeiro mecanismo de vascularização em gliomas (Hardee e Zagzag, 2012). Nesses tumores a formação de vasos não decorre

exclusivamente de uma necessidade de expansão da massa tumoral. Inicialmente as células tumorais gliais parasitam e proliferam em torno dos vasos sanguíneos do tecido cerebral normal, formando um glioma não encapsulado, de caráter invasivo, migrando ao longo dos vasos sanguíneos e podem se tornar tão grande quanto um tumor dito angiogênico (Zagzag *et al.* 2000; Bergers e Benjamin, 2003)

No entanto, a convivência extensa com as células endoteliais dos vasos nativos culmina, em algum momento da progressão tumoral, na morte destas células vasculares, levando à fase seguinte, de regressão vascular através da apoptose mediada pela angiopoietina-2 (Ang-2). A involução desses vasos gera a 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; Tate e Aghi, 2009; Rahman *et al.* 2010).

Angiogênese

Na fase angiogênica, o VEGF promove a proliferação endotelial ativando a via de MAP-quinases (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; Hardee e Zagzag, 2012). 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; Hardee e Zagzag, 2012).

Vasculogênese

Um terceiro mecanismo de neovascularização do tumor é a vasculogênese pós-natal, que envolve a diferenciação de células circulantes derivadas da medula óssea, conhecidas como células endoteliais progenitoras (EPCs) (Hardee e Zagzag, 2012).

Entretanto recentes estudos mostraram que, além das EPCs derivadas de medula óssea, os macrófagos associados a tumores (TAMs) e monócitos circulantes expressando TIE-2 (ETM) migram para os locais de neovascularização patológica onde diferenciam-se em células endoteliais ou macrófagos (Lewis *et al.* 2007; Venneri *et al.* 2007; Hardee e Zagzag, 2012).

EPCs e TAMs expressam CXCR4 e migram em resposta a um gradiente de SDF-1 (Li *et al.* 2006; Tabatabai *et al.* 2006; Du *et al.* 2008). Consistente com esta via, a imunorreatividade para SDF-1 é forte nos vasos associados ao tumor de GBMs (Rubin *et al.* 2003; Zagzag *et al.* 2008). Além disso, Aghi e colaboradores (2006) demonstraram que o SDF-1 produzido por gliomas murino contribuiu para a vasculogênese, incorporando EPCs no endotélio tumoral. A via de sinalização Ang-2 / TIE-2 possui um importante papel na vasculogênese tumoral uma vez que Ang-2 está envolvida no recrutamento de EPCs e TEMs (Lewis *et al.* 2007; Shaw *et al.* 2004; Udani *et al.* 2005; Murdoch *et al.* 2007).

Entretanto, o mecanismo exato da contribuição de EPCs e TEMs para a neovascularização de tumores cerebrais ainda não foi totalmente elucidado (Hardee e Zagzag, 2012).

Mimetismo Vascular

O quarto mecanismo de vascularização em gliomas, mimetismo vascular, foi inicialmente descrito em modelos de melanoma humano e é definido como a capacidade de células tumorais formarem redes funcionais como a de vasos. *In vitro*, células de melanomas invasivos e metastáticos foram capazes de formar canais vasculares em cultura tridimensional. Além disso, Demou e Hendrix (2008) mostraram que redes das células de melanomas agressivos apresentavam uma forte expressão dos genes envolvidos em angiogênese, sugerindo uma base genética subjacente a este processo.

Yue e Chen (2005) demonstraram a presença de mimetismo vascular em 2/45 amostras de astrocitoma humanas. Shaifer e colaboradores (2010) sugeriram uma ligação entre mimetismo vascular em GBMs e radiorresistência vascular. Usando um sistema tridimensional de co-cultura, mostraram que células endoteliais inicialmente formam estruturas vasculares seguida pela incorporação de células do glioma, criando uma rede vascular mosaico. Sob condições angiogênicas, as células de glioma incorporadas à rede

vascular, não apresentaram marcadores específicos endoteliais, sugerindo um mimetismo vascular. No entanto, essas células também reduziram a expressão de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e aumentaram a expressão de CD133, indicando uma mudança para um fenótipo de célula tronco.

Em um estudo com 101 amostras de glioma humano, Liu e colaboradores (2011) encontraram uma correlação entre mimetismo vascular e a graduação do tumor de acordo com a classificação da OMS. Os tumores que continham evidências de mimetismo vascular, definido de forma imunohistoquímica como CD34⁺ PAS⁺, eram de elevado grau (mais agressivos), e estes pacientes tiveram tempos de sobrevida global mais curtos do que aqueles que não apresentaram mimetismo vascular.

Transdiferenciação glioma-endotélio

O mecanismo mais recentemente descrito de neovascularização em gliomas envolve a transdiferenciação de células de glioma para um fenótipo de célula endotelial. Assim como o mimetismo vascular, a hipótese da transdiferenciação endotelial se originou em modelos de melanomas humano (Hardee e Zagzag, 2012).

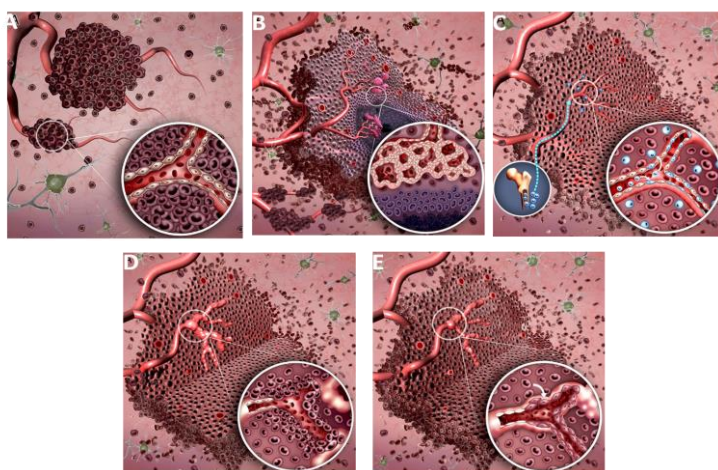
Uma estreita associação entre as células endoteliais e células-tronco neurais foi demonstrado por Shen e colaboradores (2004) que estabeleceram que os fatores secretados pelas células endoteliais estimulam a auto-renovação das células-tronco neurais. Esta interação endotelial também tem sido aplicada às células-tronco de glioma (GSCs) e funcionaria como protetora do microambiente do glioma no qual as GSCs seriam capazes de proliferar e permanecer indiferenciadas sem sofrerem influências externas.

Ricci-Vitiani e colaboradores (2011) demonstraram recentemente o processo de transdiferenciação endotelial das células tronco de glioblastomas. Usando 15 amostras de GBM, eles observaram que uma fração substancial de células endoteliais CD31⁺ apresentavam as mesmas alterações cromossômicas presentes nas células tumorais dentro da amostra. Entretanto, este processo de transdiferenciação endotelial das células de glioma precisa ser mais investigado para a completa validação.

Nesse processo extremamente complexo de formação de vasos, 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 a participação da MEC tumoral na angiogênese.

Figura 3-Mecanismos de vascularização em gliomas humanos



Legenda: A- Coptação vascular. B- Angiogênese. C- Vasculogênese. D- Mimetismo vascular. E- Transdiferenciação endotelial das células de gliomas.

Fonte: Hardee e Zagzag 2012.

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 e 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 e 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, nidogênio (ou entactina) e proteoglicanos de heparam sulfato (HSPG), destacando-se o perlecan. Já foi extensivamente descrito que os componentes de MEC controlam ativamente o crescimento, diferenciação, migração, homeostase, morfogênese e viabilidade celular (Kreis e Vale, 1999; Clause *et al.* 2013; Theocharis *et al.* 2012).

As proteínas da MEC além de serem reconhecidas por células vizinhas principalmente através dos receptores da superfamília das integrinas, interagem entre si. Como resultado desta interação, a MEC é capaz de influenciar diferentes vias de sinalização e o comportamento das células (Bosman e Stamenkovic, 2003; Discher *et al.* 2009; Geiger *et al.* 2009). Além disso, através dos HSPGs, a MEC pode agir (1) sequestrando 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 e Couchman, 2003; Schultz *et al.* 2009; Mettouchi, 2012; Brösicke e Faissner, 2015).

Variações na composição e na estrutura dos componentes da MEC afetam tanto a estrutura geral e as propriedades biomecânicas da rede formada, como também os sinais transmitidos para as células modulando assim as suas respostas (Rozario *et al.* 2010). Anormalidades na composição da MEC estão envolvidas em muitas síndromes e condições patológicas /letais. Desta forma, as moléculas da MEC emergem como alvos potenciais para o tratamento farmacológico de diversos tipos de doenças (Jarvelainen *et al.* 2009)

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 e 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, determina a dinâmica da angiogênese, mas o início e finalização deste processo de diferenciação celular são marcados por transições bastante típicas na composição matricial (Senger e 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 αv 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; Bayless *et al.* 2000; Mettouchi, 2012).

A perda da adesão à matriz leva à *anoikis* - ou apoptose induzida por perda de ancoragem (Frisch e Francis, 1994). 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).

Os tumores estimulam a neovascularização a fim de fornecer o oxigênio e os nutrientes necessários para o seu crescimento e sobrevivência (Zhou *et al.* 2006). A angiogênese tumoral é estimulada por fatores de crescimento tais como VEGF e FGF e envolve a proliferação e a migração das células endoteliais para os tecidos privados de nutrientes, especificamente para as regiões adjacentes o tumor seguido pela formação dos vasos (Pickup *et al.* 2014). A MEC circundante do tumor atua como um reservatório para fatores pro- e anti-angiogênicos, formando um gradiente para a migração de células endoteliais e promovendo tanto a sobrevivência quanto o crescimento de células endoteliais recentemente recrutadas (Avraamides *et al.* 2008; Stratman *et al.* 2009). A MEC associada a tumores sólidos também favorece a angiogênese através da promoção da migração de células endoteliais e indução de fatores de transcrição que levam ao aumento da expressão de receptores de VEGFR2 que suportam o crescimento e sobrevivência de células endoteliais (Mammoto *et al.* 2009; Liu *et al.* 2010).

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; Jones e Bouvier, 2014)

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 (TN-C), trombospondina-1 (TSP-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; Vehlow *et al.* 2013).

Fibronectina

A fibronectina (FN) é normalmente classificada em duas formas: fibronectina plasmática (p-FN), uma forma solúvel, produzida por hepatócitos, que circula na corrente sanguínea em altas concentrações, e a fibronectina celular (c-FN), produzida em tecidos onde é incorporada em uma matriz fibrilar. A c-FN difere da p-FN 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 (White *et al.* 2008; Kostourou *et al.* 2014).

Esta glicoproteína normalmente apresenta-se como um dímero composto de cadeias de aproximadamente 250 - 270 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 FN I, FN II e FN III (Hynes, 1990).

Três domínios FNIII (EDA, EDB e V) podem ou não estar presentes na molécula devido o *splicing* alternativo do pré-mRNA. Isoformas de FN compreendendo os domínios EDA ou EDB são conhecidos como isoformas oncofetal, devido à sua importância no desenvolvimento e a sua re - expressão em tumores, contrastando com presença restrita em tecidos adultos normais. A análise imunohistoquímica dos tecidos tumorais de nove GBM e cinco astrocitomas anaplásico apresentou coloração positiva de FN para os domínios EDA e EDB. Estas isoformas também foram imunolocalizadas na MEC das células tumorais e em vasos tumorais, mas estavam ausentes no tecido cerebral normal (Kumra e Reinhardt, 2015)

A FN celular regula um amplo espectro de funções celulares como: adesão celular, migração, crescimento e diferenciação celular. Alguns estudos mostraram que a FN conduz a montagem de proteínas de MEC incluindo colágeno I e III, fibrilina -1, fibulina - 1, fibrinogênio, TSP-1, e TN-C. A FN não é apenas indispensável para a iniciação destes conjuntos de proteínas na MEC, mas também para a estabilização de alguns deles. Desta forma, a FN atua como um organizador mestre da MEC (revisto por Kumra e Reinhardt, 2015). Conjuntos diferentes dos módulos da FN 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 (Kostourou *et al.* 2014).

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 e Ruolslathi, 1984; Takahashi *et al.* 2007). 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 e 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 e 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 (Schwarzbauer e DeSimone, 2011).

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, revisto por Astrof e 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 *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 e 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, 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 TN-C.

Proteínas Matricelulares

As proteínas matricelulares são um grupo de proteínas da MEC cujo papel não seria propriamente estrutural, mas que influenciam na regulação de funções celulares como da adesão, proliferação, migração, diferenciação e apoptose (Bornstein e Sage, 2002; Bornstein, 2009; Morris e Kyriakides, 2014).

Essas proteínas são expressas de forma dinâmica e suas funções celulares são altamente dependentes de sinais locais (Wong e Rustgi, 2013). Membros deste grupo incluem as proteínas SPARC (*Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine*), TN-C, osteopontina e as TSP-1 e TSP-2 (Kyriakides e Bornstein, 2003). Tipicamente, elas são expressas em baixos níveis nos tecidos adultos, mas são altamente expressas 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). Já foi visto que, em situações injúrias como doenças crônicas ou virais no Sistema Nervoso Central (SNC), os astrócitos reagem reformulando seu microambiente ao secretar proteínas matricelulares como SPARC, TN-C, TSPs, entre outras. (Jones e Bouvier, 2014).

As proteínas matricelulares possuem múltiplos módulos estruturais que se ligam a vários receptores de superfície celular, fatores de crescimento, citocinas e proteases e geralmente levam a *perda de aderência* celular (Bornstein e 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) (Murphy-Ullrich, 2001).

A desregulada expressão de proteínas matricelulares foi relatada em muitos tumores sólidos. Análise imunohistoquímica de amostras tumorais humanas revelaram níveis elevados de SPARC em astrocitomas, cânceres de mama e de pâncreas (Huang *et al.* 2000; Barth *et al.* 2005; Prenzel *et al.* 2006). Da mesma forma, a expressão quantitativa gênica e dados de proteômica identificaram aumento de TN-C em diferentes tipos de tumores (Wikman *et al.* 2002; Kwon *et al.* 2009 ; Rocco *et al.* 2011). A regulação positiva aberrante destas proteínas matricelulares foram correlacionadas com pior prognóstico em pacientes com câncer (Chiodoni *et al.* 2010) e pode ter implicações clínicas importantes no campo do diagnóstico molecular. Por exemplo, a TN-C foi proposta também como um potencial marcador diagnóstico para certos tipos de câncer como os gliomas e câncer de bexiga devido sua relação com a menor sobrevida do paciente (Mende *et al.* 2002; Brunner *et al.* 2004).

Tenascina–C (TN-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 e Schwarzbauer, 2005).

A TN-C é uma glicoproteína hexamérica composta por 4 domínios distintos que permitem a interação com outros constituintes da matriz, componentes patogênicos, fatores solúveis e proteínas da superfície celular; conferindo a capacidade de se ligar a mais de 25 moléculas diferentes identificadas (Giblin e Midwood, 2015). Cada monômero contém

aproximadamente 200 kDa 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 do tipo EGF (*EGF-like*), 8 repetições constantes do tipo III da FN e 9 repetições de tipo III que sofrem *splicing* alternativo, e ainda 1 domínio globular C-terminal de homologia ao fibrinogênio (*fibrinogen-like*) (Jones *et al.* 2000; Jones e Bouvier, 2013).

A TN-C foi descoberta na década de 80, de forma independente e simultaneamente por vários grupos de pesquisa com interesses em diferentes campos como: desenvolvimento embrionário/neural, câncer e biologia da matriz extracelular (Giblin e Midwood, 2015). Esta proteína matricelular tem um grande impacto sobre o microambiente através de interações 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, componentes matriciais como fibronectina, heparina e colágeno, como também com fatores de crescimento, regulando assim respostas celulares, tais como a sobrevivência, migração, proliferação e transdiferenciação (Tastekin *et al.* 2014). Durante a embriogênese, a tenascina-C está presente no desenvolvimento da vasculatura de vários tecidos e órgãos (Kaplony *et al.* 1991; Jones e Bouvier, 2013). A TN-C é expressa transitoriamente pelas células neurais e não neurais durante o desenvolvimento e desempenha um papel no remodelamento da matriz e no reparo tecidual. Durante o desenvolvimento do cérebro, a expressão de TN-C pela glia radial e por subpopulações de astrócitos afeta vários processos, tais como a migração celular e proliferação, a orientação axonal, e plasticidade sináptica e no estabelecimento de circuitos neuronais (Nishio *et al.* 2003; Martineau *et al.* 2013).

No entanto, na maioria dos tecidos normais adultos, sua expressão é muito reduzida ou ausente. Muitas condições patológicas estão fortemente correlacionadas com o aumento da expressão de TN-C. Por exemplo, há uma correlação positiva entre a expressão de TN-C e a ocorrência de injúrias vasculares e cardíacas, além disso, em 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).

Enquanto nos tecidos adultos estáticos como as cartilagens, há uma predominância de isoformas pequenas de TN-C (como apenas 1 domínio FNIII de *splicing* alternativo), durante o desenvolvimento embrionário bem como em situações patológicas como inflamação, regeneração e câncer há uma expressão predominante das grandes isoformas (Bressicke e

Faissner, 2016). Recentes estudos têm sugerido que as isoformas grandes da tenascina C podem se correlacionar com prognóstico, invasão e progressão do câncer de bexiga, do cérebro, do cólon, do pulmão, da mama e linfoma de Hodgkin. Além disso, a presença destas isoformas grandes, em alguns casos, também podem indicar recorrência da doença e resistência à quimioterapia (Giblin e Midwood, 2015).

No contexto das neoplasias, a TN-C tem um importante papel na proliferação da célula tumoral, metástase e angiogênese tumoral. Muitos trabalhos correlacionam a alta expressão de TN-C a uma variedade de tumores invasivos metastáticos incluindo os tumores de cólon, pulmão, cérebro e mama. (Tastekin *et al.* 2014). Em tumores de mama, a expressão de TN-C parece se correlacionar com os 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).

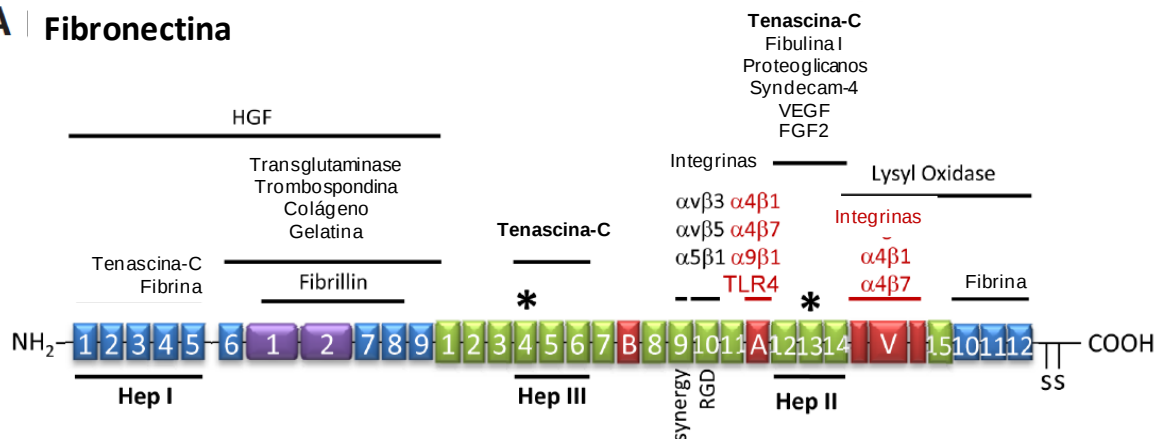
Em gliomas, em geral, a elevada expressão de TN-C é correlacionada com um prognóstico ruim para o paciente (Leins *et al.* 2003; Behrem *et al.* 2005; Wong e Rustgi, 2013). Em astrocitomas de baixo grau e em oligodendromas, a TN-C tem sido encontrada em localização perivascular e proposta como um marcador de vasos tumorais. No entanto, não existem evidências 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 deste trabalho, 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; Brösicke e Faissner, 2015).

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 (Colman *et al.* 2010). 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; Brösicke e Faissner, 2015), 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 e 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; Brösicke e Faissner, 2015).

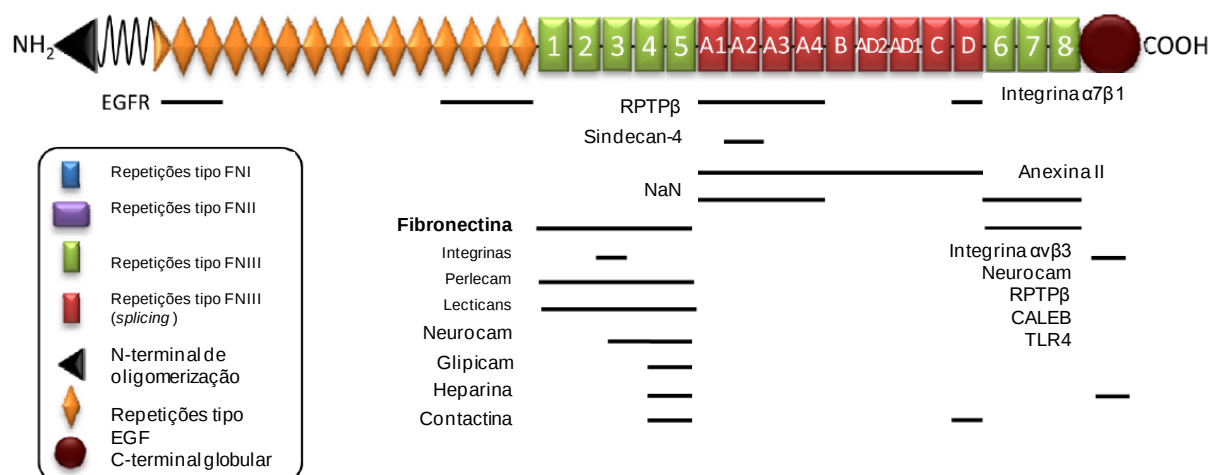
Estudos sobre a evolução dos genes da FN e da TN-C indicam que a parceria entre estas duas moléculas teve como consequência mais importante a aquisição do sistema vascular pelos vertebrados (Obberghen-Schilling *et al.* 2011). Investigações sobre a morfogênese vascular, realizados em modelos de desenvolvimento, 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 4 - Estrutura dos monômeros da Fibronectina e da Tenascina-C

A | Fibronectina



B | Tenascina-C



Legenda: (A) Fibronectina é uma proteína dimérica de 240–270 KDa, 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: Adaptado de Obberghen-Schilling *et al.* 2011.

Integrinas

As integrinas são proteínas de adesão, heterodiméricas e transmembranares que acoplam o citoesqueleto de actina ao microambiente extracelular transmitindo bidirecionalmente sinais essenciais na adesão, migração, diferenciação e sobrevivência celular (Iwamoto e Calderwood, 2015).

Estas proteínas são formadas pela ligação não covalente de uma cadeia α e uma cadeia β . A espécie humana possui 18 tipos de cadeia α e 8 tipos de cadeia β que combinam originando 24 diferentes $\alpha\beta$ heterodímeros. O domínio extracelular das integrinas liga especificamente a proteínas da matriz, receptores de superfície celular ou proteínas solúveis e sua cauda citoplasmática é capaz de recrutar moléculas acessórias, como a talina, a vinculina e a paxilina, que acessoram a reorganização do citoesqueleto de actina, contribuindo para um aumento na força de adesão celular (Campbell e Humphries, 2011; Morse *et al.* 2014). Assim, as interações mediadas por integrinas podem ser fracas e transitórias ou fortes e duráveis, como no caso da adesão focal (Friedl e Wolf, 2003, Seguin *et al.*, 2015).

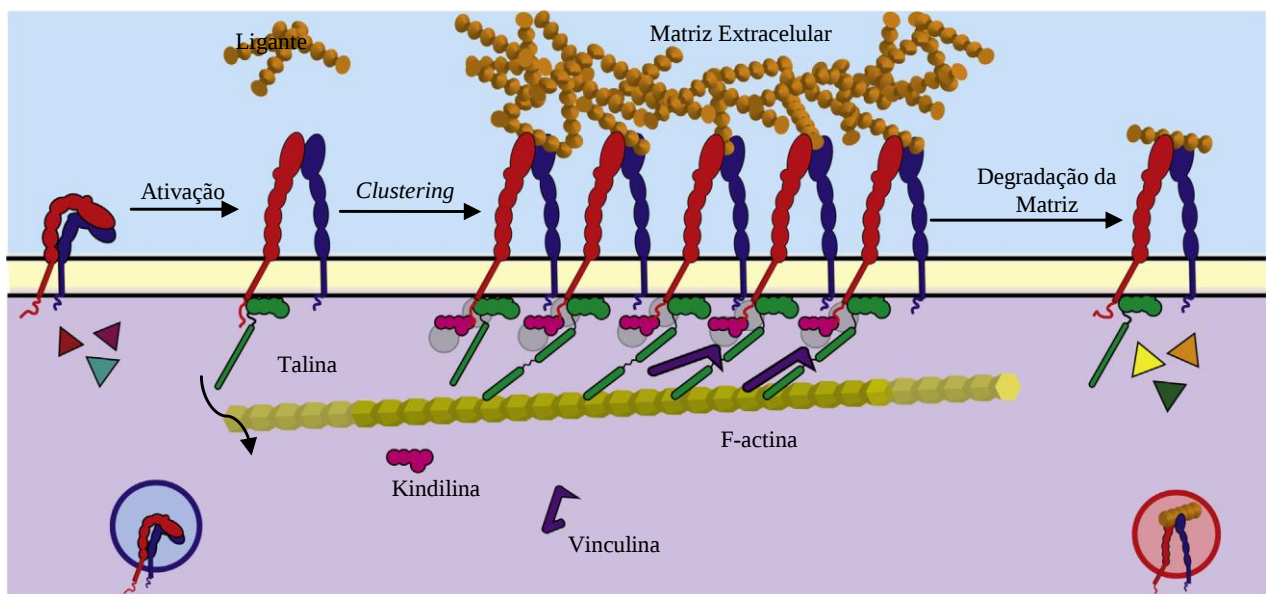
As principais proteínas de matriz extracelular reconhecidas por integrinas incluem a fibronectina (FN), a qual é reconhecida pela integrina $\alpha 5\beta 1$, o colágeno, que é reconhecido pela integrina $\alpha 2\beta 1$, a laminina, reconhecida pela integrina $\alpha 6\beta 4$ e a vitronectina, reconhecida pela integrina $\alpha v\beta 3$. Além disso, integrinas como $\alpha v\beta 3$ e principalmente $\alpha 9\beta 1$ são capazes de se ligar a proteína matricelular tenascin-C (Friedl e Wolf, 2003, Seguin *et al.* 2015).

A ativação das integrinas é o processo pelo qual seus heterodímeros sofrem alterações conformacionais para aumentar a afinidade do ectodomínio com o ligante extracelular. A natureza deste rearranjo parece controversa e pode variar entre os heterodímeros (Xiong *et al.*, 2009). No entanto, a maioria dos estudos concorda que a ativação envolve a separação das subunidades α e β (Lau *et al.* 2009; Zhu *et al.* 2009; Yang *et al.* 2009 e Kim *et al.* 2012) desencadeada pela ligação da proteína talina a cauda citoplasmática da subunidade β (Calderwood *et al.* 2013; Anthis *et al.* 2009).

Embora a talina seja apontada como o ativador-chave para a maioria das integrinas, proteínas adicionais podem contribuir positivamente ou negativamente para ativação de

integrinas (Morse *et al.* 2014). Entre outros ativadores, a família das kindilinas (kindilina-1, kindilina-2 e kindilina- 3) recebem maior atenção (Calderwood *et al.* 2013; Ye *et al.* 2014) . Estudos com *knockout*, *knockdown*, mutagênese e mutações de doenças humanas confirmaram que as kindilinas desempenham papéis importantes na facilitação da adesão mediada por integrinas. Estudos bioquímicos indicam que kindilinas cooperaram com talina (Calderwood *et al.* 2013; Ye *et al.* 2014), no entanto seus mecanismos de ação são menos compreendidos e tem sido sugerido que as kindilinas promovem o *clustering* (Ye *et al.* 2013) e o tráfego de integrinas (Margadant *et al.* 2012; Bottcher *et al.* 2012).

Figura 5- Principais mecanismos que regulam a adesão celular mediada por integrina



Legenda: A ligação da talina ativa conformacionalmente a integrina para aumentar sua afinidade com o ligante extracelular e promove o *clustering* de integrinas com aderência de alta afeidez à matriz extracelular. A talina liga-se aos filamentos de actina para promover interações com o citoesqueleto reforçando a adesão, junto com outras proteínas adaptadoras de adesão. As integrinas podem ser internalizadas tanto na sua forma ativa ou inativa por endocitose .

Fonte: Adaptado de Iwamoto e Calderwood, 2015.

Sinalização Celular no Controle da Angiogênese

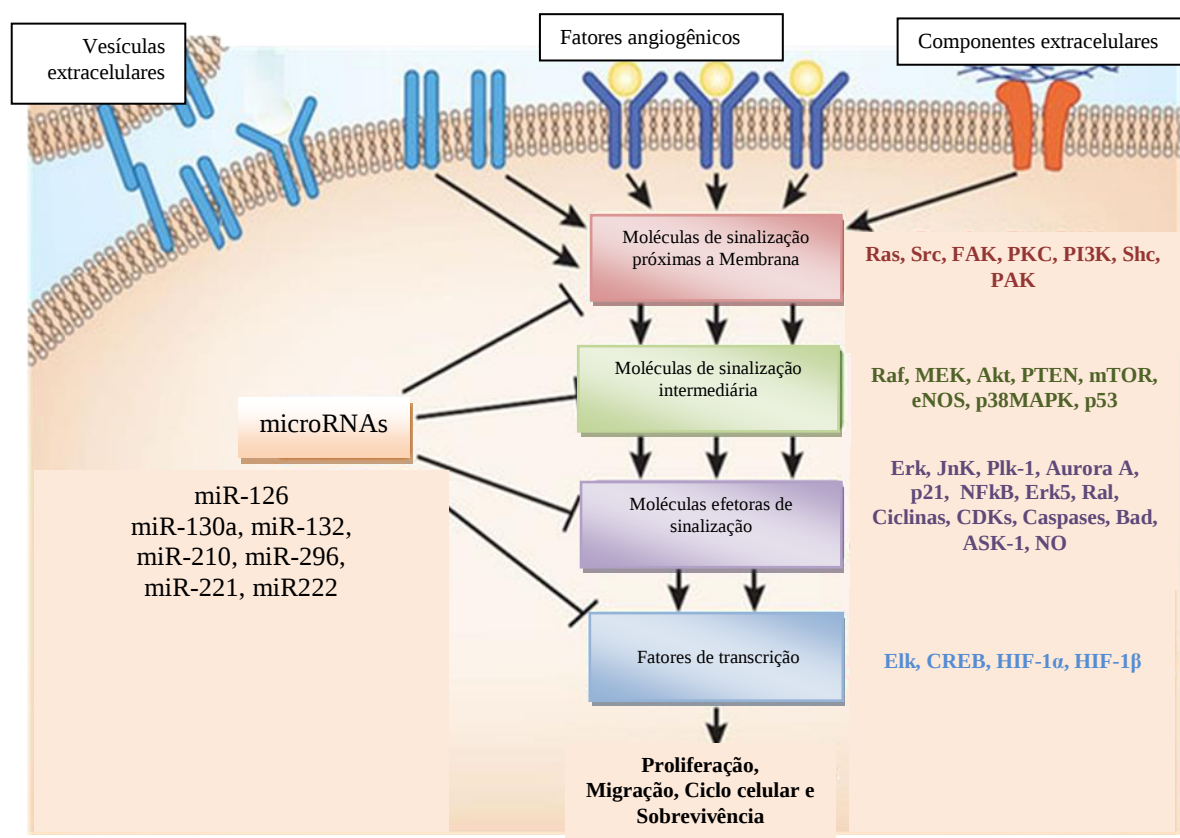
A angiogênese é um processo fisiológico, muito bem regulado, que leva à formação de novos vasos e desestabilização dos vasos pré-existentes (Carmeliet e Jain, 2011). Durante a angiogênese, as células endoteliais recebem múltiplas informações do seu microambiente, que as levam eventualmente a ingressar no processo de diferenciação celular para formação de vasos. Sinais angiogênicos promovem a proliferação, migração, resistência a apoptose como também 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 (Senger *et al.* 2011). Falhas nesta regulação estão envolvidas em vários processos patológicos que podem ser caracterizados por uma angiogênese irregular (Carmeliet e Jain, 2011; Katoh, 2013; Gai *et al.* 2015).

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. Outros mediadores solúveis como as metaloproteases de matriz (MMPs) estão implicadas no remodelamento da MEC como também em vias de sinalização que levam a regulação da migração e proliferação das células endoteliais (Gai *et al.* 2015).

Além disso, a interação destas células endoteliais com a MEC através integrinas é extremamente importante para a eficiente ativação de vias de sinalização como a da MAPK, ERK1/ERK2 (Giancotti e Ruoslahti 1999; Mettouchi 2012) (Figura 4). A interação MEC-integrina é crucial para o estabelecimento da polaridade da célula endotelial, formação de vacúolo intracelular e coalescência, que também estão envolvidos na formação de lúmen (Zovein *et al.* 2010; Davis *et al.* 2003; Iruela-Arispe *et al.* 2009).

Recentemente, foi observado a contribuição de vesículas extracelulares (VEs) secretadas por diferentes tipos celulares na angiogênese. Estas vesículas podem induzir alterações epigenéticas nas células endoteliais, fornecendo os lípidos biologicamente ativos como também proteínas/receptores celulares. Além disso, podem transportar RNA extracelular capaz de modificar o fenótipo e função das células receptoras (Camussi *et al.* 2015; Gai *et al.* 2015).

Figura 6 – Integração de vias de sinalização envolvidas na angiogênese



Legenda: Vias de sinalização mediadas por fatores angiogênicos, microvesículas e interação célula- MEC
 Fonte: Adaptado de Rüegg e Mariotti, 2003.

Sinalização dependente de Proteínas Quinase C (PKC)

As células contêm inúmeras vias de transdução de sinal que respondem a sinais extracelulares (ligantes) para regular ou modular a expressão de genes. Os sinais extracelulares ligam-se ao domínio extracelular de receptores, ativando-os. Estes receptores ativados são capazes de alterar a quantidade ou distribuição intracelular de mensageiros secundários. Nestas vias intracelulares de transdução de sinal, a fosforilação de resíduos de serina (Ser), treonina (Thr) e tirosina (Tyr) de proteína quinases é um dos processos mais versáteis do crescimento celular e funcionam por meio da ativação de proteínas-alvo (Kang *et al.* 2012)

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 7**). No Grupo 1, as isoenzimas "clássicas" (cPKCs) incluem as PKCs α , β I, β II, e γ 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 δ , ϵ , η , e θ que também são ativadas por DAG porém são independentes de cálcio. E constituindo o Grupo 3 estão as PKCs "atípicas" (aPKCs), compostas por ζ e λ/ι são insensíveis a PMA/DAG e independentes de cálcio, podem ser ativadas por diferentes lipídeos como, por exemplo, a ceramida (Wray *et al.* 2008; Carmo, *et al.* 2013).

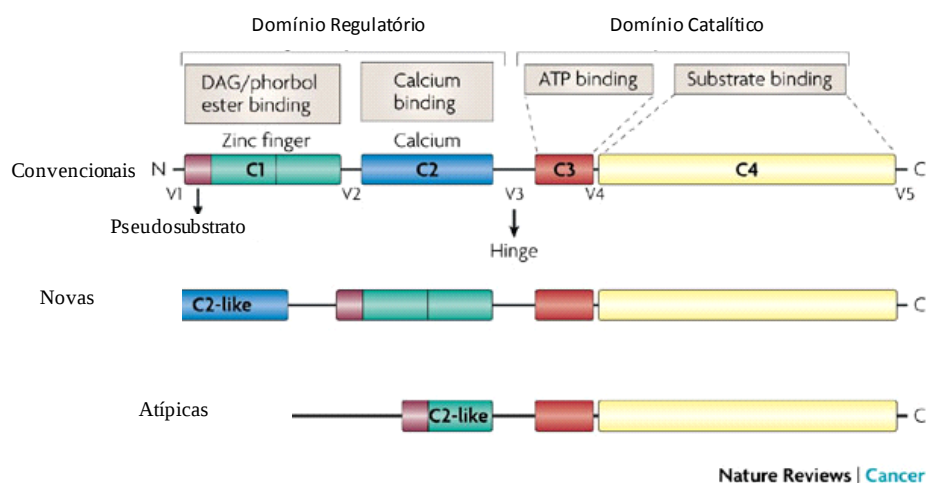
O domínio regulatório da PKC contém dois módulos conservados; o domínio C1 e o C2, eles podem se ligar a diferentes ativadores (Ono *et al.* 1989). O domínio C1 possui uma região semelhante ao substrato de PKC que atua como um pseudosubstrato, de caráter regulatório (Soderling, 1990). Nesta região também estão os domínios semelhantes a *zinc finger*, que são importantes para ligação a DAG e PMA (Nishizuka, 1995; Pan e Coleman, 1990; Bell e 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 e Snaar-Jagalska, 1999; Shirai e Saito, 2002).

O domínio catalítico fica na posição C-terminal e é composto pelo 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 e Gordon, 1998; Khaner e 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 e Kazanietz, 1999), secreção (Sonnenburg *et al.* 2001).

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 e colaboradores (2002) demonstraram, através do uso de um oligonucleotídeo antisense específico para PKC α , que a inibição da PKC α 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 α , em células endoteliais, estimula a produção de VEGF, aumentando a formação de estruturas tubulares *in vitro* por uma via autócrina.

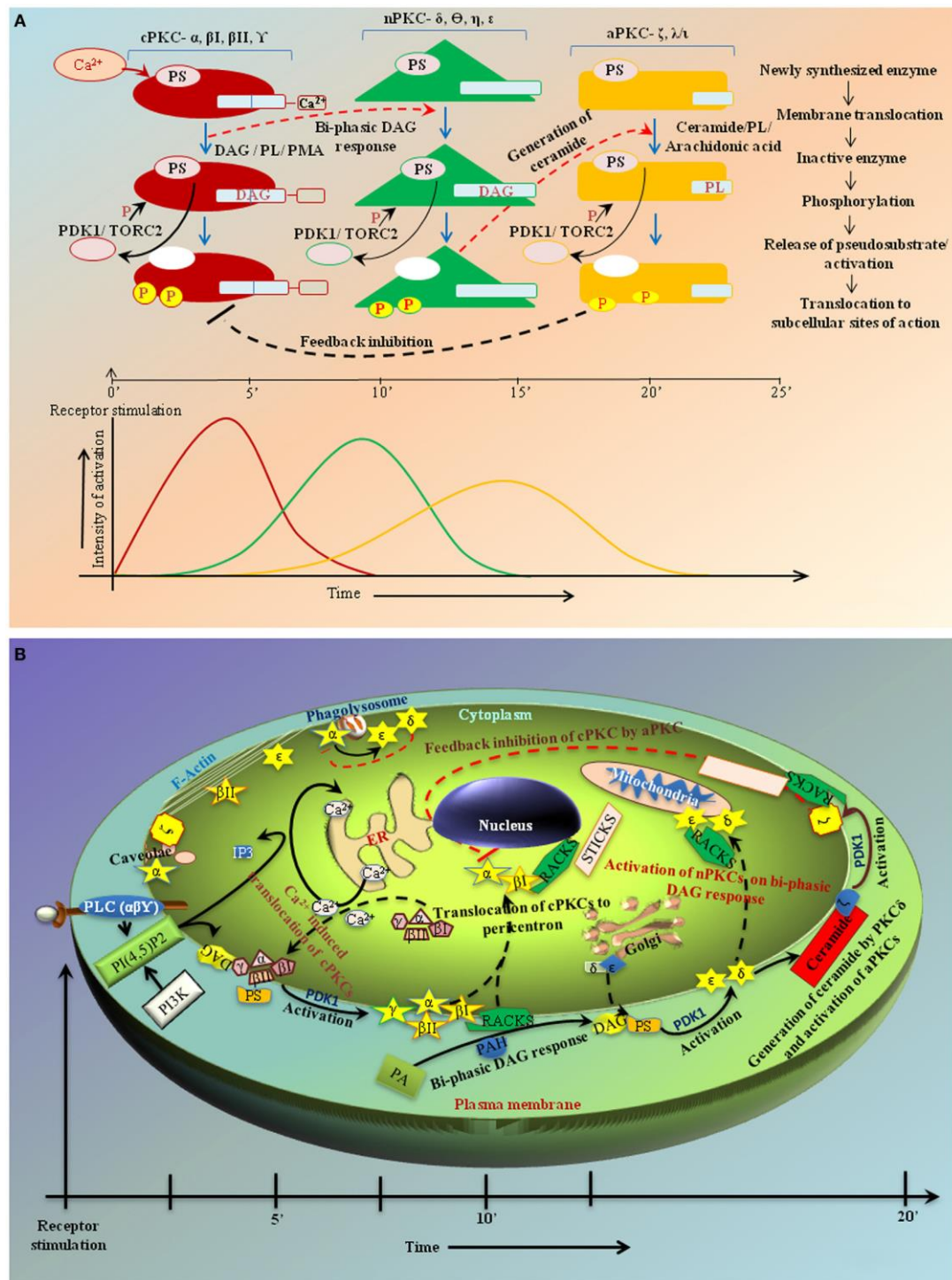
Figura 7 - Representação esquemática das estruturas e da classificação das isoformas de PKC



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 e Twelves, 2007.

Figura 8 - Esquema proposto para ativação das diferentes isoformas de PKC



Legenda: (A) Ativação das diferentes isoformas de PKC em resposta ao acoplamento do ligante ao receptor.

(B) Cinética de ativação e distribuição subcelular das isoformas de PKC

Fonte: Arkajyoti Mukherjee *et al.* 2016.

Sinalização dependente de VEGF

Diversas vias de sinalização controlam o comportamento das células endoteliais durante o *sprouting* angiogênico, incluindo TIE2 e a sinalização Notch. No entanto, a secreção de fator de crescimento endotelial vascular-A (VEGF-A), também conhecido como fator de permeabilidade vascular (VPF) é o principal regulador da formação de novos vasos sanguíneos durante o desenvolvimento, crescimento e patologias (Shane e Stainier, 2011).

O VEGF-A é o membro mais bem caracterizado de uma família de glicoproteínas homodiméricas, que inclui fator de crescimento placentário (PIGF), VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D. Durante a angiogênese, VEGF-A se liga ao receptor VEGFR2, também conhecido como KDR e Flk1, e ativa múltiplas vias de sinalização através de intermediários, tais como proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), fosfatidilinositol 3-quinases (PI3Ks), AKT, e fosfolipase C γ e small GTPases. Como resultado, a sinalização de VEGF promove a proliferação das células endoteliais, extensão de filopódios, a degradação da matriz extracelular e quimiotaxia (Lohela *et al.* 2009).

A expressão de VEGF-A é regulada principalmente por hipoxia, assim, a angiogênese é iniciada rapidamente em resposta à deficiência de oxigênio nos tecidos durante desenvolvimento, crescimento e situações patológicas. Consequentemente, ratos heterozigotos VEGF-A + / - manifestam graves defeitos vasculares e morrem por haploinsuficiência. Da mesma forma, letalidade embrionária e rede vascular deficiente são observados em ratos *knockout* para VEGFR2 (Koch e Claesson-Welsh, 2012; Shalaby *et al.* 1995). O *splicing* alternativo do transcrito VEGF-A dá origem a um número de variantes da proteína que têm diferentes funções e biodisponibilidade durante a morfogênese dos vasos sanguíneos (Koch e Claesson-Welsh, 2012). Por exemplo, a isoforma ligante de heparan-sulfato, VEGF-A 165 (VEGF-A 164 em ratos) é associada à matriz extracelular e forma gradientes que promovem a extensão de filopodia, a migração direcional de células endoteliais e a ramificação de vasos sanguíneos. Em contraste, VEGF-A 121 (VEGF-A 120 em ratos) é incapaz de se ligar a heparan-sulfato, influencia na proliferação das células endoteliais, mas não na migração (Ruhrberg *et al.* 2002). Além disso, variantes de VEGF-A com alteração na região carboxi-terminal possuem habilidades muito reduzidas de ativar VEGFR2. Assim, a regulação espacial da produção de diferentes isoformas de VEGF-A é um ponto-chave de controle durante a morfogênese dos vasos sanguíneos (Kawamura *et al.* 2008).

Além do VEGFR2, o VEGF-A se liga ao receptor VEGFR1 (codificada pelo FLT1), que tem uma maior afinidade para VEGF-A que do que o VEGFR2, mas possui fraca atividade tirosina quinase. Assim, o VEGFR1 é considerado um “receptor-isca” que neutraliza a sinalização pró-angiogênica. Além disso, o processamento alternativo de VEGFR1 gera uma isoforma secretada e cataliticamente inativa, o VEGFR1 solúvel (sVEGFR1) que atua como um dissipador de VEGF-A livre (Shane e Stainier, 2012). Outros membros da família do VEGF, tais como PlGF e VEGF-B, ligam-se seletivamente ao VEGFR1, no entanto, seu papel funcional durante o desenvolvimento vascular não é claro. (Shane e Stainier, 2012).

O VEGF-C é outro fator determinante emergente de desenvolvimento vascular. O seu receptor, VEGFR3 (codificado por FLT4) é uma peça-chave bem conhecida que participa da linfangiogenese (Nilsson I, *et al.* 2010). No entanto, a sinalização VEGFR3 também regula positivamente angiogênese. Em particular, o VEGFR3 é altamente expresso nas *tip cells* e é necessário para o *sprouting* das células endoteliais em camundongos e peixe-zebra. (Tammela, *et al.* 2008) Além disso, evidências recentes indicam que o VEGF-C promove a montagem de heterodímeros de VEGFR2-VEGFR3 que são enriquecidos em *tip cells* e influenciam positivamente o *sprouting* angiogênico. Assim, a correta expressão espaço-temporal do VEGFR3 é um importante determinante da função das *tip cells* (Tammela *et al.* 2008; Siekmann e Lawson, 2007; Nilsson, *et al.* 2010)

Sinalização Notch-Dll4: modulação dos fenótipos endoteliais líder (*tip cell*) e da haste (*stalk cell*)

A angiogênese requer o desenvolvimento de forma hierárquica da rede vascular submetida à expansão radial e anastomose para formar um circuito fechado. A ramificação vascular é alcançada por um coordenado comportamento das células endoteliais que se tornam células líderes (*tip cells*) e células que compõem a haste (*stalk cells*). Tal organização está sob o controle da sinalização Dll4-Notch, que estabelece uma hierarquia na receptividade das células para o VEGF-A (Mettouchi, 2012).

O estabelecimento de um padrão ramificado requer a especialização funcional das células endoteliais em "*tip*" e "*stalk*", em resposta ao VEGF-A (Gerhardt, *et al.* 2003). Estas populações de células são caracterizadas por apresentarem distintos fenótipos, posições diferentes no broto nascente e uma capacidade de resposta hierárquica ao VEGF-A. As

células *tip* distinguem-se por várias características: (1) a sua posição de liderança no novo ramo vascular; (2) uma maior capacidade de resposta ao VEGF-A, devido a uma maior expressão de VEGFR2; (3) um fenótipo altamente móvel e (4) formação de numerosos filopódios que detectam a composição ambiental a fim de orientar o crescimento do vaso em direção ao VEGF-A e outras pistas atraentes (Mettouchi, 2012). As células *stalk*, células que seguem as células líderes, têm uma capacidade proliferativa mais elevada e, portanto, constituem os elementos de construção do ramo vascular. Eles contribuem para o alongamento sustentado do ramo e o estabelecimento do lúmen. (Iruela-Arispe *et al.* 2009 ; Gerhardt *et al.* 2003).

Os fenótipos *tip* e *stalk* não são situações permanentes, mas estados bastante dinâmicos. De fato, as células de ponta e do broto competem constantemente umas com as outras pela posição de liderança de acordo com a sua sensibilidade para o VEGF-A (Jakobsson *et al.* 2010; Arima *et al.* 2011). A adequada relação entre o número de células *tip* e *stalk* em conjunto com um balanço regulado entre a proliferação de células *stalk* e a migração de células *tip* são necessárias para formar o nível adequado de complexidade da rede vascular (Mettouchi, 2012). A especificação das células endoteliais em *tip* ou *stalk* está sob o controle de vias de sinalização intrinsecamente interligadas como as vias VEGF- A e Dll4 - Notch. O envolvimento dessas vias tem sido firmemente estabelecido em diferentes contextos, como em estudos da angiogênese tumoral, angiogênese pós-isquemia e desenvolvimento da angiogênese em peixe-zebra e retina de camundongos (Al Haj Zen A. *et al.*, 2010)

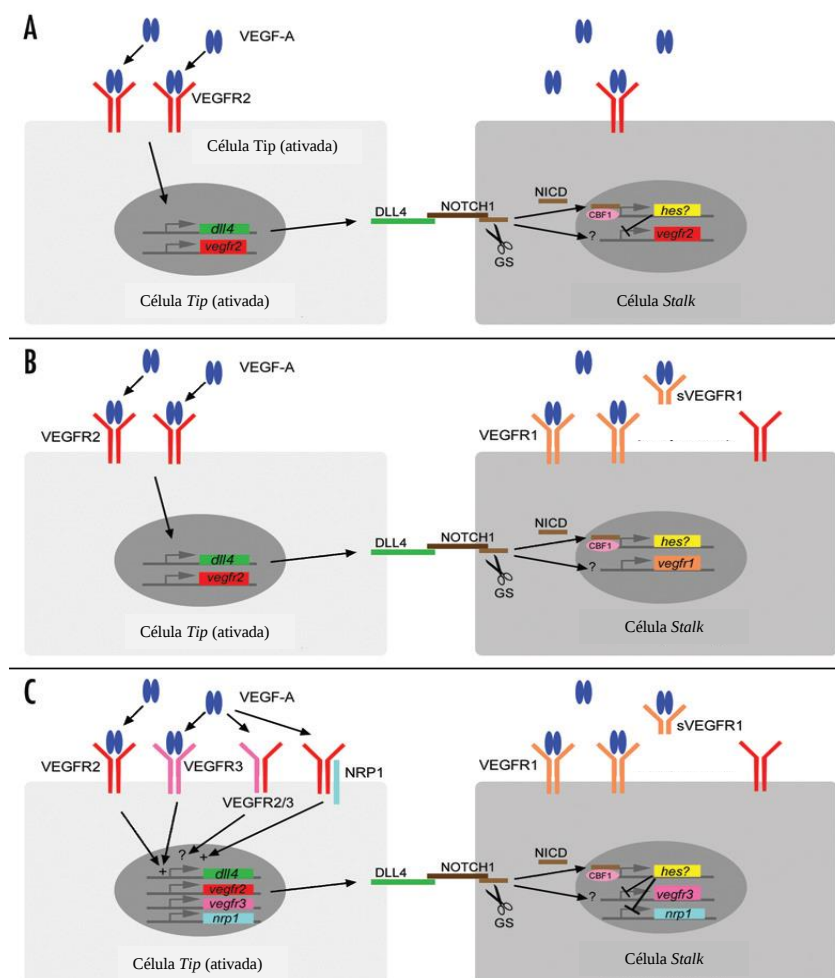
A via Notch envolve a interação entre o ligante *Jagged* ou Dll4 e o receptor Notch da célula adjacente (Kopan *et al.* 2009; Phng e Gerhardt, 2009). O VEGF-A estimula o destino *tip* das células, enquanto Notch restringe esse destino por um mecanismo de inibição lateral que leva as células em direção a um comportamento *stalk*. O VEGF-A presente como um gradiente angiogênico no tecido, se liga aos receptores de VEGFR2 na superfície de células endoteliais.

A sinalização do VEGFR2 aumenta expressão de Dll4, disparando sua máxima expressão na frente vascular, em células *tip* (Lobov *et al.* 2007; Suchting *et al.* 2007). Uma vez exposto na superfície da célula, o Dll4 se ligará ao receptor Notch expresso pelas células adjacentes e provocará a sua ativação. A ativação da Notch envolve o processamento proteolítico do seu domínio intracelular, que transloca para o núcleo e controla a expressão de genes alvo (Kopan *et al.* 2009; Phng e Gerhardt, 2009). Este controle transcricional regula o nível de expressão dos receptores de VEGF e consequentemente a capacidade de resposta ao fator VEGF-A. Desta forma, a ativação de Notch leva a uma diminuição da expressão de

VEGFR2 e de Dll4 (Suchting *et al.* 2007; Williams *et.al.* 2006) como também o aumento dos níveis de VEGFR1 (Suchting *et al.* 2007; Harrington *et al.* 2008; Funahashi *et al.* 2010).

O VEGF-A se liga com alta afinidade ao receptor VEGFR1 que possui atividade de sinalização deficiente e, portanto, antagoniza a sinalização do VEGFR2. Essa configuração permite o estabelecimento de uma hierarquia em resposta ao VEGF-A entre as células endoteliais *tip*, que expressam Dll4 e níveis mais elevados de VEGFR2 sendo, portanto altamente sensível ao VEGF-A e as células stalk, que expressam baixos níveis de Dll4 e abrigam pobres atributos de resposta ao VEGF-A. A perda de expressão Dll4 ou da atividade Notch leva a uma improdutiva angiogênese caracterizada pelo desenvolvimento anárquico da rede vascular, que apresenta brotamento ectópico e falta de um lúmen funcional (Noguera-Troise *et al.* 2006; Siekmann e Lawson 2007; Mettouchi, 2012)

Figura 9 - Via de sinalização Notch –Dll4 d VEGF na seleção de células tip



Legenda: Mecanismos de seleção de células tip pela modulação de diferentes componentes da via de sinalização do VEGF e Notch-Dll4

Fonte: Mats Hellström *et al.* 2007.

Sinalização dependente de FGF

Fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) e seus receptores tirosina quinase (FGFRs) compreendem a mais diversificada família de sinalização de fatores de crescimento. Em camundongos e seres humanos, 22 ligantes FGF e quatro receptores tirosina-quinase de elevada afinidade foram identificados. Suas atividades biológicas abrangem vários aspectos do desenvolvimento embrionário e patologias (Murakami, 2008; Antoine *et al.* 2005)

FGFs são mitógenos de largo espectro e estimulam uma ampla gama de funções celulares, incluindo a migração, proliferação, diferenciação e sobrevivência. Embora seja relatado que as células endoteliais da veia umbilical humanas expressam FGF-1, -2, -5, -7, -8, -11, -12, -16 e -18 *in vitro*, a diferença funcional entre estes fatores de crescimento ainda não está muito bem esclarecida. FGFs são produzidos por diversos tipos celulares e as células endoteliais são um dos principais alvos dos FGFs (FGF-1, -2, -4 e -5) que apresentam atividades angiogênicas *in vivo* (Antoine *et al.* 2005; Corti *et al.* 2013).

Existem quatro receptores de alta afinidade conhecidos para FGF: FGFR1 - FGFR4, que são proteínas transmembrana, contendo dois ou três domínios extracelulares imunoglobulina (Ig), uma região de caráter ácido, uma região de ligação à heparina, um domínio transmembranar e um domínio intracelular tirosina (Eswarakumar 2005). O processamento alternativo gera múltiplas isoformas de FGFRs. De particular importância é o processamento da metade carboxi-terminal do domínio III- Ig, o qual produz as isoformas IIIb e IIIc e determina a especificidade de ligação para FGFs diferente. Este evento de processamento alternativo é regulado de maneira tecido específico. Em células endoteliais, FGFR é predominante FGFR1IIIc. No entanto, a expressão do FGFR2IIIc, R3IIIc e R4 também já foram descritas com uma observação *in vitro* (Nourse *et al.* 2007; Corti *et al.* 2013).

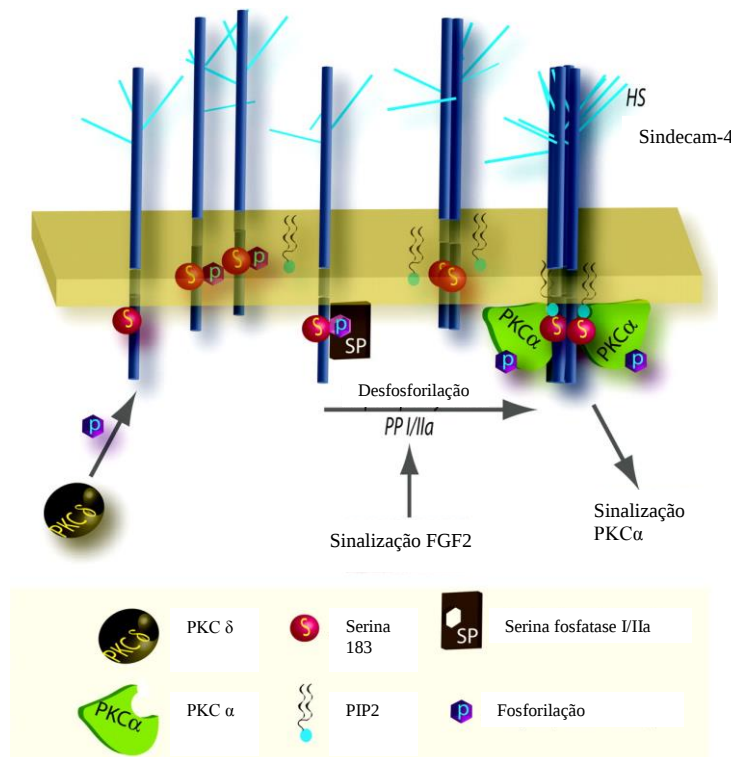
Os sindecans, membros de uma família de quatro proteoglicanos de heparan-sulfato (HSPGs), compreendem uma classe distinta de receptores não-tirosina quinase para o FGF. Esses proteoglicanos foram originalmente identificados como co-receptores para os receptores FGFRs, e uma riqueza de evidências apoia a noção de que os sindecans facilitam a formação do complexo de sinalização FGF - FGFR. Para começar, o sindecán-4 aumenta significativamente a afinidade de FGF2 ao FGFR1 tanto em ensaio celulares como ensaios de interação livres de células (Murakami *et al.* 2008)

Após a formação dos *clusters* de sindecán-4, a proteína Rac1 é ativada, as células endoteliais então formam protrusões na membrana, e posteriormente, são submetidas a

migração direcional (Tkachenko *et al.* 2005; Kovacevic *et al.* 2012). Estudos recentes sugerem que em um estado *unclustered* do sindecan-4 suprime a ativação de Rac1 e a migração celular, provavelmente via sinectina (Tkachenko *et al.* 2006; Chittenden *et al.* 2006). Ratos *knockout* para sinectina estão associados com um coração de tamanho menor tamanho e com a redução do volume e da complexidade da vascularização arterial que podem ser reflexo da função anormal de Rac1 (Chittenden *et al.*, 2006).

Outro evento importante de sinalização controlado pelo sindecan-4 é a ativação da proteína quinase α (PKC α). Esta ativação presumivelmente ocorre após a ligação direta da PKC α a cauda citoplasmática do sindecan-4 e requer a ligação de PIP2 (Keum *et al.* 2004). Em circunstâncias normais, o sindecan-4 é fosforilado (Ser183) pela PKC δ . A exposição ao FGF2 leva a desfosforilação deste sítio que, por sua vez, permite a oligomerização do sindecan-4, a ligação de PIP2, e ativação de PKC α . As consequências desta ativação de PKC α em células endoteliais incluem o aumento da atividade angiogênica e ativação de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Tkachenko *et al.*, 2005; Murakami *et al.* 2008).

Figura 10 - Modulação da atividade da PKC α dependente de Sindecan-4



Legenda: Sob normais circunstâncias, o sítio ser 183 é fosforilado pela PKC δ . Entretanto a exposição ao FGF2, resulta na desfosforilação deste sítio e permite a oligomerização do sindecan-4, ligação do PIP2 e ativação de PKC α .

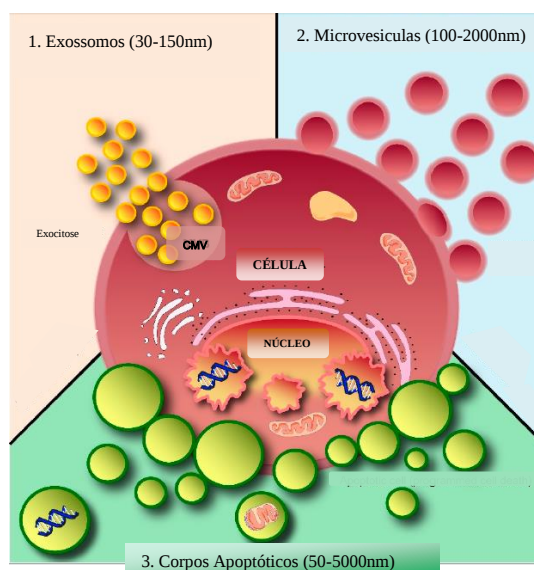
Fonte: Adaptado de Tkachenko *et al.* 2005

Sinalização por Microvesículas

Vesículas extracelulares (VEs) são fragmentos celulares liberados por células normais ou tumorais, viáveis ou danificadas, quando submetidas a estados de ativação celular, os quais incluem crescimento e proliferação celulares, ou ainda, ao processo de morte celular por apoptose (Freyssinet, 2003).

Este grupo de vesículas inclui: (i) exossomos, que são liberadas a partir da fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática, possuem entre 30 e 150nm de diâmetro; (ii) microvesículas, que se formam a partir do desprendimento de protrusões que surgem na superfície da célula, possuem um diâmetro entre 100 e 2000 nm e, são encontradas na literatura com diferentes nomes, por exemplo, microvesículas derivadas de plaquetas ativadas são atualmente mais conhecidas como “micropartículas”, enquanto aquelas liberadas por leucócitos polimorfonucleares ativados são freqüentemente chamadas de “ectossomos”; (iii) corpos apoptóticos são liberados mediante a fragmentação de células em apoptose, possuem aparência mais heterogênea, com diâmetro variando entre 50 e 5000nm (Vader *et al.* 2014; Hina *et al.* 2016).

Figura 11 - Representação esquemática dos subtipos de vesículas extracelulares



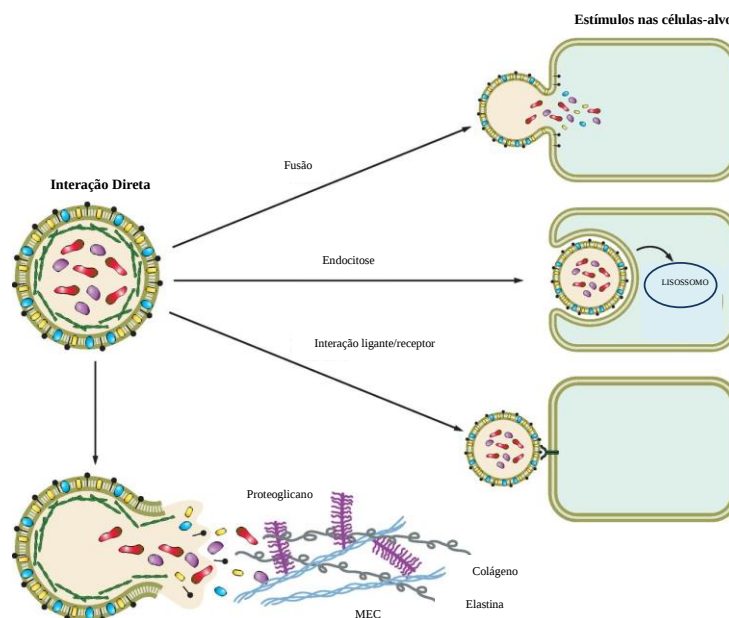
Legenda: Os exossomos são formados a partir do brotamento da membrana de endossomos formando os corpos multivesiculares e são liberados pela fusão com a membrana plasmática. Microvesículas são formadas através de brotamento direto da membrana plasmática. Os corpos apoptóticos, que se formam por vesiculação da membrana plasmática de células em apoptose, são heterogêneos e podem conter fragmentos nucleares e de organelas citoplasmáticas.

Fonte: Adaptado de Hina *et al.* 2016.

A liberação de vesículas extracelulares pode ocorrer por diversos tipos de estímulos, porém todos levam ao aumento nas concentrações de cálcio intracelular (Raposo e Stoorvogel, 2013). Os mecanismos envolvidos na liberação de microvesículas a partir da membrana plasmática ou da mobilização de corpos multivesiculares para a periferia da célula, sua ancoragem e fusão com a superfície da célula ainda são pouco compreendidos. No entanto, já está descrito que estes processos requerem a associação do citoesqueleto (actina e microtúbulos) com motores moleculares (miosinas e cinesinas), *small* GTPases e com a maquinaria de fusão celular (SNAREs) (Cai *et al.* 2007; Savina *et al.* 2002).

Entretanto, a função destas vesículas extracelulares na comunicação celular requer também a capacidade de interagir com células-alvo, provavelmente através de moléculas de adesão presentes nas VEs, para entregar seu conteúdo. Após sua ligação às células receptoras, as VEs podem permanecer estavelmente associada com a membrana plasmática ou dissociar-se; fundir diretamente com a membrana ou ser internalizada através de distintas vias de endocíticas (Figura12). Quando endocitadas, as VEs podem subsequentemente se fundir à membrana endossomal ou ser direcionadas para degradação nos lisossomos.

Figura 12 - Mecanismos de transferência do conteúdo das VEs



Legenda: As VEs podem ativar a sinalização celular através de interações físicas entre ligante /receptor ou através da fusão com as células alvo. Eles podem também ser sujeita a endocitose ou liberar o seu conteúdo para o espaço extracelular.

Fonte: Adaptado de Turturici *et al.* 2014.

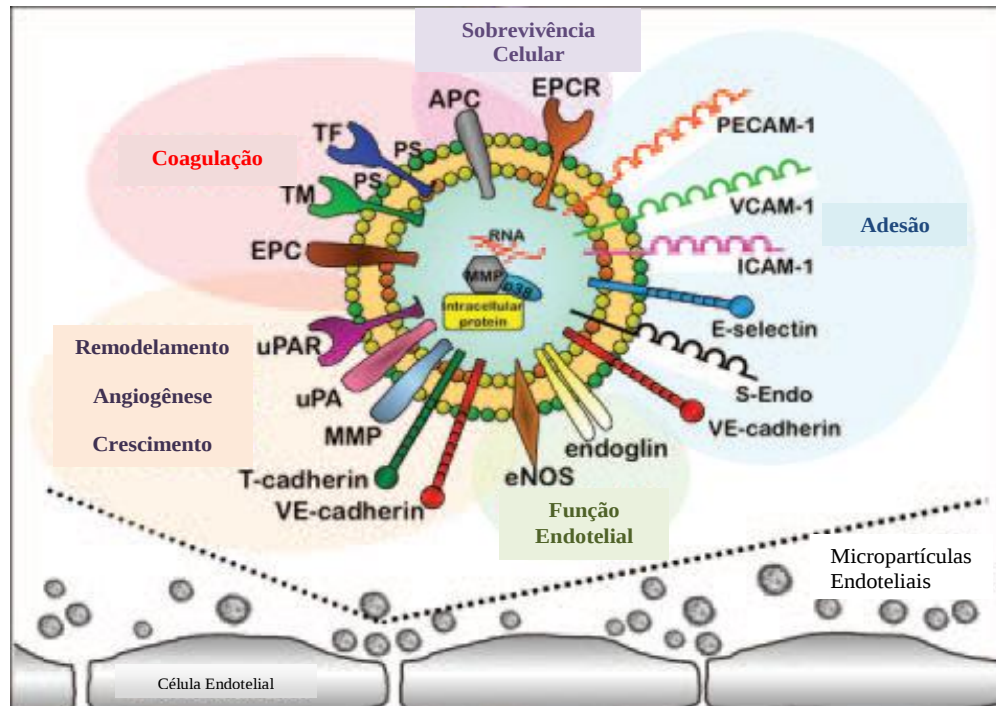
As VEs desempenham um papel importante na comunicação célula-célula tanto em processos fisiológicos como patológicos ao liberarem moléculas de sinalização biologicamente ativas. De fato, estas vesículas podem conter proteínas citoplasmáticas, ácidos nucleicos, receptores de superfície celular e proteínas que interagem com os *rafts* lipídicos (Lötvall *et al.* 2014). Estudos recentes demonstraram a importante participação das vesículas extracelulares na comunicação celular durante o desenvolvimento, bem como na resposta inflamatória e no crescimento tumoral (Virgintino *et al.* 2012).

Como já mencionado anteriormente, a angiogênese é essencial para a sobrevivência das células tumorais e, o crescimento descontrolado da massa tumoral leva a uma redução do nível de oxigênio no microambiente circundante. A hipoxia tumoral desempenha um papel importante na estimulação da formação de novos vasos e na liberação de vesículas que irão ajudar a sustentar a vascularização do tumor (Wysoczynski e Ratajczak, 2009; Park *et al.* 2010). Esta hipótese é suportada pela observação de que Rab22a, uma GTPase que controla o *shedding* das vesículas a partir da membrana plasmática, é regulado por fatores de indução de hipoxia (HIFs). Além disso, a superexpressão desta proteína aumenta a formação de metástases, enquanto o seu silenciamento prejudica a disseminação do tumor (Wang *et al.* 2014).

Estudos "*in vitro*" e "*in vivo*" demonstraram que as microvesículas derivadas de células tumorais e de plaquetas podem participar de eventos angiogênicos pela transferência de um conjunto de fatores pró-angiogênicos como fatores de crescimento (VEGF, bFGF, PDGF), receptores de quimiocinas (CCR5, CXCR4), e metaloproteases de matriz (MMP2, MMP9) tendo como alvo as células endoteliais e/ou células progenitoras endoteliais (EPCs) contribuindo para regular o reparo vascular, o *sprouting* angiogênico, e a invasão tumoral (Boulanger e Tedgui, 2005; Mause, *et. al* 2010).

O desprendimento de VEs de células tumorais está positivamente correlacionado com a malignidade do tumor e indução da migração de células endoteliais *in vitro* e *in vivo* (Kim *et al.* 2002). As células endoteliais podem também liberar VEs que contribuem, em conjunto com outros estímulos, para a atividade angiogênica e crescimento de microvasos. Sob estímulos de VEGF e bFGF, as HUVECs liberam microvesículas contendo MMP/TIMP que estão possivelmente envolvidas no controle autócrino do crescimento vascular (Taraboletti *et al.* 2002).

Figura 13 - Representação esquemática do painel de moléculas que podem ser transportadas pelas VEs e os efeitos biológicos



Legenda: Vesículas extracelulares podem conter diferentes moléculas de sinalização celular.

Fonte: Dignat-George e Boulanger, 2011.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel da MEC de glioma, rica em TN-C, na morfogênese vascular subfuncional característica destes tumores, com ênfase na sinalização celular que resulta no defeito da tubulogênese, bem como a participação das células apoptóticas neste processo.

1.2 Objetivos Específicos

- a) Investigar a expressão diferencial e a regulação de receptores de adesão de células endoteliais incubadas sobre as diferentes matrizes imobilizadas, livres de células, com ênfase em integrinas e no proteoglicano sindecan-4;
- b) Investigar o papel da sinalização através do eixo $FGFR1 \leftrightarrow$ sindecan-4, bem como de receptores de VEGF, na diferenciação angiogênica modulada por matrizes de astrocitoma;
- c) Aprofundar os estudos sobre o papel da $PKC\alpha$ e sua regulação, nos efeitos da matriz extracelular de astrocitoma na capacidade tubulogênica de células endoteliais.
- d) Estudar o possível papel da MEC de astrocitoma, ricas em TN-C, na seleção de subpopulações endoteliais compatíveis com o fenótipo de células líderes;
- e) Investigar o papel das vesículas extracelulares secretadas pelas células endoteliais semeadas sobre as diferentes matrizes imobilizadas, livres de células, na migração e na tubulogênese.
- f) Executar o sequenciamento transcricional global (análise transcriptômica) de células endoteliais pré-incubadas com diferentes matrizes, de forma a gerar subsídios para compreensão dos mecanismos celulares envolvidos na regulação da diferenciação tubulogênica por matrizes tumorais.

2 METODOLOGIA

2.1 Cultura de células endoteliais da veia umbilical humana

As células endoteliais primárias foram obtidas pelo tratamento de veias de cordões umbilicais humanos, 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 0,111M, estéril e utilizados em até, no máximo, 24 horas após o parto. As células foram descoladas da parede da veia com a adição de collagenase 0,1% (collagenase tipo IV, Sigma-Aldrich, São Paulo), 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 26mM, fungizona 2,5µg/mL, penicilina 500 U/ mL e gentamicina 40µg/mL (M199 completo). A suspensão celular foi submetida a uma centrifugação a 180×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 25 cm² de área previamente recoberta com gelatina (Sigma-Aldrich) 1% estéril. As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida de CO₂ 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, NaHPO₄ 9 mM, 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. Exceto quando especificamente ressaltado, todos os insumos básicos para cultivo celular foram adquiridos na Life Technologies/Invitrogen do Brasil (São Paulo). Em todos os procedimentos de rotina ou experimentais, as culturas de células foram monitoradas em um microscópio invertido CKX41 (Olympus, Japão), equipado com câmera de captura digital QImaging Co. (Surrey, BC, Canadá) e o software Image-Pro Express 6.0 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).

2.2 Cultivo das linhagens celulares

Neste trabalho foram utilizados a linhagem de astrocitoma humano U-373 MG (descrito como astrocitoma grau III *in vitro* e de grau IV *in vivo*, ou GBM – ATCC, EUA), além de astrócitos humanos isolados e cultivados pela equipe do Prof. Vivaldo Moura Neto (Laboratório de Morfogênese Celular, Departamento de Anatomia – ICB/UFRJ, CONEP 073/2007), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As células foram crescidas 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 (DMEN-F12 completo), mantidas em atmosfera úmida de CO₂ 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

A linhagem U-373 MG originárias da ATCC (*American Type Culture Collection*), os astrócitos humanos e as células endoteliais primárias foram cultivadas em estado confluência por 48 horas, em condições normais de cultura e então lavadas em M199 (células endoteliais) ou DMEM-F12 (U-373 MG e astrócitos humanos) sem soro e lisadas com solução de Triton X-100 0,1%, NH₄OH 0,1 M em PBS-Ca²⁺ a 4°C, contendo inibidores de proteases – PMSF 1Mm e leupeptina 40 µM. Os restos celulares foram eliminados por lavagens sucessivas e delicadas com PBS-Ca²⁺, estéril e gelado. A rede proteica restante 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°C em atmosfera úmida de CO₂ a 5%.

2.4 Dosagem qualitativa e semi-quantitativa de proteínas matriciais secretadas por ELISA indireto

As MECs nativas de U-373 MG, astrócitos humanos e células endoteliais receberam os anticorpos primários (anticorpos anti-TN-C humana monoclonal, contra o domínio EGF-like, clone BC-24, Sigma e anti-FN humana policlonal A0245, Dako) nas suas diluições apropriadas, em PBS suplementado com Tween 20 0,05% (PBS+T), por uma hora a temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS+T, os anticorpos secundários conjugados à peroxidase (camundongo-HRP – DAKO e coelho-HRP – DAKO) 1:2000 foram adicionados por mais uma hora a temperatura ambiente. A revelação foi feita em tampão citrato pH 4,5 contendo H_2O_2 0,01% e OPD a 1,0 mg/mL. A paralisação da reação de cor foi feita com H_2SO_4 3M. A leitura foi feita em um espectrofotômetro de placa (Thermo Fisher, modelo Multiskan™), a 490 nm. Nas dosagens semi-quantitativas para FN e TN-C, usamos curvas-padrão de 0,01 a 10 $\mu\text{g/mL}$ com as proteínas purificadas (fibronectina plasmática purificada, Life Technologies/Invitrogen, Brasil) e TN-C isolada de meio condicionado da linhagem de astrocitoma U-251 MG (Chemicon / MilliporeCorp, Billerica, MA) incubadas nos poços de microplacas overnight a 4°C. Entretanto, não sabemos a quantidade exata de FN ou TN-C purificada aderida ao plástico da placa de ELISA. É possível estabelecer uma correlação direta entre os valores de absorbância encontrados na curva-padrão e os valores da absorbância encontrados nas MECs imobilizadas. A absorbância dos controles negativos foram extraídas das leituras de densidade ótica. Foram escolhidos para o estabelecimento da curva-padrão pontos de diluição das proteínas de concentração conhecida que apresentavam uma variação linear. Os valores de absorbância obtidos para as matrizes nativas imobilizadas foram então convertidos, para ambas as proteínas (FN e TN-C), de forma que uma análise comparativa dos teores pudesse ser estabelecida para cada matriz estudada, como uma razão direta dos valores de densidade ótica.

2.5 Ensaio de adesão de células endoteliais às matrizes imobilizadas livres de células

Após a obtenção das MECs de U-373 MG, astrócitos humanos, células endoteliais em placa de 6 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 (10^5 células/cm²), em meio de cultura M199 contendo BSA 0,1%. As células foram então incubadas a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 24 horas. Após o tempo de 24 horas, o meio de cultura contendo as células que se descolaram do suporte matricial foi coletado e as células desaderidas quantificadas. As células aderentes foram tripsinizadas e quantificadas por contagem em hemocitômetro.

2.6 Isolamento e quantificação de vesículas extracelulares (VEs)

Após incubação por 24 horas das células endoteliais sobre matriz extracelular autóloga ou da linhagem de astrocitoma U-373 MG, o sobrenadante foi recolhido para posterior centrifugação à 500g, para remoção de quaisquer restos celulares. O sobrenadante recolhido é submetido à ultracentrifugação 100.000×g por 4h. Após este período, o sedimento contendo VEs foi recolhido, sendo feita em seguida a marcação para detecção de fosfatidil serina (anexina V-FITC). A análise das VEs foi feita em citômetro de fluxo Accuri C6 BD (New Jersey, USA). Com a utilização de microesferas para a calibração do tamanho de micropartículas (<1 µm), era feita a leitura de eventos positivos para anexina V (Rautou *et al.*, 2011).

2.7 Ensaio tridimensional de tubulogênese em Matrigel™

As células endoteliais semeadas nas MECs nativas foram tripsinizadas com tripsina 0,025% diluída em solução Versene e plaqueadas (5×10^4 células) sobre 50µL de Matrigel™/poço (Becton e Dickinson; *Bedford, Massachusetts, USA*) em placa de 96 poços, em M199 + 5% SFB por 16 horas. Após 16 horas no 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 representativos de cada poço, em microscópio invertido. Cada condição foi realizada em triplicatas.

Variações do ensaio tubulogênico foram realizadas, nos quais as células endoteliais, previamente incubadas por 24 horas com as diversas MECs imobilizadas, foram em seguida expostas a estímulos adicionais durante as 16 horas de incubação com o Matrigel, descritos a seguir:

Fatores angiogênicos: As células endoteliais foram incubadas com M199 suplementado com 20ng/mL de VEGF-A ou FGF-2, quando plaqueadas sobre matrigel, em comparação a controles (M199 livre de soro ou M199 suplementado com 5% de SFB). O ensaio durou 16 horas e o número total de estruturas tubulares/poço foi quantificado, conforme descrito acima.

Moduladores de isoformas de PKC: As células endoteliais previamente incubadas com MEC autóloga e MEC de astrocitoma imobilizadas foram tratadas ou não com PMA (ativador das PKC clássicas – P8139 Sigma) 16 nM por 30 min, Gö6983 (inibidor das PKC clássicas – G1918 Sigma) 7 nM por 30 min e Ka Delta (ativador de PKC δ) 50nM por 15 min a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após 3 lavagens com M199 sem SFB, foram tripsinizadas com tripsina 0,025% diluída em solução Versene e plaqueadas (5×10^4 células) sobre 50 μ L de MatrigelTM/poço, por 16 horas. O número total de estruturas tubulares/poço foi quantificado, conforme descrito acima.

Células apoptóticas por anoikis: As células endoteliais previamente incubadas com MEC autóloga e MEC de astrocitoma imobilizadas foram semeadas sobre Matrigel na presença com 10 a 50% de células endoteliais ($0,5-1 \times 10^4$ células) que sofreram *anoikis* (morte por descolamento), em contato com ambos os tipos de matriz (autóloga ou de astrocitoma). Após 16 horas, as células foram fixadas em 1,1% glutaraldeído em PBS durante 10 minutos, seguido por três lavagens com PBS, e o número total de estruturas tubulares/poço foi quantificado, conforme descrito acima.

Vesículas extracelulares (VEs): As células endoteliais previamente incubadas com MEC autóloga e MEC de astrocitoma imobilizadas foram semeadas sobre Matrigel imediatamente foram adicionadas VEs isoladas do sobrenadante destas células expostas à MEC de HUVEC ou MEC de U-373 MG, nas concentrações de 50 VE/ μ L ou 150 VE/ μ L. Após 16 horas, as

células foram fixadas em 1,1% glutaraldeído em PBS durante 10 minutos, seguido por três lavagens com PBS, e o número total de estruturas tubulares/poço foi quantificado.

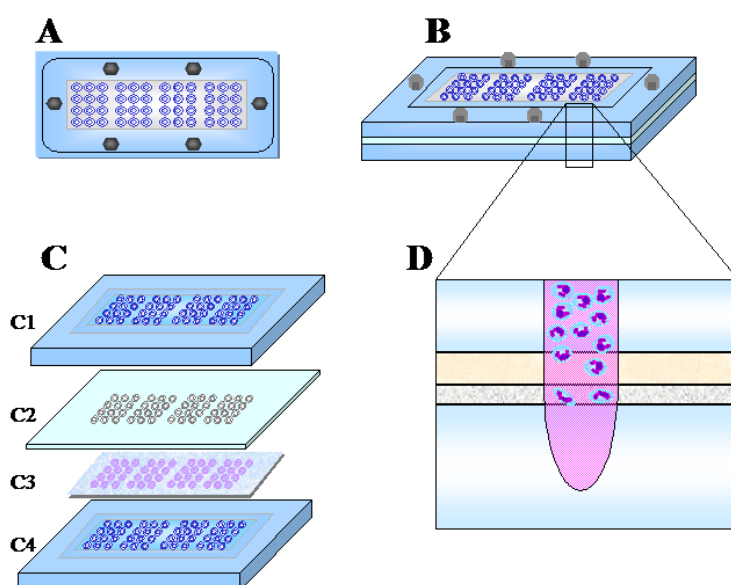
2.8 Ensaios de migração endotelial

Os ensaios de migração endotelial foram feitos em câmaras de Transwell (NUNC), com base na técnica descrita por Vasse *et al.* (2001). Estas câmaras são constituídas de membranas de polycarbonato, na forma de insertos, que são colocadas no interior de poços de placa de cultura de 24 poços. Para este ensaio, utilizamos insertos com membrana de porosidade de 8 μ M, em virtude do tipo celular utilizado. As membranas foram tratadas por 30 minutos a 37°C com gelatina a 2% na face superior, após o qual a gelatina foi aspirada. Células endoteliais (5×10^4) foram então plaqueadas nos insertos em M199 sem SFB. A câmara inferior do inserto foi incubada 800 μ L de M199 sem SFB ou em M199 contendo VEGF-A (isoforma VEGF165, obtido da Peprotech/FUNPEC, Ribeirão Preto, SP) 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL ou 50 ng/mL. A placa foi mantida, durante o tempo de incubação, a 37°C em presença de CO₂ 5%. Após os tempos de incubação, os insertos foram lavados com M199 puro, o lado de dentro do inserto foi limpo com o auxílio de um cotonete para a retirada das células que não atravessaram a membrana. As células que migraram foram fixadas com paraformaldeído 3,7% (diluído em PBS) e coradas com DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol, Sigma-Aldrich, São Paulo) a 1 μ g/mL em PBS. As células que migraram foram quantificadas pela contagem de 5 campos aleatórios da membrana em um aumento de 20 vezes.

Alternativamente, a migração de células endoteliais em resposta à presença de vesículas extracelulares (VEs) foi estudada em câmara de Boyden modificada (Figura 14). As células endoteliais foram semeadas, na concentração de 10^6 células/mL, em poços da câmara de Boyden de 48 poços (Neuroprobe, Inc, Gaithersburg, MD), utilizando filtros de polycarbonato com poro de 8 μ m (GE Water and Process Technologies, Pennsylvania, EUA). Foram utilizadas VEs isoladas do sobrenadante das células expostas à MEC de HUVEC ou MEC de U-373 MG nas concentrações de 50 VE/ μ L ou 150 VE/ μ L. Foram adicionados na parte inferior da câmara meio M199 incompleto (controle), meio M199 10% SFB ou VEs. As células endoteliais (4×10^4 /poço) foram adicionadas aos poços da parte superior da câmara e incubados por 4 horas a 37°C em atmosfera a 5% de CO₂. Em alguns grupos, as células foram

pré-incubadas com as VEs na concentração de 50 VE/ μ L, para migrarem em direção ao meio M199 10% SFB. As células endoteliais que migraram em direção à parte inferior da câmara ficaram retidas no filtro foram fixadas, coradas e contadas através de microscopia óptica (Olympus BX41, Toquio, Japão), no aumento de 400x em pelo menos cinco campos escolhidos aleatoriamente

Figura 14 - Figura ilustrativa de uma câmara de Boyden modificada



Legenda: A) vista superior; B) vista lateral; C) C1: parte superior da câmara, C2: membrana protetora de polietileno, C3: membrana de policarbonato, C4: parte inferior da câmara; D) detalhe de um poço da câmara.

2.9 Análise das vias de sinalização envolvidas na modulação da diferenciação angiogênica mediada por matrizes de atrocitoma U-373 MG

2.9.1 Fracionamento celular para análise de distribuição de PKCs

O método de fracionamento por velocidade de sedimentação diferenciada foi utilizado para se separar a fração solúvel da fração membranar das células. As células endoteliais incubadas sobre as diferentes matrizes, foram lisadas com o tampão de homogeneização (Tris-

HCl 20 mM, pH 7.5, EDTA 2 mM, EGTA 10 mM, sacarose 0,25 M) suplementado com coquetéis de inibidores de proteases (Sigma, # P8340) e de fosfatases (Sigma, #P5726), diluídos 1:100, conforme recomendação do fabricante. e ultracentrifugadas a 100.000×g por 40 min. A fração solúvel (sobrenadante) foi coletada e armazenada até o seu uso. A concentração proteica determinada pelo fluorímetro Quibit (Invitrogen, São Paulo). O sedimento (*pellet*) foi diluído em tampão de amostra (Tris 25 mM, glicerol 10%, azul de bromofenol (ABF) 0,02%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5% pH 6,8). As amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos.

2.9.2 Análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS (PAGE-SDS) e Western Blotting

Para a análise do padrão de ativação de proteínas de sinalização, extratos das células endoteliais incubadas com as diferentes matrizes utilizadas neste trabalho foram analisados por *western blotting*. As células endoteliais foram plaqueadas sobre MECs de U-373 MG e MEC autóloga em placas de 6 poços (6×10^4 células/cm²) em meio 199 com 0,1% de BSA, *overnight* ou por períodos definidos para cada tipo de experimento, em atmosfera úmida 37°C com 5% CO₂. 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, por 15 minutos a 4°C, com tampão de lise pH 7,5 (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Triton-100 1%) e inibidores de proteases (Sigma, # P8340) e de fosfatases (Sigma, # P5726), diluídos 1:100, conforme recomendação do fabricante. 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 8% 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 25 µL/poço (quantidade de proteína total: 5 a 10 µg/poço). Foi utilizado um padrão de peso molecular na faixa de 12 kDa a 225 kDa. A eletroforese foi desenvolvida na voltagem fixa de 100 V até que o corante marcador da frente de migração (ABF) atingisse o final 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 de 1 segundo 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. Neste trabalho, foram utilizados anticorpos primários contra as seguintes proteínas: sindecan-4 (#6268A, espécie: coelho, IMGENEX); VEGFR2 (#2479S, coelho, Cell Signaling, Danvers, MA, EUA); FGFR1(#9740S, coelho, Cell Signaling); PKC α (#C20 sc208, coelho, Santa Cruz); α -tubulina (#T5168, camundongo, Sigma); β -actina (camundongo, Sigma) caveolina-1(N-20 sc-894, coelho, Santa Cruz); FAK (#3285S, coelho, Cell Signaling); p-FAK ([Y397] #3283S, coelho, Cell Signaling); ERK (#4695, coelho, Cell Signaling); p-ERK ([Thr202/Tyr204], #4370S, coelho, Cell Signaling) e α 9 β 1 (clone Y9A2, # ab27947, camundongo, Abcam).

Após a incubação com anticorpos primários, as membranas passaram por 5 lavagens com TBS-Tween®20 0,05% e foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados a HRP (anti-IgG coelho #7074S ou HRP anti-IgG camundongo #7076S, ambos da Cell Signaling), por 1 hora. Após esse tempo, a membranas foram novamente lavadas (5 vezes) com TBS-Tween®20 0,05%. Em seguida, a membrana foi incubada com um reagente de detecção da atividade da HRP (ECL, GE Healthcare Life Sciences, São Paulo) por quimioluminiscência 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.

2.9.3 Análise celular por microscopia confocal

Células endoteliais e U-373 MG foram plaqueadas em lamínulas (13 mm de diâmetro) previamente tratadas com gelatina, inseridas em placas de cultura de 24 poços para a secreção e extração da matriz como descrito no tópico 2.3. Após a extração, as células endoteliais ($1 \times 10^5/\text{cm}^2$) foram plaqueadas sobre as MECs em M199 com 0,1%BSA por 20 horas. Após este tempo de adesão, as células foram lavadas com M199 sem SFB e fixadas em formaldeído 3,7% em PBS por 15min e então foram permeabilizadas com PBS + 0,1% e Triton por 2 min

a temperatura ambiente. Incubamos as células endoteliais com WGA conjugado a Alexa Fluor 350 (azul) na concentração 10 µg/mL e com anticorpo primário a-PKCα (C-20 #SC-208, coelho) na concentração 4 µg/mL por 30 minutos. Posteriormente, incubamos com o anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 555 anti-coelho a 2,5 µg/mL por 30 minutos. As imagens foram capturadas usando a objetiva de 63× do Microscópio Confocal Zeiss LSM510 Meta.

2.9.4 Silenciamento de expressão de RNA mensageiro

Células da linhagem U-373 MG foram plaqueadas em placas de 60 mm de diâmetro ou em placas de 6 poços na densidade de 1×10^4 células/cm², em meio DMEM-F12HAM, com 10% SFB, contendo L-glutamina 2mM, sem penicilina e sem fungizona. Passadas 24 horas, realizamos a transfecção com lipofectamina® 2000 (2 µg/mL), diluída em meio reduzido de soro Opti-MEM®. Os siRNAs (listados na Tabela 1), direcionados aos RNAs mensageiros da TN-C também foram diluídos em meio Opti-MEM. Testamos inicialmente duas concentrações distintas de siRNA (40 e 60 nM) e as mesmas concentrações para o siRNA truncado (controle negativo). Ao final da incubação, a solução de siRNA foi misturada com a solução de lipofectamina (proporção 1:1). Todas as condições foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente e ao final adicionadas às culturas celulares. Após 24 horas, trocamos o meio de cultura de todas as condições por meio DMEM-F12 HAM, suplementado com 10% de SFB, L-glutamina 2,0 mM, bicarbonato de sódio 26 mM, fungizona 2,5 µg/mL, penicilina 500 U/mL e gentamicina 40 µg/mL.

Tabela 1 - Sequências senso e anti-senso dos siRNAs utilizados

siRNA positivo	senso	5'-CAGCCAGUGGUGUUUAACCACGUUU-3'
siRNA positivo	anti-senso	5'- AAACGUGGUUAAACACCACUGGCUG-3'
siRNA truncado	senso	5'- CAGGUGAUGUGAAUUCACCGCCUUU-3'
siRNA truncado	anti-senso	5'- AAAGGCGGUGAAUUCACAUCACCUG-3'

As construções do siRNA positivo (senso/anti-senso) e do controle truncado (senso/anti-senso), assim como o meio Opti-MEM e a lipofectamina, foram obtidos junto à Life Technologies/Invitrogen (São Paulo, SP).

2.10 Análise dos transcritos diferentemente expressos nas células endoteliais incubadas com diferentes matrizes

2.10.1 Extração do RNA

Neste experimento as MECs foram extraídas em uma área de 75cm² (garrafa média). Em seguida plaquemos células endoteliais na densidade de 2×10⁴ células/cm² sobre as matrizes imobilizadas. Após 24 horas de adesão, as culturas foram lavadas com PBS e lisadas com o reagente Trizol (Life Technologies/Invitrogen, São Paulo, SP) (3,0 mL/garrafa), por 2 a 5 minutos. O lisado de cada condição foi centrifugado a 12.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para microtubos e tratado com 200 µL de clorofórmio (200 µL de clorofórmio para cada 1,0 mL de Trizol usado). A mistura foi agitada por 15 segundos, deixada em repouso a temperatura ambiente por dois minutos e então centrifugada a 12.000 rpm, a 4°C, por 15 minutos. Ao final desse processo, a fase aquosa superior de cada amostra foi transferida para outros microtubos, a qual foi em seguida adicionado o volume de isopropanol equivalente ao volume de sobrenadante recolhido. Após homogeneização manual, a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida centrifugada a 12.000 rpm a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e 1 mL de etanol 75% (1,0 mL de etanol 75% para cada 1,0 mL de Trizol usado) foi adicionado e homogeneizado em agitador. Estas amostras de RNA foram armazenadas em freezer ultrafrio (-80°C).

2.10.2 Preparo das bibliotecas

A integridade, a qualidade e a quantidade de RNA extraído foram inferidas utilizando-se o aparelho Bioanalyzer. As amostras de RNA de alta qualidade e integridade física foram enviadas para a empresa BGI Co. Ltd. para o sequenciamento. O preparo das

bibliotecas de seqüenciamento foi realizado através do TruSeq RNA Sample Prep v2 LS Protocol- Illumina, que isolam os mRNA com base na sua cauda poli-A através de beads de oligonucleotídeos dT. O sequenciamento de bibliotecas paired ends foi feito a partir de moléculas de cDNA e realizado utilizando a plataforma Illumina HiSeq2000. (https://support.illumina.com/downloads/truseq_rna_sample_preparation_v2_ls_euc_ltf_15026498.html).

2.10.3 Pré-processamento e montagem

A etapa de obtenção dos dados brutos é feita pelo *software* CASAVA 1.8.2 fornecido pela Illumina, que faz o *base call* dos dados brutos e os transforma em *reads* no formato fastq acompanhados dos *scores* de qualidade phred. Os *reads* foram visualizados utilizando o programa FastQC v-0.11.3 (www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/).

A filtragem dos reads de baixa qualidade, sequências de adaptadores e vetores foi realizada pelo programa Seqclean (<https://bitbucket.org/izhbannikov/seqclean>), utilizando como cutoff bases com qualidade inferior a 24QScore. A bases de dados de contaminantes usada foi a Univec (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/UniVec.html>). Após filtragem, *reads* com comprimento inferior a 65pb foram removidos.

2.10.4 Mapeamento

O mapeamento das amostras foi feito contra o genoma de *Homo sapiens* (hg19, Genome Reference Consortium GRCh37 build, Fev/2009). Para o mapeamento foi utilizado o programa TopHat v-2.1.0 (Trapnell *et al.* 2009). Em seguida a qualidade do mapeamento foi checada para cada amostra utilizando o pacote Samtools v.1.2 (ferramenta flagstat, Li et al 2009). Os arquivos de mapeamento foram analisados pelo script do HTSeq-count v.0.6.1 (<http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq/doc/index.html>) para extração de contagens brutas dos reads por gene.

2.10.5 Análise de expressão

Após obtenção das contagens, os grupos foram analisados usando o script dentro do programa DESeq2 (Love *et al.* 2014), um pacote do R/Bioconductor (Gentleman *et al.* 2004). *Dentro do programa DESeq2 os dados foram normalizados pelo tamanho das bibliotecas e foi utilizado um plot de dispersão para visualização da distância da contagem em relação ao esperado pelo modelo binomial negativo. Apenas os genes com contagem normalizada > 5 são utilizados, a fim de evitar de artefatos causados por baixa frequência de reads. Seguida a filtragem, os genes foram analisados de acordo com o modelo de binomial negativo para obtenção do log2foldchange. Sobre os testes foi aplicada a correção de FDR- Benjamini-Hochberg (Benjamini e Hochberg 1995) para múltiplos testes a fim de evitar os erros tipo I, ou seja, os falsos positivos.*

2.11 **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 Breve contexto de nossos dados prévios: sinalização celular na tubulogênese endotelial

Quando o processo angiogênico é ativado, a lâmina basal vascular é degradada e as células endoteliais migram e proliferam dentro de um tecido conjuntivo rico em colágeno intersticial e fibrina – devido ao edema associado ao processo angiogênico (**Figura 15A**), denominada *matriz provisional*.

Na angiogênese fisiológica, a deposição da matriz provisional tem caráter temporário, sendo reabsorvida ao final do processo. O colágeno I, ao se ligar a integrina $\beta 1$ na superfície das células endoteliais, ativa Src e Rho e suprime Rac e PKA, resultando na formação de fibras de estresse de actina e desmontagem das junções aderentes, orquestrando o complexo processo pelo qual as células se organizam formando tubos com lumens funcionais. Finalmente, eventos de sinalização posteriores à ligação de integrinas à laminina, são cruciais para a estabilização das estruturas tubulares (Senger e Davis, 2011).

A formação de novos vasos angiogênicos envolve a participação de subpopulações de células endoteliais, como as células endoteliais líderes (*tip cells*) e células endoteliais da haste (*stalk cells*) (Gerhardt *et al.* 2003) (**Figura 15 B**). As células endoteliais altamente migratórias, guiam a formação dos novos ramos em crescimento em direção a pistas angiogênicas (principalmente gradientes de VEGF), devido à maior expressão do receptor VEGFR2 (Hellstrom *et al.* 2007; Siekmann *et al.* 2007; Wang *et al.* 2015). As células endoteliais localizadas na retaguarda das líderes (células da haste) expressam outros receptores tais como o VEGFR-1, Notch-1 e -4, que são importantes para a indução de um estado quiescente, amadurecimento da parede vascular e para a formação de lúmen (Jakobsson *et al.* 2010; Krueger *et al.* 2011).

O microambiente tecidual da angiogênese pode se tornar persistente em tumores e em condições inflamatórias crônicas (Sanz e Vallina, 2003). Células tumorais não conseguem proliferar sem o remodelamento da MEC circundante e, neste microambiente, as células endoteliais encontram uma MEC quantitativa e qualitativamente diferente da presente no tecido normal, ou mesmo da que ocorre na angiogênese fisiológica. Nesse contexto, as

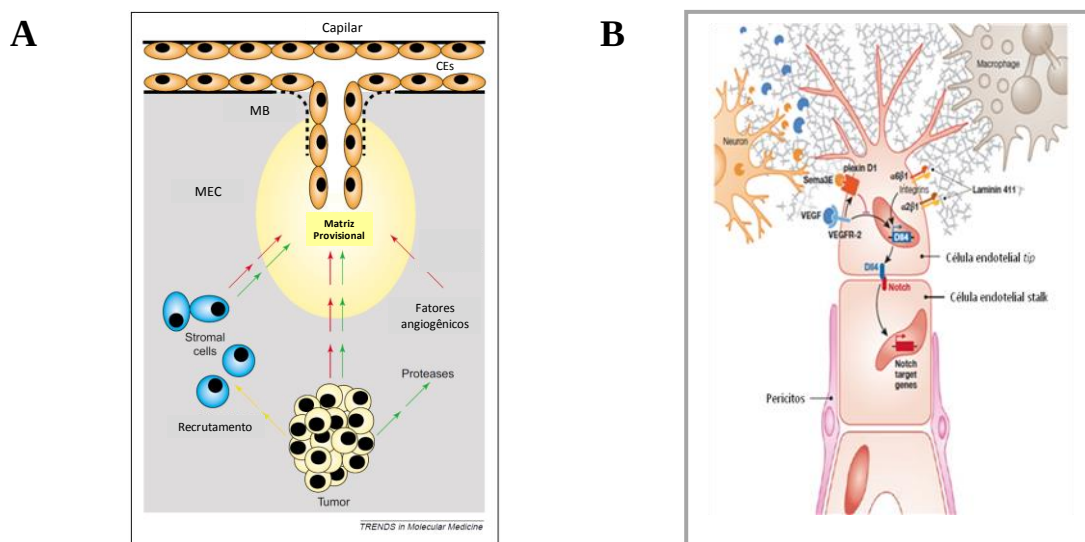
proteínas matricelulares têm tido destaque como componentes proeminentes na matriz extracelular de tumores sólidos (Murphy-Ullrich e Sage, 2014).

Trabalhos anteriores publicados pelo nosso grupo, demonstraram que a interação das células endoteliais com a proteína matricelular TSP-1, através do proteoglicano sindecan-4, ativa vias de sinalização dependentes de PKC α , contribuindo para a tubulogênese endotelial (Ferrari do Outeiro et al, 2002; Nunes *et al.* 2008).

Verificamos ainda que outra proteína matricelular, a TN-C, afeta drasticamente a dinâmica de formação de estruturas endoteliais ramificadas *in vitro* (Alves *et al.* 2011). Observamos que matrizes de astrocitomas de alto grau (III e IV) causam seletivamente a apoptose por desaderência (anoikis), e que a TN-C de origem tumoral 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*).

Desta forma, decidimos aprofundar os estudos sobre o papel de uma matriz com grande conteúdo da proteína matricelular TN-C na tubulogênese das células endoteliais.

Figura 15 - Microambiente angiogênico e os fenótipos da diferenciação endotelial



Legenda: (A) o processo angiogênico se dá com grande remodelamento do ambiente matricial da célula endotelial, no qual uma “matriz provisória” composta de colágenos intersticiais e fibrina, também incorpora novas moléculas (fatores de crescimento, proteínas matricelulares, proteases, etc); (B) Células endoteliais líderes “exploram” o ambiente matricial e dirigem o crescimento do ramo vascular, através de complexa sinalização que visa construir a arquitetura do novo vaso.

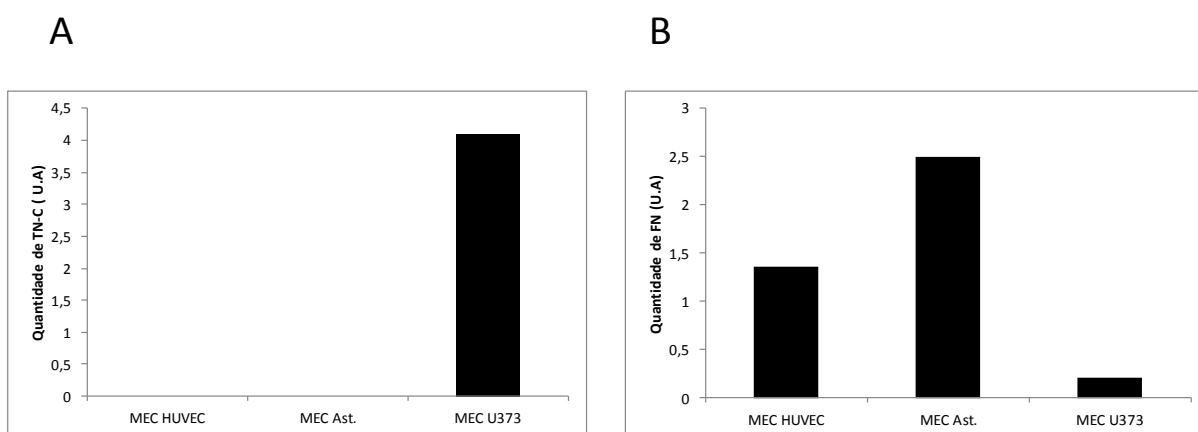
Fonte: Sanz e Vallina, 2003; Kitajewski 2011.

3.1.1 O padrão de expressão de FN e TN-C por astrócitos humanos normais é oposto ao apresentado por células de astrocitomas

Buscando avaliar comparativamente as matrizes extracelulares, de forma a indicar em que extensão os perfis de expressão de astrócitos humanos normais difeririam dos de células astrocíticas neoplásicas, a composição das MECs foi avaliada através de um método semi-quantitativo descrito anteriormente (Alves *et al.* 2011). A MEC secretada por astrócitos humanos normais foi comparada com as matrizes depositadas pela linhagem de astrocitoma U-373 MG e por células endoteliais.

Conforme evidenciado na **Figura 16**, astrócitos normais humanos não produzem níveis detectáveis de TN-C em suas matrizes, ao passo que secretam aproximadamente dez vezes mais FN do que as células U-373 MG e duas vezes mais do que células endoteliais – estas últimas também secretam níveis indetectáveis de TN-C em suas matrizes. Foi confirmado que as células neoplásicas, U-373 MG, incorporam grande quantidade de TN-C em sua matriz.

Figura 16 - Síntese de FN e TN-C por astrócitos humanos normais: comparação com células de astrocitoma U-373 MG e células endoteliais da veia umbilical humana

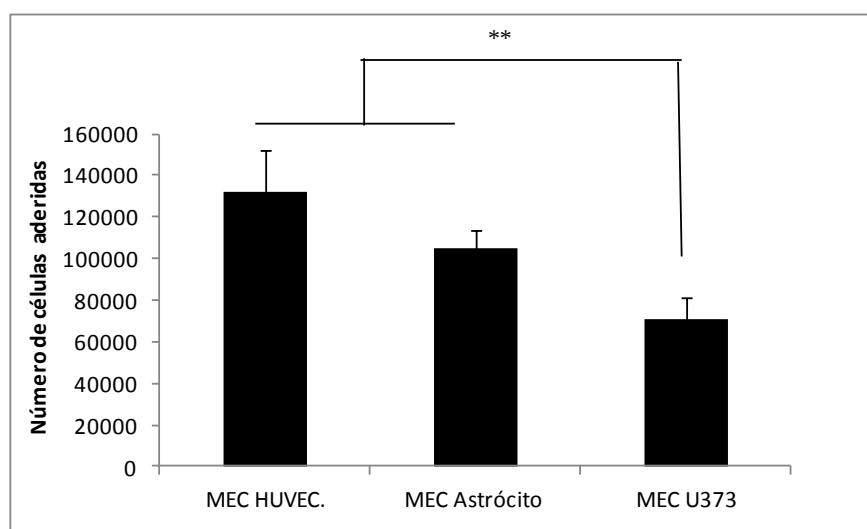


Legenda: Células endoteliais foram cultivadas por 48 horas antes de serem lisadas, deixando as matrizes extracelulares (MEC) imobilizadas no suporte de cultivo. As matrizes foram sequencialmente incubadas com anticorpos primários (anti-FN ou anti-TN) e secundários conjugados à peroxidase, seguido de revelação, conforme descrito na Metodologia. A quantidade relativa de (A) TN-C e (B) FN em matrizes imobilizadas livres de células foi calculada por ELISA indireto e expressa em unidades arbitrárias (U.A.) descrito em detalhes na Metodologia. N=2

3.1.2 Análise da adesão de células endoteliais à matriz de astrócitos normais

Foi demonstrado anteriormente que a MEC da linhagem U-373 MG induz forte perda de aderência endotelial, a partir de 6-8 horas de contato das células com esses suportes ricos em TN-C (Alves *et al.* 2011). No entanto, naquele trabalho não foi possível comparar a matriz de astrocitoma com uma matriz secretada por astrócitos humanos não transformados. A **Figura 17** mostra que não houve diferença significativa entre a adesão à matriz autóloga e àquela secretada por astrócitos normais, após 24 de incubação, período no qual uma extensa *anoikis* é observada nas células incubadas com matriz de U-373 MG.

Figura 17 - Efeito das diferentes MECs nativas sobre a adesão endotelial



Legenda: Células endoteliais foram plaqueadas sobre matriz extracelular (MEC) autóloga, MEC astrócito humano e MEC de U-373 MG, por 24 horas em M199 com 0,1% BSA e quantificadas conforme descrito na **Metodologia**. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). N=3

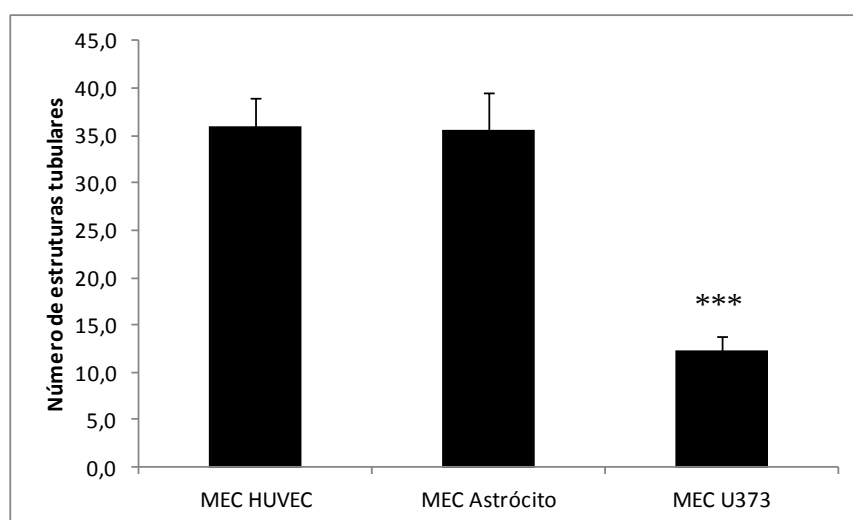
3.1.3 **Efeito da MEC da linhagem de astrocitoma U-373 MG na diferenciação angiogênica de células endoteliais**

A fim de investigar sua capacidade tubulogênica, células endoteliais cultivadas sobre as diferentes matrizes nativas foram transferidas para o Matrigel[®] (**Figura 18**). Neste ensaio, foi possível observar que células cultivadas sobre a MEC de astrócitos normais não apresentaram

diferenças significativas na capacidade de formar estruturas tubulares *in vitro*, quando comparadas a células endoteliais cultivadas sobre a matriz autóloga. Em contraste, as células endoteliais que foram semeadas na MEC da linhagem de U-373 MG, tiveram a capacidade de formar estruturas tubulares diminuída.

Estes resultados sugerem fortemente que a inversão do balanço da expressão entre FN e TN-C em astrócitos neoplásicos humanos é uma marcante mudança fenotípica da transformação destas células, que pode impactar diretamente a morfogênese endotelial, com possíveis repercussões no microambiente do parênquima cerebral normal e neoplásico.

Figura 18 - Efeito da matriz extracelular de astrócitos humanos normais na tubulogênese endotelial



Legenda: Células endoteliais foram incubadas sobre a matriz extracelular (MEC) autóloga, MEC astrócito humano e MEC de U-373 MG por 24 horas, em M199 com 0,1% BSA. Em seguida, as células endoteliais foram tripsinizadas e submetidas ao ensaio de tubulogênese em Matrigel, conforme descrito na Metodologia (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). N=3

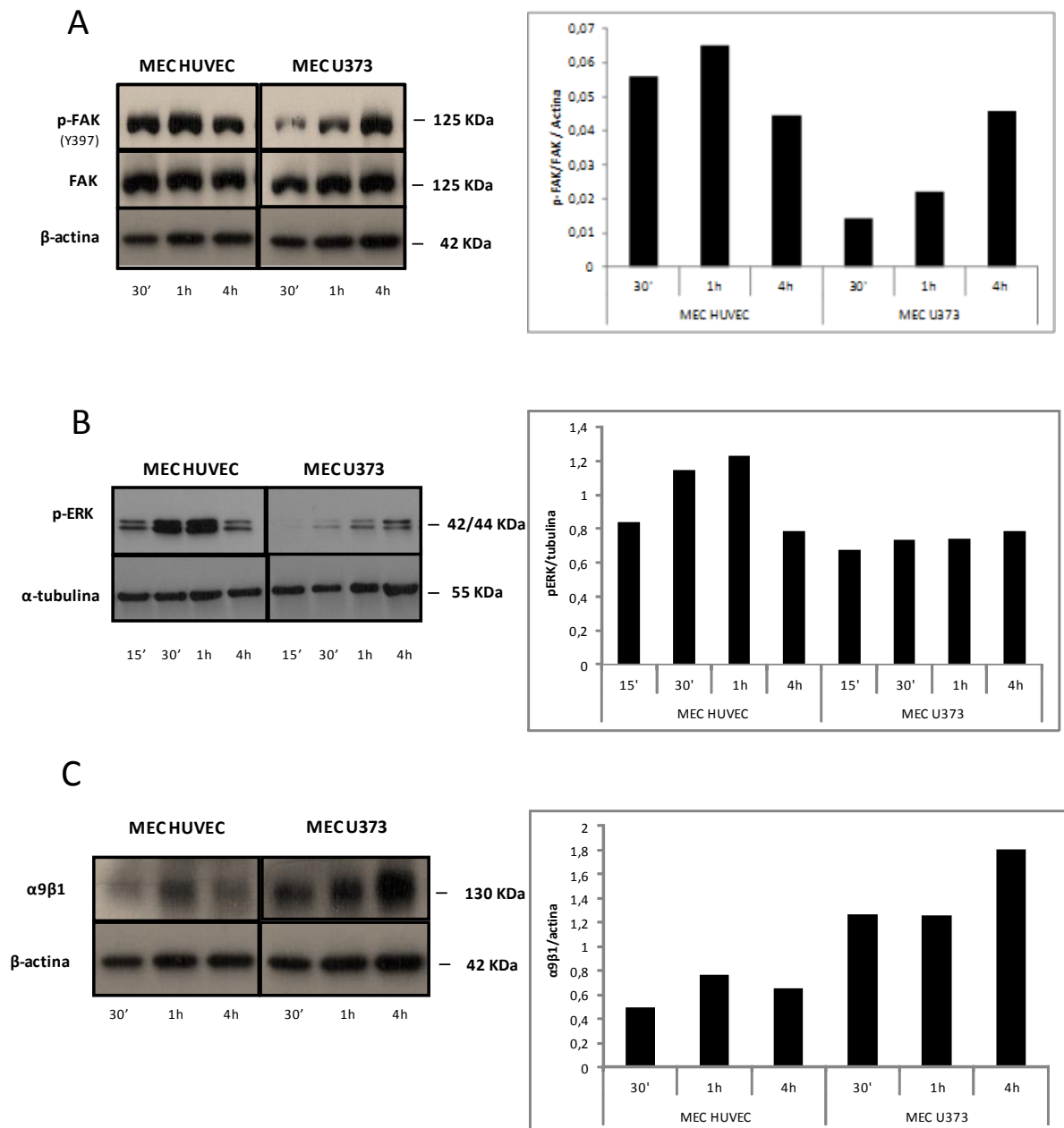
3.1.4 Efeito das diferentes matrizes extracelulares sobre a sinalização dependente de adesão em células endoteliais

Para analisar a sinalização celular em células endoteliais semeadas sobre as diferentes matrizes, foi construída uma curva de temporal na qual os tempos iniciais de adesão foram

observados (até as 4 primeiras horas). Na **Figura 19**, observamos uma grande ativação de FAK e ERK ($t = 30$ minutos e $t=1$ hora) nas células endoteliais semeadas sobre a MEC autóloga (**Fig. 19A e 19B**). Entretanto, a fosforilação de FAK nas células endoteliais incubadas sobre a MEC de U-373 é mais discreta e começa a aumentar a partir de 1 hora de adesão. Além disso, a cinética de ativação de ERK nessas células é muito mais lenta do que aquela que ocorre nas células endoteliais semeadas sobre a MEC autóloga. Estes resultados sugerem que a sinalização dependente de adesão das células endoteliais sobre as diferentes MECs ocorre com a ativação de diferentes receptores.

Uma vez que a MEC de U-373 MG é rica em TN-C e que o principal receptor endotelial para esta proteína matricelular é a integrina $\alpha 9\beta 1$, a expressão desta integrina nas células endoteliais após contato com as diferentes MECs foi então avaliada. Para isso, um *pool* de células endoteliais foi incubado sobre as matrizes imobilizadas e, as células endoteliais que aderiram a MEC de U-373 MG foram aquelas que continham maior expressão de integrina $\alpha 9\beta 1$ (**Fig. 19C**)

Figura 19 - Análise das cinéticas de ativação de FAK e ERK e da expressão da integrina $\alpha 9\beta 1$ nas células endoteliais incubadas com as diferentes matrizes imobilizadas



Legenda: Cinética de ativação de FAK (A) ERK (B) e da expressão da integrina $\alpha 9\beta 1$ (C) das células endoteliais incubadas com as diferentes matrizes imobilizadas. As células endoteliais foram semeadas sobre MECs nativas de U-373 MG e de células endoteliais durante os tempos assinalados. Os extratos celulares foram analisados por *western blotting*, usando anticorpos específicos conforme descrito na Metodologia. N=2 Representativo de um experimento.

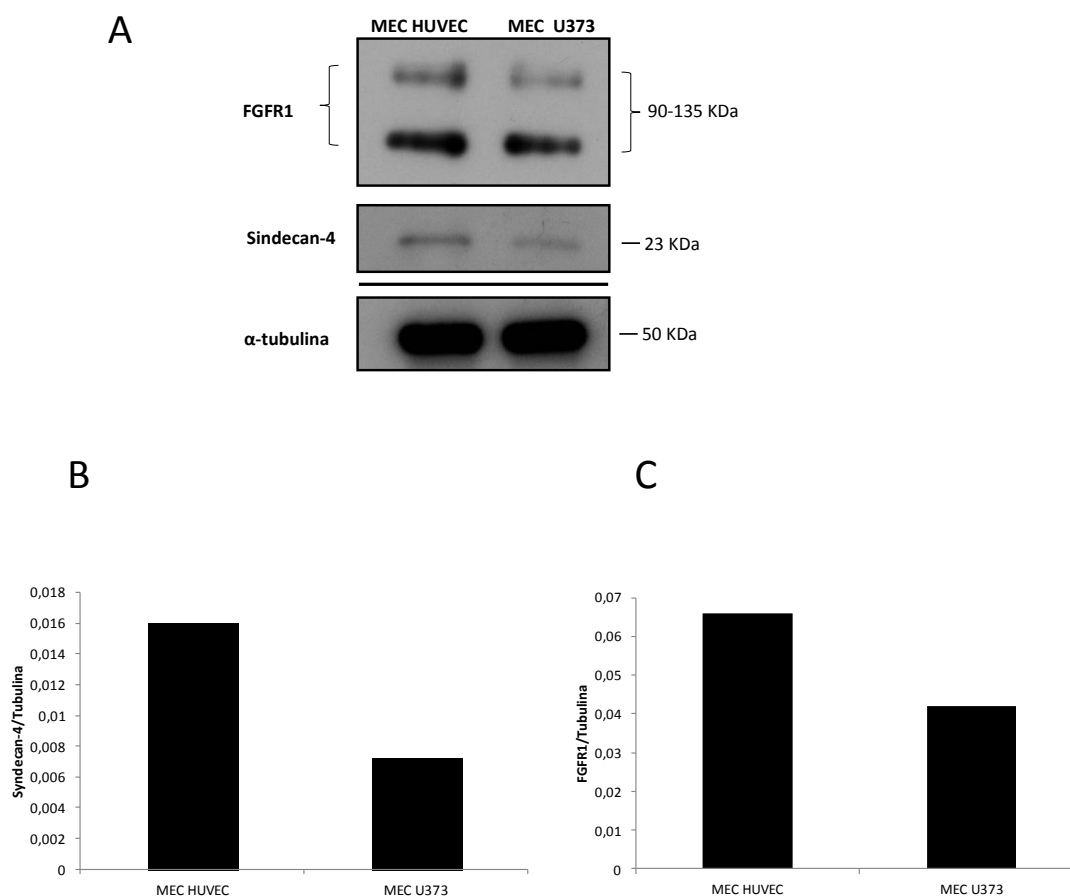
3.1.5 Efeito das diferentes matrizes extracelulares sobre a expressão de FGFR1 e sindecan-4

Alguns fatores de crescimento foram identificados por desempenhar papéis-chave durante a angiogênese tumoral. Tais moléculas incluem os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs), o fator de crescimento de fibroblastos (FGFs), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFs), entre outros. Estas proteínas são elementos fundamentais de vias moleculares complexas dentro do microambiente tumoral e elas têm sido o centro das atenções no estudo da angiogênese tumoral (Nikos *et al.* 2013).

O receptor tirosina-quinase FGFR1 funciona, nas células endoteliais, em estreita cooperação com o sindecan-4, um proteoglicano de heparan sulfato que também atua como receptor de proteínas matricelulares como TN-C e TSP-1. A TSP-1 já vem sendo estudada por nosso grupo, no contexto angiogênico (Ferrari do Outeiro-Bernstein *et al.* 2002; Nunes *et al.* 2008; Dias *et al.* 2012).

Portanto, inicialmente, a expressão do FGFR1 e seu co-coreceptor sindecan-4 foi analisada por *western blotting* nas células endoteliais pré-incubadas por 24 horas em diferentes matrizes imobilizadas. As células endoteliais previamente incubadas com matriz de astrocitoma U-373 MG apresentaram significativa diminuição da expressão de sindecan-4 e FGFR1, quando comparadas a amostras de células endoteliais que foram incubadas com matriz autóloga (**Figuras 20A e 20B**).

Figura 20 - Análise da expressão de sindecan-4 e FGFR1



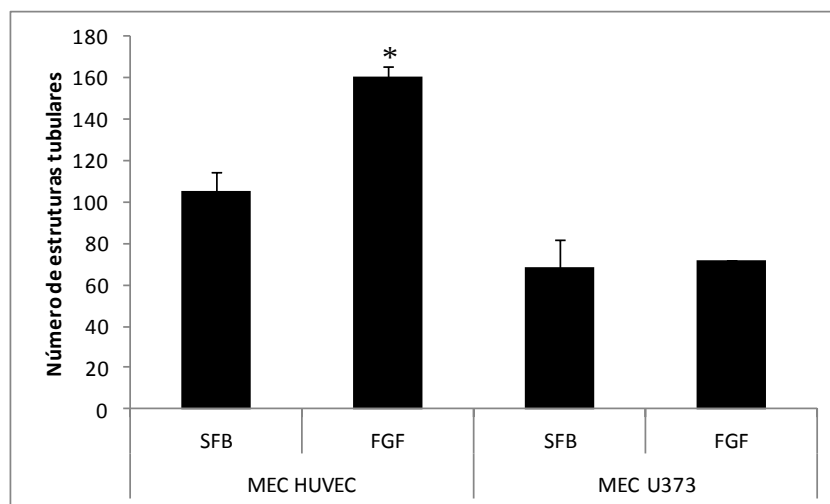
Legenda: Células endoteliais foram semeadas sobre MECs imobilizadas de origem autóloga ou secretada pela linhagem U-373 MG. Após 24 horas de incubação, os extratos celulares foram obtidos e analisados por *western blotting* (A) usando anticorpos específicos. As bandas reveladas foram quantificadas através do programa Adobe Photoshop 6.0 (B) sindecan-4; (C) FGFR1 (B) N=3 Representativo de um experimento.

No microambiente tumoral, a sinalização por FGFs, pode afetar diretamente tanto as células tumorais como a angiogênese, em particular a isoforma FGF-2 (Murakami *et al.* 2008; Mori *et al.* 2013). Nas células endoteliais, durante a angiogênese, o sindecan-4 é capaz de se ligar ao FGF-2 através de sua cadeia de heparan sulfato extracelular, formando um complexo ternário com o receptor FGFR1, modulando sua atividade (Murakami *et al.* 2008; Elfenbein *et al.* 2012).

Desta forma, para avaliar o efeito da diminuição de expressão do receptor FGFR1 e do seu co-receptor sindecan-4 nas células endoteliais incubadas 24 horas com as diferentes MECs, ensaios funcionais de tubulogênese em gel 3D de lâmina basal (Matrigel®), na presença ou ausência de FGF-2, foram realizados (**Figura 21**). Foi possível observar que as

células endoteliais condicionadas pela MEC de astrocitoma e em seguida desafiadas com FGF-2 permaneceram deficientes na formação de estruturas tubulares, de forma comparável à condição controle, com 5% de SFB. No entanto, as células endoteliais pré-incubadas por 24 horas com MEC autóloga aumentaram a capacidade de formar tubos na presença do fator FGF-2 exógeno, quando comparadas ao mesmo controle. Desta forma, sugerimos que a diminuição da expressão do receptor FGFR-1 e de seu co-receptor sindecan-4, observada nas células endoteliais pré-incubadas com MEC de U-373 MG, possa estar envolvida no comprometimento de vias de sinalização cruciais para a tubulogênese.

Figura 21 - Papel da matriz extracelular na tubulogênese endotelial, em resposta ao FGF-2



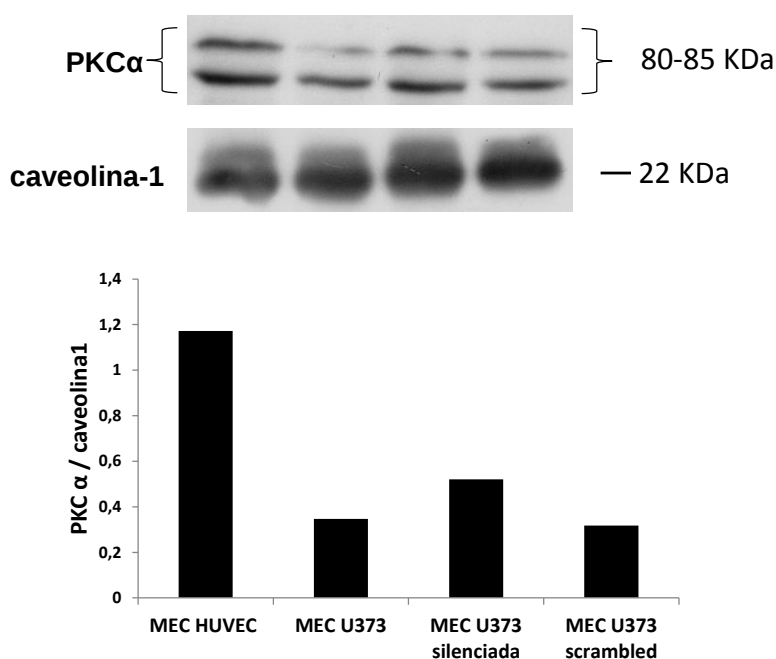
Legenda: Células endoteliais foram plaqueadas sobre MEC autóloga e MEC de células U-373 MG, por 24h em M199 com 0,1%BSA. Em seguida, as células foram tripsinizadas e submetidas ao ensaio de tubulogênese em Matrigel na presença de SFB 5% ou 20 ng/ml de FGF-2. N=3 (*p<0,05 ; ** p<0,01; *** p<0,001).

Sabe-se que a PKC α ativada pelo co-receptor sindecan-4 desempenha uma função fundamental na via não-canônica de propagação do sinal de FGFR1 (Murakami *et al.* 2008). Buscando investigar a via de sinalização envolvida na angiogênese mediada pelo FGF-2 e modulada pelo contato das células endoteliais com diferentes matrizes extracelulares, foi analisado o extrato da porção membranar das células endoteliais semeadas sobre: (i) a MEC autóloga; (ii) MEC de U-373 MG e (iii) MEC produzida por células U-373 MG silenciadas na expressão de TN-C, uma vez que, ao ser ativada, a PKC α pode ser translocada para

diferentes membranas celulares, de diferentes compartimentos subcelulares (Kraft *et al.* 1982).

Através de um extrato celular submetido a fracionamento (**Figura 22**), foi observado que células endoteliais incubadas por 24 horas com MEC de astrocitoma, quando comparadas com células incubadas com matriz autóloga, apresentaram uma diminuição da atividade de PKC α , uma vez que há uma menor translocação desta quinase para a fração membranar. Adicionalmente, as células endoteliais incubadas sobre a MEC produzida por células U-373 MG silenciadas para expressão da TN-C apresentaram uma maior quantidade de PKC α associada à fração membranar, quando comparada com células endoteliais pré-incubadas com MEC depositada por células U-373 MG selvagens, ou transfectadas com siRNA controle (**Figura 22**).

Figura 22 - Análise da distribuição celular da PKC α em células endoteliais moduladas pela MEC

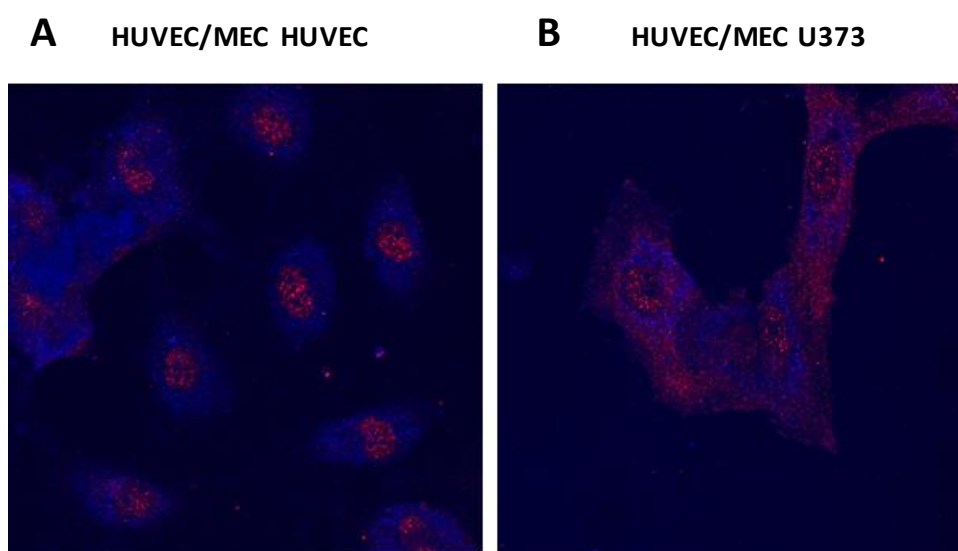


Legenda: Células endoteliais foram plaqueadas sobre MEC autóloga, MEC de U-373 MG (selvagem) e MEC de U-373 MG silenciadas para TN-C (conforme descrito na Metodologia) por 24 horas. Em seguida, o fracionamento subcelular foi feito e a porção membranar foi analisada por *western blotting* usando anticorpos específicos, com a proteína caveolina-1 servindo como controle de carga total de proteínas de membrana (*loading*).

Além disso, através do ensaio de imunofluorescência em microscopia confocal (**Figura 23**), observamos que a PKC α (vermelho) está mais concentrada no compartimento nuclear nas células endoteliais crescidas sobre a MEC autóloga, enquanto que a PKC α das células

endoteliais aderidas sobre a MEC de U-373 MG se mostrou mais dispersa no citoplasma das células.

Figura 23 - Modulação da distribuição celular da PKC α pela matriz extracelular

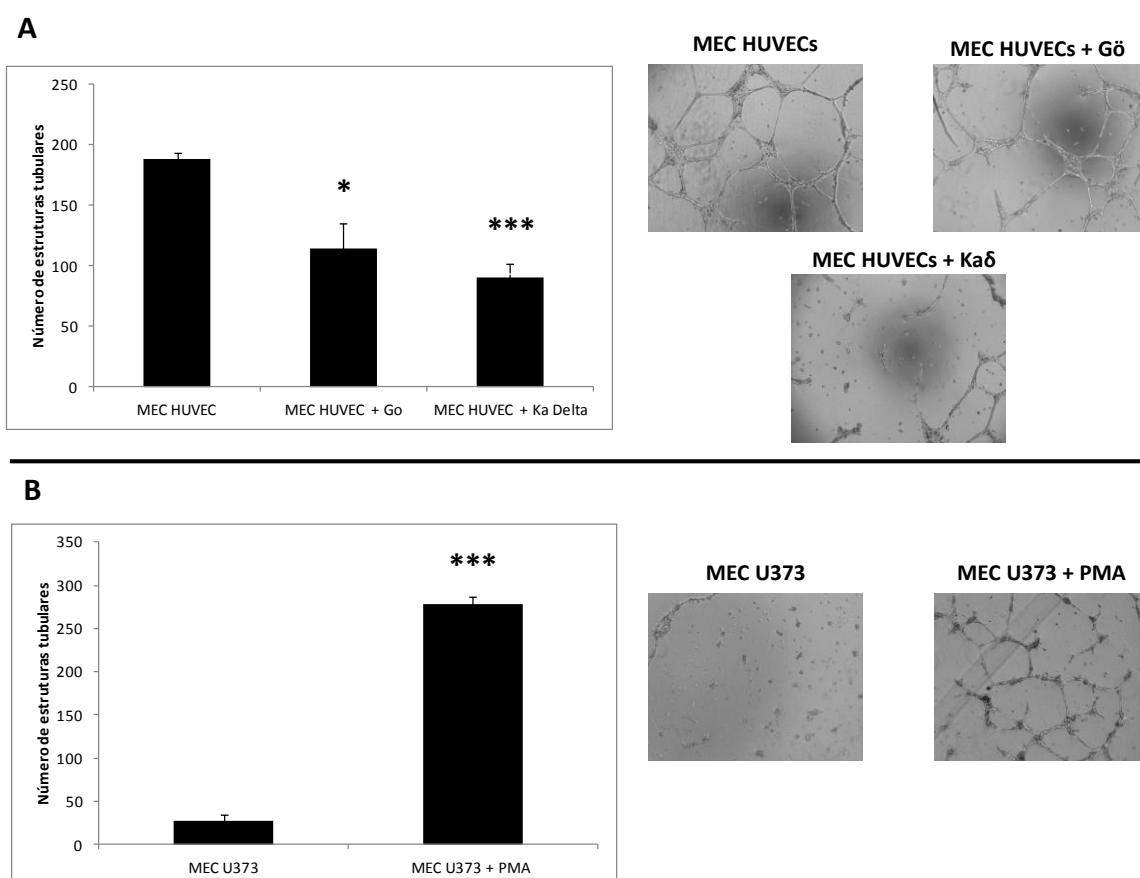


Legenda: Células endoteliais foram plaqueadas sobre as lamínulas contendo MECs imobilizadas, por 24 horas: (A) MEC autóloga (B) MEC de U-373 MG. Após etapas de fixação e permeabilização (ver Metodologia), as amostras foram incubadas sequencialmente com aglutinina de germe de trigo conjugada a Alexa Fluor 350 (azul), anticorpo primário α - e com anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 555 (vermelho). As imagens foram capturadas usando a objetiva de 63 $\times$ do microscópio confocal Zeiss LSM510 META.

Visando corroborar os resultados anteriores com outras evidências experimentais, decidimos executar o ensaio de tubulogênese na presença de diversos moduladores farmacológicos, que possuem como alvos - seletivos ou específicos - isoformas de PKC já implicadas no processo angiogênico. Inicialmente, as células endoteliais pré-incubadas por 24 horas com MEC tumoral foram tratadas com PMA, por apenas 15 minutos. Estas recuperaram totalmente a capacidade de formar estruturas tubulares, revertendo o efeito provocado pela MEC de astrocitoma (**Figura 24A**). Quando as células endoteliais semeadas sobre a MEC autóloga – permissiva à tubulogênese – foram tratadas com Gö 6983, um inibidor seletivo das PKCs clássicas (α , β I, β II e γ), uma significativa redução na capacidade tubulogênica destas células foi observada. Neste ensaio foi utilizada a concentração de 7nM de Gö 6983, que inibe seletivamente as isoformas α e β (**Figura 24B**).

A sinalização cooperativa entre FGFR1 e sindecan-4 que leva à ativação de PKC α é antagonizada pela isoforma PKC δ (Tkachenko *et al.* 2005, Figura 8 na Introdução). Assim, um peptídeo ativador específico para a isoforma PKC δ (Ka Delta) foi utilizado nas células endoteliais incubadas sobre a MEC autóloga e observamos que a ativação desta isoforma leva à diminuição da formação de estruturas tubulares. Estes dados mostram um antagonismo entre as ações das isoformas PKC α e PKC δ na regulação da tubulogênese, corroborando a possibilidade de contribuição do eixo FGFR1 $\Leftrightarrow$ sindecan-4 nos eventos aqui investigados.

Figura 24 - Efeito de moduladores de PKC na diferenciação angiogênica *in vitro* (tubulogênese) de células endoteliais pré-incubadas com diferentes MECs



Legenda: Células endoteliais pré-incubadas 24 horas com MECs tumoral (A) ou autóloga (B) foram tratadas com Gö 6983 (inibidor das PKC clássicas) 1 μ M, Ka Delta (ativador de PKC δ) 50 nM ou PMA 16nM (ativador de PKCs clássicas), nas condições descritas na Metodologia. Em seguida, foram tripsinizadas com e semeadas sobre Matrigel™, por 16 horas. As células foram fixadas e o número total de estrutura foi quantificado. As condições foram realizadas em triplicatas. Representativo de um experimento, N=2 (*p<0,05 ; ** p< 0,01; *** p<0,001)

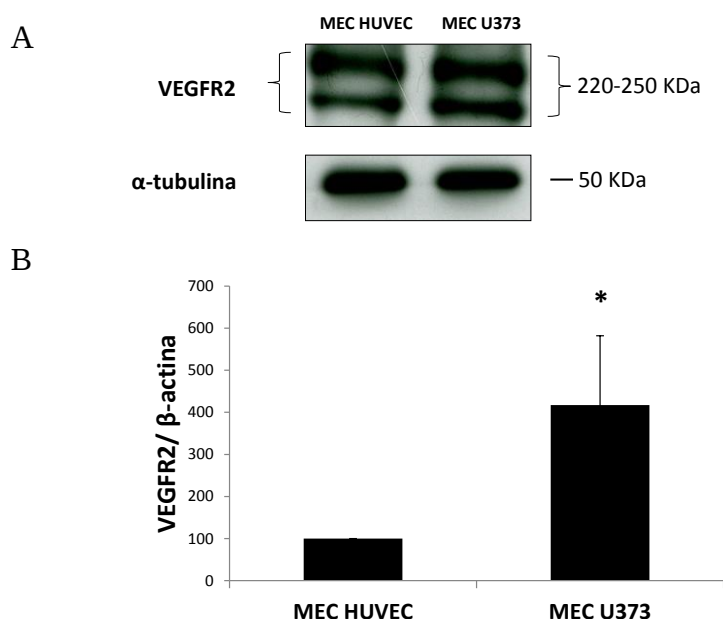
3.1.6 Papel da matriz extracelular na expressão de VEGFR2 por células endoteliais

Os membros da família dos VEGFs são considerados os fatores mais proeminentes na angiogênese, principalmente a isoforma VEGF-A, que atua através do receptor tirosina-

quinase VEGFR2 (Eichmann e Simons, 2012). A ligação de VEGF-A ao VEGFR2 dispara vias de sinalização que induzem brotamentos em ramos vasculares, proliferação e migração endotelial, além da manutenção da viabilidade dos vasos recém-formados. Assim, decidimos verificar se a expressão do receptor VEGFR2 era regulada pelas MECs investigadas neste estudo.

As células endoteliais previamente incubadas por 24 horas com matriz de glioma U-373 MG apresentaram um aumento significativo de expressão de VEGFR2, quando comparadas às HUVECs que permaneceram o mesmo período sobre a matriz autóloga (**Figura 25**).

Figura 25 - Análise da expressão de VEGFR2, em células endoteliais pré-incubadas com MECs imobilizadas

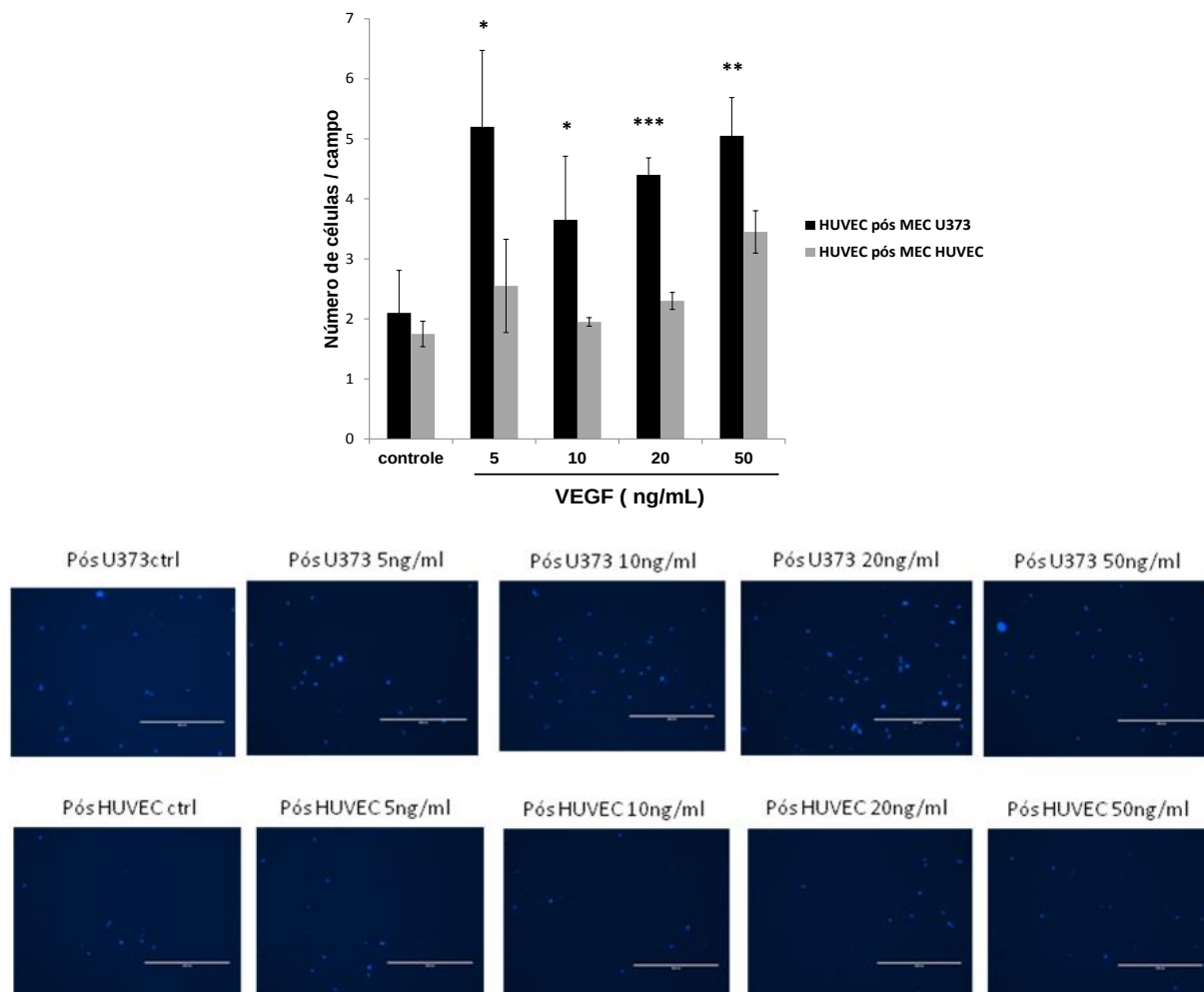


Legenda: Células endoteliais foram semeadas sobre MECs nativas autóloga ou secretada pela linhagem U-373 MG. Após 24 horas, os extratos celulares foram preparados e analisados por *western blotting*, usando anticorpos específicos. (A) Representação de um experimento; (B) média de 3 experimentos da quantificação das bandas proteicas, obtida com o programa Adobe Photoshop 6.0. N= 3 (*p<0,05 ; ** p< 0,01; *** p<0,001).

Buscando verificar se o aumento de expressão do receptor teria alguma repercussão funcional nas células endoteliais, realizamos ensaios de migração celular e tubulogênese induzidas por VEGF-A. As células endoteliais condicionadas por 24 horas na MEC de astrocitoma apresentaram uma capacidade migratória em direção ao estímulo do VEGF-A fortemente aumentada, quando comparadas às células endoteliais condicionadas pelas próprias matrizes (**Figura 26**). No entanto, de forma surpreendente, quando a resposta ao

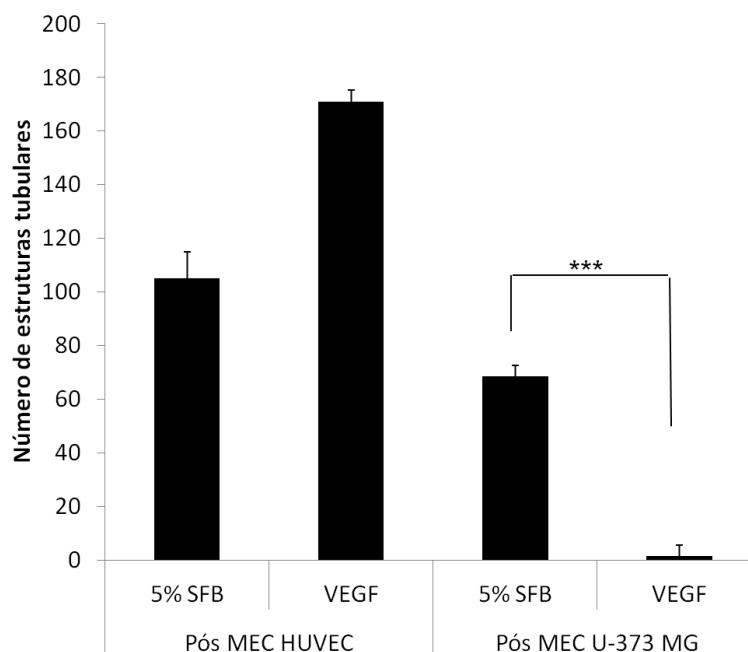
VEGF é medida através do ensaio tubulogênico, as células que receberam estímulo prévio da matriz tumoral falharam na formação de estruturas tipo capilar (**Figura 27**), quando comparadas às células endoteliais que foram semeadas sobre a MEC autóloga.

Figura 26 - Papel da matriz extracelular na migração endotelial em resposta ao VEGF-A



Legenda: Células endoteliais foram plaqueadas sobre MEC autóloga e MEC de células U-373 MG, por 24h em M199 com 0,1%BSA. Em seguida, foram plaqueadas em insertos de porosidade de 8 μ m. Na câmara inferior acrescentamos diferentes concentrações de VEGF-A. Após 16 horas, as células que permaneceram no lado superior da membrana foram removidas e as que migraram em direção ao estímulo, foram fixadas. A quantificação das células que migraram foi realizada por contagem de 10 campos aleatórios em cada inserto. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), N=3; imagens representativas de um experimento.

Figura 27 - Papel da matriz extracelular na tubulogênese endotelial em resposta ao VEGF-A

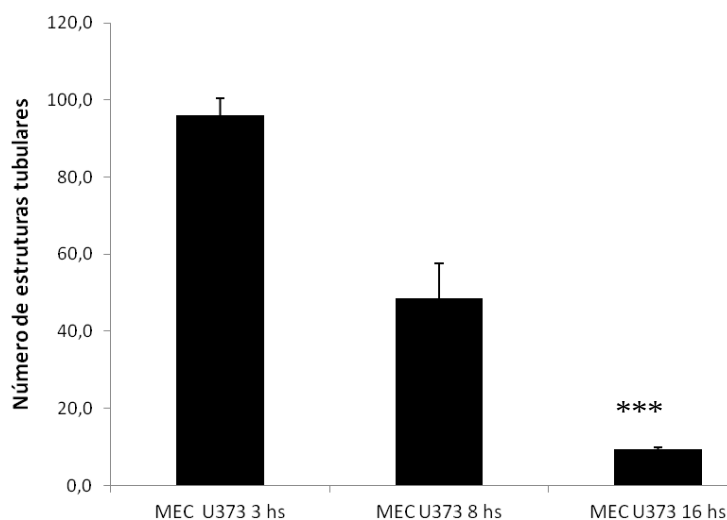


Legenda: Células endoteliais foram plaqueadas sobre MEC autóloga e MEC de células U-373 MG, por 24h em M199 com 0,1%BSA. Em seguida, as células foram tripsinizadas e submetidas ao ensaio de tubulogênese em Matrigel em M199 com 5% SFB ou 20ng/ml de VEGF-A. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) . N=3.

Conforme já mencionado, a matriz de células U-373 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 *et al.* 2011). No entanto, a cinética de aquisição do defeito tubulogênico, na sub-população que permanece aderida, 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 foram então incubadas por diferentes tempos sobre a MEC de astrocitoma U-373 MG e em seguida plaqueadas sobre Matrigel, para análise e quantificação de estruturas tubulares.

Foi possível observar que, de forma semelhante ao que observamos com a cinética do processo de indução *de anoikis* pela matriz de U-373 MG (Alves *et al.* 2011), a indução de defeitos na tubulogênese endotelial requer contatos mais longos do que 3 horas (**Figura 28**) com a MEC tumoral, sugerindo que este fenótipo disfuncional na tubulogênese das HUVECs requeira processos de sinalização que dependam de expressão de proteínas ou que envolvam vias ativadas tardiamente, nos processos de diferenciação celular.

Figura 28 - Cinética de aquisição do defeito tubulogênico, em células endoteliais pré-incubadas com MEC tumoral



Legenda: Células endoteliais foram semeadas sobre a matriz secretada pela linhagem U-373 MG por diferentes tempos (3, 8 e 16 horas) em M199 com 0,1% de BSA. Em seguida foram tripsinizadas e plaqueadas sobre 50 μ l de Matrigel, em M199 com 5% SFB (5×10^4 células/poço). Após 16 horas, as estruturas tubulares foram quantificadas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). N=3.

O conjunto de resultados mostrados neste capítulo nos levou a construir a hipótese de que a matriz tumoral rica em TN-C pudesse atuar, no longo tempo de incubação que utilizamos em nosso modelo (24 horas), como um fator de seleção de uma subpopulação endotelial com características de células endoteliais líderes (ou *tip cells*). As células endoteliais líderes são caracterizadas pela sua posição na ponta dos brotos angiogênicos e pela presença de filopódios que funcionam como sensores de pistas angiogênicas atrativas como o VEGF-A (Hellström *et al.* 2007). Segundo dados da literatura, um excesso de células expressando receptores VEGFR2 leva a um desequilíbrio entre proporções adequadas de células endoteliais líderes e da haste, prejudicando assim a morfogênese das estruturas tubulares (Mettouchi, 2012).

Desta forma, resolvemos comparar o perfil de células endoteliais incubadas com matriz autóloga com o daquelas em contato com a matriz tumoral, utilizando a estratégia de análise global da expressão gênica ou análise de transcriptoma (Nobuta *et al.* 2007) buscando correlacionar as diferenças no padrão de expressão de transcritos com o fenótipo dessas células endoteliais.

Conforme mostra a **Tabela 2**, observamos que a MEC tumoral induz nas células endoteliais um aumento bastante significativo de genes envolvidos na aquisição do fenótipo endotelial de célula líder.

Tabela 2 - Genes relacionados ao fenótipo endotelial de células líderes induzidos pela matriz de astrocitoma U-373 MG

Gene	Proteína	Expressão (fold change)	Valor de p	Valor de p ajustado[¥]
AQP1	aquaporina 1	4,4	2,39E-011	4,20E-008
DLL4	delta like 4	2,3	0,00012783	0,01323328
EFNB2	efrina B2	2,1	2,04E-012	4,79E-009
MMP14	metaloproteinase 14	1,8	1,85E-006	0,00059184
PLXD1	plexina D1	1,5	0,00030782	0,0219931

(¥):

- Genes analisados de acordo com o modelo de binomial negativo para obtenção do valor $[\log_2 \text{foldchange}]$

- Foi aplicada a correção de FDR - Benjamini-Hochberg (Benjamini e Hochberg 1995)

3.2 Artigo

Extracellular vesicles isolated from endothelial cells undergoing anoikis promote endothelial tubulogenesis and migration: a possible autocrine angiogenic mechanism induced by tumor microenvironment

Aline Oliveira da Silva¹, Edward Helal Neto^{1*}, Tercia Rodrigues Alves^{1,3}, João Alfredo de Moraes^{2φ}, Ana Clara Frony², Bruno Pontes⁴, Laila Ribeiro Fernandes¹, Nathan Bessa Viana^{4,5}, Christina Barja-Fidalgo², Vivaldo Moura-Neto^{3¥}, Verônica Morandi¹

1-Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Departamento de Biologia Celular, Laboratório de Biologia da Célula Endotelial e da Angiogênese (LabAngio), Rio de Janeiro, Brazil.

2- Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Departamento de Biologia Celular, Laboratório de Farmacologia Celular e Molecular (LFCM), Rio de Janeiro, Brazil.

3-Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Programa de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, INNT/INCT/MCT, Rio de Janeiro, Brazil.

4-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Pinças Óticas, Coordenação de Programas de Estudos Avançados, Instituto de Ciências Biomédicas, Rio de Janeiro, Brazil.

5-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Física, Rio de Janeiro, Brazil.

Present addresses:

(*) *Laboratório de Farmacologia Aplicada, Departamento de Farmacologia, Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, and Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Inovação em Doenças Negligenciadas (INCT-IDN), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.*

(¥) *Centro de Pesquisa do Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer – IECPN – Rio de Janeiro – Brazil*

(φ) *Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Instituto de Ciências Biomédicas, Laboratório de Biologia Redox, Rio de Janeiro, Brazil.*

ABSTRACT

Altered ECM is a hallmark of most solid tumors, affecting diverse cellular functions, such as survival, growth, migration and differentiation. Apoptotic cell death is widely considered a positive process that both prevents and treats cancer. Paradoxically, it has been proposed that apoptosis can also play beneficial roles in tumor microenvironment, by even promoting cancer. We have previously shown that the ECM secreted by high-grade astrocytomas

induced massive endothelial cell apoptosis by *anoikis*, while a surviving endothelial subpopulation acquired a tubulogenesis-defective phenotype (Tubulogenesis-Defective Endothelial Cells, or TDECs). Since apoptosis is also known to be an important tool in vascular remodeling, we decided to investigate the role of apoptotic cells and their conditioned media in the modulation of endothelial tubulogenesis. Using a real time videomicroscopy approach, we observed that apoptotic cells, that had undergone *anoikis* after incubation with a TN-rich astrocytoma extracellular matrix, were able to attract migrating endothelial cells, and also seemed to guide the growth of sprouts between distant endothelial cells. The further analysis of the apoptotic conditioned media showed the presence of a 2.8-fold higher amount of extracellular vesicles (EVs), as compared to the number of EVs generated by endothelial cells incubated with their autologous matrix. Although both types of EVs were able to significantly improve the tubulogenesis capacity of TDECs, only the vesicles produced by cells incubated with astrocytoma ECM were able to induce TDECs migration. In summary, our data suggest that endothelial apoptosis induced by altered tumor ECM may generate an advantageous autocrine signaling mechanism, through shedding or secretion of endothelial extracellular microvesicles, that ultimately could favor the angiogenic balance.

INTRODUCTION

High-grade gliomas are the most common brain tumors. Despite intensive research it still presents a poor prognosis (Wang and Jiang, 2013). These tumors have the ability to modify their stromal environment, altering the behavior of neighboring normal cells, as endothelial cells (Kahlert and Kalluri, 2013). Cancer progression is dependent on abnormal angiogenesis that supply oxygen, growth factors and nutrients to facilitate tumor growth and metastasis development (Huang et al. 2015).

Recent studies have shown that tumor microenvironment can increase the secretion of extracellular vesicles (EVs), which are able to fuse with cell membranes, thus allowing communication between tumor and surrounding cells (Martinez and Andriantsitohaina, 2011; Ramachandran et al, 2012).

EVs are defined as a set of secreted or shed membrane vesicles that includes exosomes, microvesicles and apoptotic bodies. Exosomes refer to vesicles of 30–150 nm in diameter, generated by exocytosis of multivesicular bodies (MVBs) and are secreted when

these compartments fuse with the plasma membrane. Microvesicles are shed from the plasma membrane through direct outward budding and have 100–2,000 nm in size, while apoptotic bodies are released upon fragmentation of cells undergoing apoptosis, with vary in size between 50 and 5,000 nm. EVs can carry a broad repertoire of cargoes, including cytokines, membrane receptors and receptor ligands, lipids and nucleic acids (Vader et al, 2014; Hina et al, 2016).

EVs can affect angiogenesis by inducing changes in proliferation, migration, and adhesion of endothelial cells, and by altering the production of proangiogenic and anti angiogenic factors (Soleti, 2009; Zernecke, 2009). Furthermore, during artherosclerosis, endothelial cells undergoing apoptosis release extracellular vesicles that trigger a paracrine signaling that ultimately leads to the mobilization of progenitor cells and to the inhibition of endothelial cells apoptosis (Zernecke 2009).

We have previously shown that extracellular matrices (ECMs) secreted by high-grade astrocytomas - which are rich in tenascin-C (TN-C) - induced massive endothelial cell *anoikis* (40-80% of cell death after 24 hours of incubation with astrocytoma ECM, compared to non tumoral ECMs). Noteworthy, this apoptotic phenomenon selected an apoptosis-resistant endothelial cell subpopulation that was defective in forming tubular structures (Alves et al, 2011).

Endothelial cell apoptosis has been longly recognized as an essential part of physiologic angiogenesis, mainly related to vessel pruning and regression, where cell adhesion plays a major role (Chavakis and Dimmeler, 2002). Apoptosis is known to prevail in hypotoxic microenvironments of advanced solid tumors (Vaupel and Mayer, 2007). Also, it has been shown that dying endothelial cells induced directional endothelial cell sprouts, suggesting that apoptotic cells could trigger a sequence of events important for angiogenesis and vascular remodeling (Weihua et al, 2005).

In this study, we decided to investigate the possible contribution of endothelial apoptotic cells - induced by an astrocytoma derived-ECM - in the angiogenic process. We reproduced the endothelial apoptosis phenomenon previously described by our group (Alves et al, 2011) and next characterized a role for endothelial extracellular vesicles in tubulogenesis, endothelial branching and migration in vitro.

MATERIAL AND METHODS

Primary cell cultures

Except where stated, all culture supplies were from Life Technologies/Invitrogen (São Paulo, Brazil). Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were obtained by a modification of the procedure previously described (Jaffe et al, 1973), after treatment of umbilical veins with a 0.1% collagenase IV solution (Sigma, St. Louis, MO), and grown in 199 medium (M199, Sigma) supplemented with 20% fetal calf serum and antibiotics. Umbilical cords were collected according to the guidelines provided by SISNEP/CONEP – Brazilian Ministry of Health (CAAE: 0086.0.314.325-10 - Source Protocol #74/2010, approved by the SMSDC-RJ/City of Rio Janeiro Research Ethics Committee). At least five independent primary cultures were pooled for each experiment, in order to minimize the interference of individual genetic variation. Endothelial cells were used at passage 3.

Astrocytoma cell line

The human astrocytoma cell line U-373 MG was obtained from ATTC (Manassas, VA, USA) and has been classified as a malignant anaplastic astrocytoma grade III-glioblastoma. These cells were cultured in DMEM/F12 supplemented with 10% FCS, glutamine and antibiotics.

Preparation of fresh immobilized extracellular matrix (ECM)

Fresh immobilized ECMs (from astrocytoma and endothelial cells) were obtained as previously described (Morandi et al, 1994; Alves et al, 2011). Briefly, cells were seeded onto plastic (6, 24 or 96-well plate), sterile glass coverslips, or 25 cm² tissue culture flasks, and grown until they reached confluence (about 48 hours). Monolayers were disrupted with cold lysis buffer (PBS-Ca²⁺, pH 7.4, containing 0.1% Triton X-100, 0.1M NH₄OH, 40 µM leupeptine and 1mM PMSF) and cell debris were washed twice with cold PBS-Ca²⁺. Immobilized matrices were used as substrata for HUVEC adhesion and viability assays.

Detection of endothelial cell adhesion and deadhesion-induced apoptosis

HUVECs were seeded onto native ECM, in 96-well plates (3×10⁴ cells/well, at least in triplicate), in M199/0.1% BSA, for 2 hours or 20 hours. After these periods, non-adherent endothelial cells were removed with serum-free medium washing and adherent cells were detected by the MTT assay (Denizot and Lang, 1986). Samples were read at 595 nm on BioRad microplate reader (Hercules, CA), in parallel with a cell number standard curve (0.5-5×10⁴ cells/well) simultaneously seeded in M199/10% FCS. Detached astrocytoma ECM-induced endothelial cells were double stained with Annexin V-FITC conjugated (AV) (BD Biosciences, São Paulo, Brazil) and propidium iodide (PI) (Sigma) and cell fluorescence intensity was read at FACScalibur (Becton & Dickinson). Briefly, 1×10⁶ cells/cm² HUVECs were seeded onto human glioma ECM. After 4 hours of adhesion, floating cells were removed by M199/BSA washes. After total 24 hours, detached HUVECs were pooled and centrifuged. After one wash with cold PBS-Ca²⁺, cells were suspended in AV binding buffer (100 mM Hepes, pH 7.4, 1.5 M NaCl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 18 mM CaCl₂) containing 5 µl AV-

FITC-conjugate and 1 $\mu\text{g/ml}$ PI for 15 minutes at room temperature. We analyzed 10.000 events in the gate, after exclusion of cell debris. Internal controls were performed each time (unstained cells, cells stained with AV-FITC (no PI) and cells stained with PI (no AV-FITC).

Quantification of endothelial cells bearing pyknotic nuclei.

HUVECs incubated with different matrices for 24 hours were fixed with formaldehyde 3.7%, permeabilized with Triton X-100 0.2% and stained with DAPI (1 $\mu\text{g/ml}$ in PBS). The number of pyknotic nuclei and intact nuclei were counted using a fluorescence microscope (magnification: 20 $\times$). Each condition was performed in triplicate slides. Random quantification of ten fields was done and expressed as the relation between pyknotic nuclei (PN) and intact nuclei (IN).

Isolation of extracellular vesicles (EVs)

After 24h HUVEC incubation with extracellular autologous or astrocytoma matrices, the supernatant was collected and submitted to 500 $\times g$ centrifugation for 10 minutes, for removal of cell bodies and cellular debris. The supernatant was collected and submitted ultracentrifugation (100,000 $\times g$), for 4 hours, at 4°C. Pellets containing the microvesicle fraction were labeled with annexin V-FITC. Calibration beads (<1 μm) were used to delimit the desired gate (Rautou et al, 2011).

Tracking analysis of EVs

After EVs isolation, samples were quantified by nanoparticle tracking analysis (NTA) using a Zetaview S/N 205 realtime particle analysis equipment (Particlemetrix, GmBH) according to the manufacturer instructions. Briefly, EVs-containing samples were diluted in 1 mL PBS and

injected into the sample chamber in suitable dilutions (around 100 samples per field) with a hypodermic syringe. Eleven different fields of the sample chamber were recorded in digital video and analyzed by the ZetaView 8.02.31 software, using a sensitivity of 85%.

In vitro tubulogenesis assay

HUVECs (2×10^5 cells) previously incubated for 24 hours with immobilized matrices produced by the astrocytoma U-373 MG, or *tubulogenesis-defective endothelial cells* (TDEC), were seeded in triplicate wells onto Matrigel (growth factor reduced, BD Biosciences, São Paulo, Brazil), in M199 medium supplemented with 5% FCS. Then, conditioned media (containing variable amounts of apoptotic HUVECs or EVs), or purified EVs were immediately added to the culture. After 18 hours, cells were fixed in 1.1% glutaraldehyde in PBS for 10 minutes, followed by three washes with PBS, and the total number, length and bifurcations of tube-like structures/well was counted, by three independent observers. In some experiments, conditioned media were depleted for EVs by ultracentrifugation ($100,000 \times g$), for 4 hours, at 4°C.

Chemotaxis assay

For cell migration (chemotaxis) analysis *in vitro*, TDECs were seeded on upper chamber at a density of 4×10^4 cells/well, in 48-well modified Boyden chambers containing a polycarbonate membrane (pore size, 8 μm ; Neuroprobe, Inc., Gaithersburg, MD, USA), and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 4 h. We used EVs from HUVEC seeded onto autologous ECM or U373 ECM at a density of 50 EVs/ μl . Were added to the lower chamber medium 199 pure, medium 199 with 10%FCS or EVs. In some conditions, TDECs were incubated with 50 EV/ μl to migrated toward medium 199 with 10% FCS (in lower chamber). The cells that migrated to the lower membrane surface were fixed and stained using Wright-Giemsa stain

and counted by light microscopy (400×), in an Olympus BX41 light microscope (Tokyo, Japan).

In vitro migration time-lapse videomicroscopy assays

HUVECs (2×10^5) were seeded onto plastic and after 24h, serum was removed and astrocytoma ECM-induced apoptotic HUVECs (1×10^5) were added. Image caption was performed by a digital CCD camera (Hamamatsu C2400) connected to a Nikon TE 300 phase-contrast optical microscope at 37°C and at 5% CO₂. For short migration assay (about 10 minutes), a single apoptotic endothelial cell was brought to the proximity (at a distance under 100 µm) of viable endothelial monolayer using optical tweezers. We captured one frame at each 15 seconds. For a longer migration test (about 30 minutes), we captured one frame at each 5 seconds.

Short-term Matrigel™ time-lapse videomicroscopy assay

HUVECs (2×10^5) were seeded onto Matrigel (growth factor reduced, BD Biosciences, São Paulo, Brazil) with 5% FCS and cells were allowed to incubate for 4 hours, before image captions. After that, glioma ECM-induced apoptotic HUVECs (1×10^5) were added to the culture. One frame every minute was captured.

RESULTS

Apoptotic endothelial cells induce endothelial cell migration

Weihua and co-works (2005) had shown that, under a distance of 200 µm of proximity, apoptotic endothelial cells can induce sprout formation. Here, we tested whether endothelial cells rendered apoptotic by *anoikis*, after incubation with astrocytoma ECM could

induce the migration of healthy endothelial cells *in vitro*. We added to the culture 50% of apoptotic endothelial cells and time-lapse videomicroscopy was performed. Using optical tweezers and time-lapse videomicroscopy, we were able to positioning single apoptotic cells near viable endothelial monolayers, within distances $<100\ \mu\text{m}$. Figure 1 shows a representative record, using this approach: after 3 minutes, we were able to observe endothelial cells migrating toward manipulated apoptotic cells (Fig. 1A). From 5 to 30 minutes of time-lapse videomicroscopy recording, we registered images of migrating endothelial cells that were highly suggestive of the establishment of new contacts with other endothelial cells, adjacent to the place where the apoptotic cell had been positioned by the optical tweezers (Fig. 1B).

Apoptotic endothelial cells guide the formation of endothelial sprouts in vitro

In order to investigate whether apoptotic cells exerted any effect in the ability of viable endothelial cells to establish network-like connections, thus possibly modulate the ability of endothelial cells to form tube-like structures, we combined the time-lapse videomicroscopy recording with a 3-D Matrigel assay (Figure 2). For better tracking of apoptotic cells, they were digitally colored (blue, red and green colors; the same figure with the uncolored apoptotic endothelial cells is available as supplementary data - Fig. S1). Four hours after seeding cells on Matrigel, when some initial sprouts could be observed, apoptotic endothelial cells were added to Matrigel pellets ($t = 0$ minutes). Interestingly, after 23 minutes, when all endothelial apoptotic cells added had reached the Matrigel pellet, they appeared positioned between the sprouts in formation (Figure 4, 23-200 minutes), as images were suggestive of their participation in branching organization (details of this analysis are provided in the legend for Figure 2).

Apoptotic endothelial cells increase tubulogenesis in vitro in a dose-dependent manner

As we have previously shown, the tenascin-C-rich extracellular matrix secreted by the U-373 MG astrocytoma cell line selects a particular subpopulation of endothelial cell, that become defective for tubulogenesis (Alves et al, 2011). Since we observed that endothelial cell sprouting could be modulated by the presence of the dead endothelial cells that underwent *anoikis* (induced by the ECM secreted by the astrocytoma cell line U-373-MG), we decided to investigate the formation of tube-like structures by these tubulogenesis-defective endothelial cells (TDECs), when they were exposed to increasing amounts of apoptotic cells, by performing a long-term (16-18 hours) Matrigel tubulogenesis assay. Added apoptotic cells were expressed as percentages of total TDECs seeded on Matrigel pellets. We found that there was a significant increase in the number of tube-like structures when the ratio of dead to TDECs was set at 1:3 to 1:2 (Figure 3A). However, all apoptotic cells amounts added (10-50%) increased about 4-fold the number of structure bifurcations (Fig. 3B). The presence of bifurcations is an important criterion for evaluating the level of network branching.

Endothelial anoikis induced by astrocytoma ECM promotes the shedding of extracellular vesicles (EVs)

In the last few years, the relationship between the apoptotic process and the biogenesis of extracellular vesicles (EVs) has become increasingly evident (Minciacchi et al, 2015; Ciardiello et al, 2016). We have previously shown that endothelial cell death by *anoikis* was consistently induced by the ECM produced by either established astrocytoma cell lines (U-373 MG, A172 or U87), or by primary derived cells grown from human astrocytoma explants (GBM02, GBM03, GBM95) (Alves et al, 2011). Nevertheless, the impact of EVs in

angiogenesis, in the context of the endothelial *anoikis* induced by the matrix of these clinically relevant tumors, has not been covered by the literature so far.

Thus, we decided to elucidate and characterize the presence of EVs in the conditioned medium of cells rendered apoptotic after 24 hours incubation with the ECM secreted by U-373 MG tumor cells, as compared to the conditioned medium of endothelial cells incubated with their own produced ECM (autologous matrix). In order to ensure that EVs would be isolated from cell cultures undergoing *anoikis*, we quantified cell adhesion in all samples after 24 hours of incubation, and also the amount of cells bearing pycnotic nuclei, a hallmark of advanced apoptosis (Figure 4A & 4B). Deadhesion induced by astrocytoma ECM was $\approx 60\%$ greater than in endothelial cells incubated with their autologous matrix (Fig. 4A). Accordingly, the ratio *pycnotic nuclei: intact nuclei* (PN:IN) of endothelial cells seeded on glioma matrix was 93% higher than the one exhibited by cells seeded on autologous matrix (Fig. 4B).

Having confirmed the apoptotic nature of our starting material, conditioned media containing dead cells and cellular fragments - besides an expected variety of lighter particles/vesicles released by cells (viable or damaged) - were fractionated and purified by ultracentrifugation. Samples were then analysed for the presence of extracellular vesicles (EVs) up to 1 μm in size, by flow cytometry. We observed the incubation of endothelial cells with astrocytoma-derived matrix provoked a 2.8-fold increase in EVs release, as compared to endothelial cells incubated with their autologous matrix (Fig. 4C & 4D). Samples were quantified by nanoparticle tracking analysis (Fig. 4E). By this technique, we also found a larger amount (2.46 fold increase) of EVs in samples isolated from endothelial cells previously incubated with astrocytoma ECM.

EVs derived from astrocytoma-induced endothelial anoikis support endothelial tubulogenesis and migration

Since we demonstrated that endothelial *anoikis* proceed with a massive production of EVs, we asked whether the induction of endothelial migration and tubulogenesis by apoptotic cells, observed in the later experiments (Figs. 1-3) could be related to EVs generation by apoptotic cells. Using again the Matrigel tubulogenesis assay, we found that EVs produced by endothelial cells that underwent *anoikis* on astrocytoma matrix significantly increased tubulogenesis of TDECs (Figure 5A & 5C). The depletion of EVs (generated on autologous or tumor ECM) completely abrogates their positive effect on tubulogenesis (Figure 5B & 5C). However, this induction was not significantly different from the stimulation obtained when EVs were isolated from endothelial cells incubated with the autologous matrix (thus, from healthy, non apoptotic cells).

Upon first consideration, this result would be suggestive of no major qualitative differences between EVs generated by endothelial cells growing either on autologous or tumor matrices. But, interestingly, both types of EVs greatly differed in their actions, when the functional approach used was a chemotactic assay. TDECs migrated significantly more towards EVs isolated from endothelial cells previously incubated with astrocytoma ECM, as compared with EVs isolated from non-apoptotic endothelial cells (Figure 6). The stimulation of TDECs by EVs produced by apoptotic cells was even comparable to the one achieved when 10% FCS (a positive control) was used as chemoattractant. This result suggests that EVs released by apoptotic cells may be qualitatively different from EVs produced by healthy, adherent endothelial cells, with potential repercussions for the angiogenic process.

DISCUSSION

In angiogenesis, a variety of factors cooperate to regulate neovessel formation and persistence. The ECM not only information about local microenviroment but also provides anchorage and signaling for endothelial cells (ECs) survival. In tumor angiogenesis, the abnormal composition of ECM can be sufficient to induce apoptosis. Alves and co-workers (2011) described the effect of human glioma produced immobilized extracellular matrix (ECM) on the behavior of human endothelial cells: cell detachment and apoptosis of endothelial cells by anoikis and selection of enhanced endothelial proliferative although less capable of performing tubulogenesis. Thus, the survival of ECs is intimately tied to their local microenvironment and, in particular, the presence of survival promoting growth factors and extracellular matrix protein.

In physiologic conditions, apoptotic endothelial cells are able to trigger a sequence of important events for angiogenesis and vascular remodeling (Wietecha et al, 2013). Here, we observed that apoptotic cells are able to attract migrating endothelial cells. Also, apoptotic endothelial cells seemed to be intermingled between forming sprouts, in Matrigel 3-D assay. We confirmed this ability to inducing a pro- angiogenic behavior by challenging a tubulogenesis-defective population of endothelial cells (TDECs) with EVs isolated from both apoptotic and healthy endothelial cells. EVs from both origins were seemingly able to mediate intercellular communication events that contributed to improve the tubulogenic response of TDECs. However, since the amount of EVs produced in the pro-apoptotic environment provided by the TN-C-rich astrocytoma matrix is three-fold higher than the amount generated by cells incubated with their autologous endothelial matrix, one can expect that the effect of EVs would be physiologically relevant in tumors.

In contrast, EVs derived from conditioned medium of endothelial cultures undergoing *anoikis* significantly and distinctively induced TDECs migration. Roles have been proposed for extracellular vesicles actively released from different cells during angiogenesis. Indeed, most studies demonstrated that EVs derived from tumor cells stimulate the secretion of proangiogenic factors by stromal cells and facilitate the proliferation of endothelial cells, thus promoting angiogenesis and allowing tumor growth (Turturici et al, 2014). For example, glioblastoma EVs are enriched in angiogenic proteins such as fibroblast growth factor (FGF), interleukin (IL)-6 and VEGF and stimulate angiogenesis *in vitro* in a brain microvascular endothelial tube formation assay (Skog, et al, 2008). Similarly, B16–F10 melanoma derived EVs induce production of pro-angiogenic cytokines including IL-1 α , FGF and tumour necrosis factor alpha (TNF α) by 2F-2B endothelial cells, which results in increased formation of endothelial spheroids and sprouts (Hood et al, 2009). However, literature that addresses the autocrine role of EVs on endothelial cell differentiation, in the context of matrix microenvironments able to induce *anoikis*, is rather scarce (Kholia et al, 2016). The characterization of the content of the EVs generated by cells undergoing detachment-induced apoptosis, used in the present work, is currently under investigation in our laboratory.

In summary, our data suggest that endothelial apoptosis induced by altered tumor ECM may generate an advantageous autocrine signaling mechanism, through shedding or secretion of endothelial extracellular microvesicles that, ultimately, could favor the angiogenic balance.

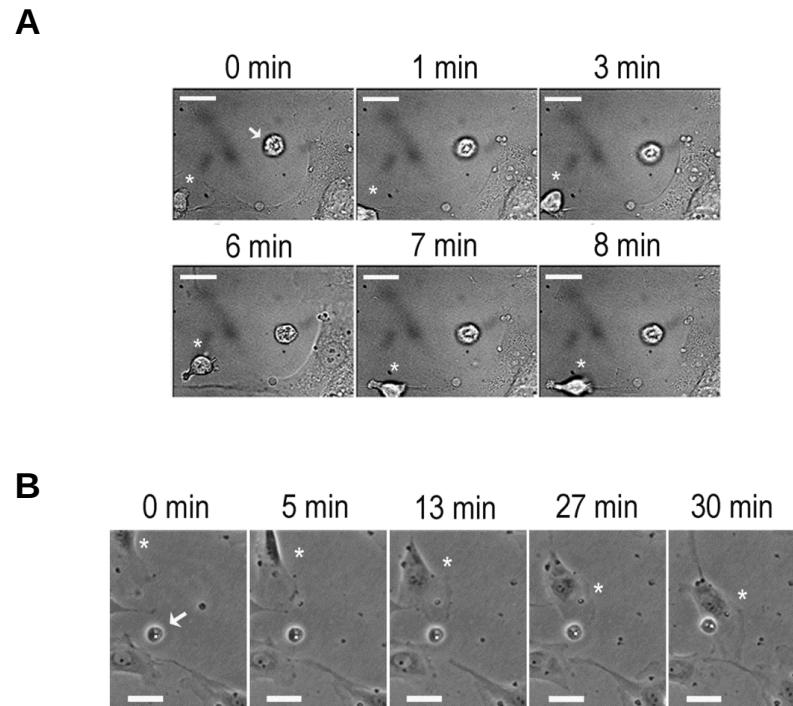


Figure 1 – Induction of endothelial cell migration by endothelial apoptotic cells. Using optical tweezers and time-lapse videomicroscopy, we were able to positioning single apoptotic cells near viable endothelial monolayers. In **(A)**, an apoptotic endothelial cell is positioned near the endothelial monolayer (arrow). Within few minutes, a migrating endothelial cell can be observed (star), which starts to exhibit membrane extensions (6 minutes) and long filopodia (7-8 minutes). On another recording series **(B)**, another moving cell seems to establish cytoplasmic connections with another cell placed in the direction of a apoptotic cell displaced to the same direction. Bars represent 20 μm .

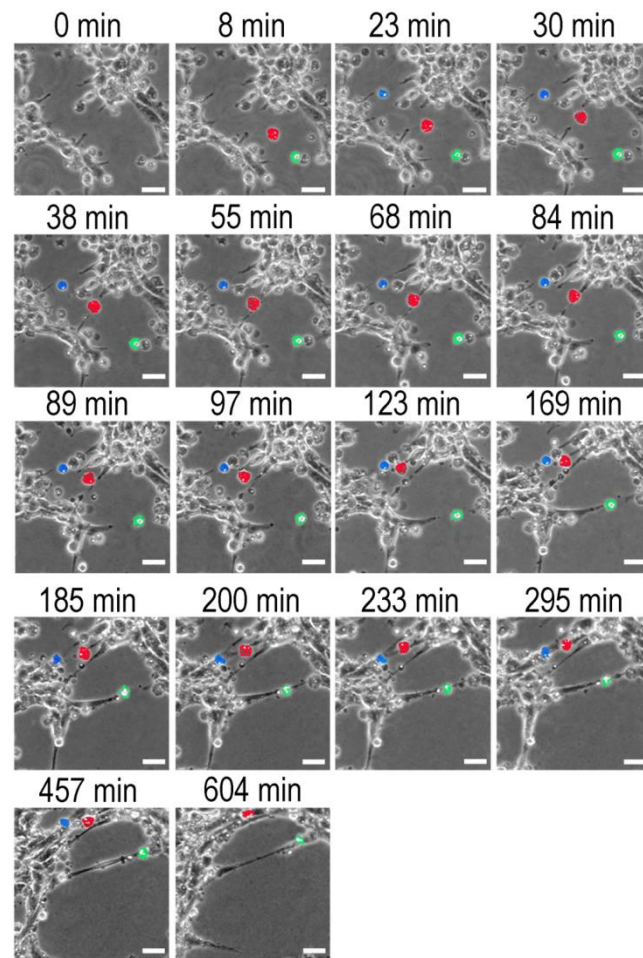


Figure 2 – Apoptotic endothelial cells induce endothelial sprouting. Endothelial cells rendered apoptotic by *anoikis*, after incubation with immobilized matrix secreted by U-373-MG astrocytoma cells, were used in this experiment. Using optical tweezers and time-lapse videomicroscopy, it was possible to track apoptotic cell-guided sprouting events. In these images, the apoptotic cell digitally colored in red had linked two nascent sprouts by 30 minutes of assay. These sprouts joined each other after apoptotic red cell displacement (89-169 min). Red cell initiates the same process at another forming sprout (123-233 min). By 457-604 minutes, the red cell exhibited a typical apoptotic cell shrinkage and fragmentation appearance. Similar sprout-like structures can be observed with the blue and green endothelial apoptotic cells. Bars represent 20 μm .

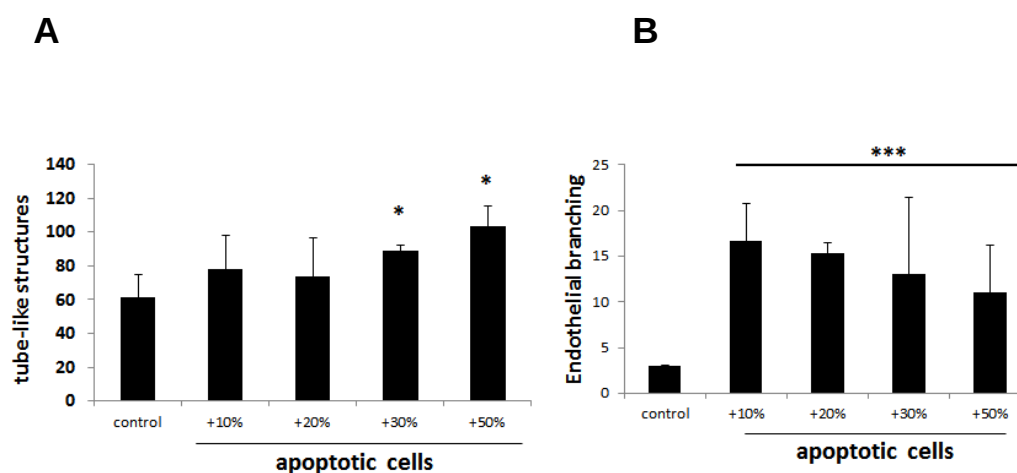


Figure 3- Apoptotic endothelial cells improve tubulogenesis in tubulogenesis-defective endothelial cells (TDECs): TDECs were prepared by seeding HUVECs on immobilized extracellular matrix secreted by U-373 MG astrocytoma cells, as described in the *Material and Methods* section, and then submitted to the Matrigel assay, in the presence of the indicated amounts of apoptotic endothelial cells undergone anoikis. After 16 hours, were fixed in 1.1% glutaraldehyde in PBS and the total number of tube-like structures/well (**A**) and total number of endothelial bifurcations (**B**) were counted, by two independent observers. Determinations were done in quadruplicate for each condition. N=3. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

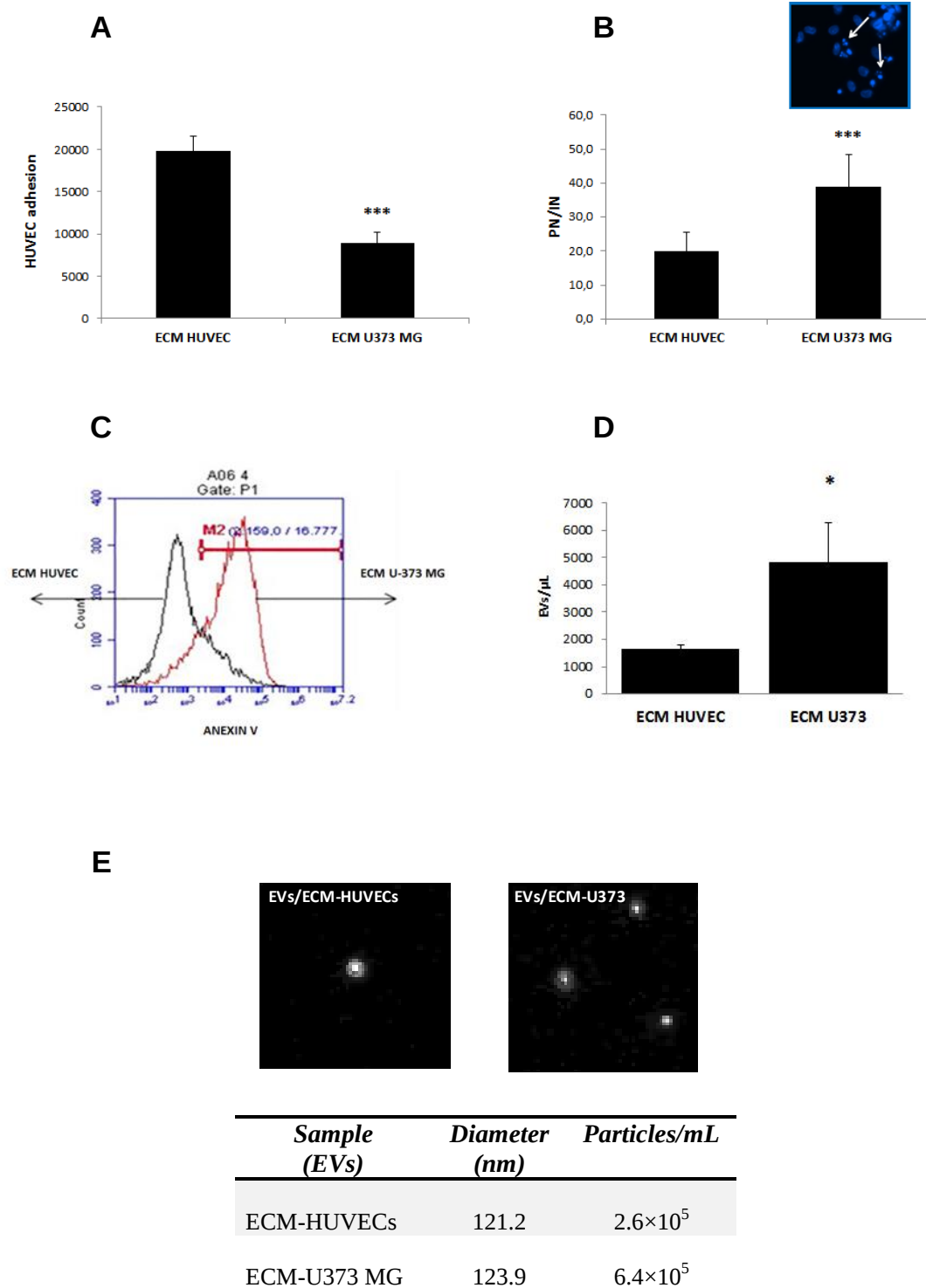


Figure 4- Quantification and size characterization of extracellular vesicles (EVs) isolated from endothelial conditioned media. (A) HUVECs were seeded either onto autologous ECM or the matrix secreted by U-373 MG astrocytoma cells. (B) Whole conditioned media containing detached cells exhibiting pycnotic nuclei in either condition were fractionated and used to isolate EVs by ultracentrifugation. The amount and size of EVs was determined by either FACS analysis (C,D) or nanoparticle tracking analysis (NTA) (E), as described in the *Material and Methods* section. PN = cells bearing pycnotic nuclei; IN = cells bearing intact nuclei.

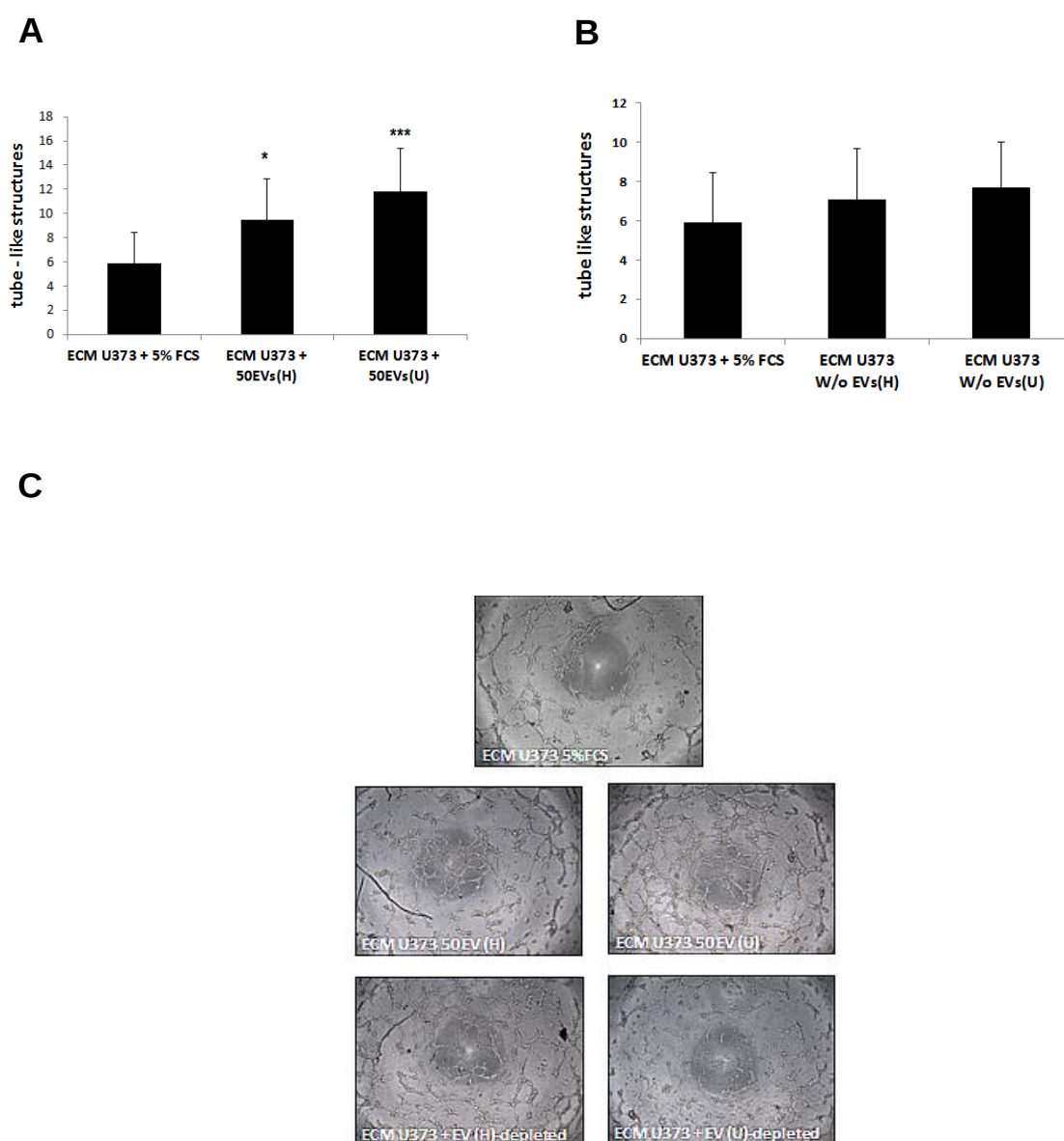


Figure 5- Induction of tubulogenesis by EVc isolated from endothelial cells rendered apoptotic by *anoikis*. (A) TDECs were prepared by seeding HUVECs on immobilized extracellular matrix secreted by U-373 MG astrocytoma cells, as described in the *Material and Methods* section, and then submitted to the Matrigel assay in the presence of the indicated amounts of EVs. EVs were isolated either from HUVECs detached from their autologous matrix (H) or from U-373 MG matrix (U). After 16 hours, cells were fixed in 1.1% glutaraldehyde in PBS and the total number of tube-like structures/well was counted. (B) The same approach was performed after depletion of EVs from incubation media. (C) Morphological aspect of TDECs on Matrigel pellets after 16 hours (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

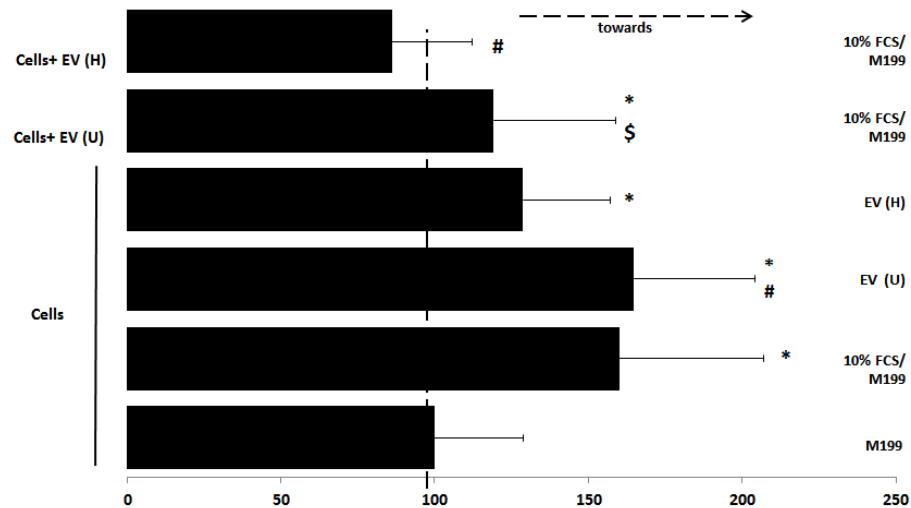


Figure 6- EVs isolated from endothelial cells rendered apoptotic by *anoikis* induces TDECs chemotaxis. TDECs were prepared by seeding HUVECs on immobilized extracellular matrix secreted by U-373 MG astrocytoma cells and then submitted to a chemotaxis assay in a modified Boyden chamber, as described in the *Material and Methods* section. EVs, isolated either from HUVECs detached from their autologous matrix (H) or from U-373 MG matrix (U) (50 EVs/ μ L), were incubated with different compartments of the system, as indicated. Cells were allowed to migrate for 4 hours. (*) p<0.05, as compared to M199 (serum-free medium); (#) and (\$) p<0.05, as compared with cells incubated with EV(H) in the upper chamber.

FIGURE S1

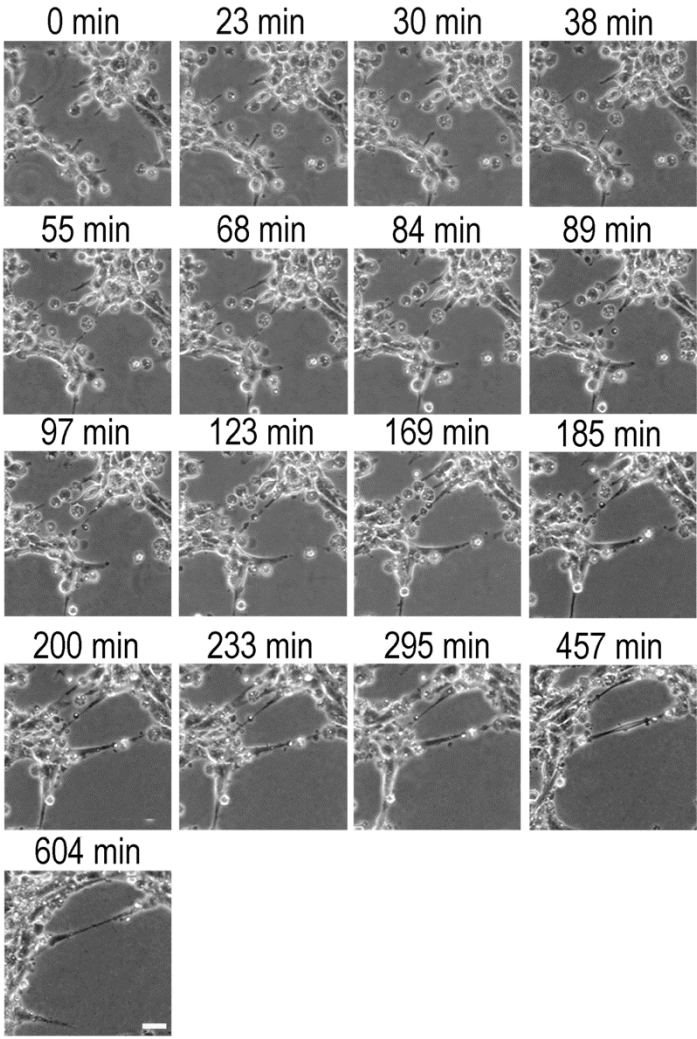


Figure S1 – Untagged images version for Figure 2

References

- Alves TR, da Fonseca AC, Nunes SS, da Silva AO, Dubois LG, Faria J, Kahn SA, Viana NB, Marcondes J, Legrand C, Moura-Neto V, Morandi V. (2011). Tenascin-C in the extracellular matrix promotes the selection of highly proliferative and tubulogenesis-defective endothelial cells. *Exp Cell Res.* 317(15):2073-85
- Chavakis E, Dimmeler S. (2002) Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22(6):887-93.
- Ciardiello C, Cavallini L, Spinelli C, Yang J, Reis-Sobreiro M, de Candia P, Minciocchi VR, Di Vizio D. (2016) Focus on Extracellular Vesicles: New Frontiers of Cell-to-Cell Communication in Cancer. *Int J Mol Sci.* 17(2):175.
- Denizot F, Lang R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods.* 89(2):271-7.
- Hina Kalra, Gregor P. C. Drummen, and Suresh Mathivanan (2016) Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int J Mol Sci.* 17(2): 170.
- Hood JL, Pan H, Lanza GM, Wickline SA; Consortium for Translational Research in Advanced Imaging and Nanomedicine (C-TRAIN) (2009) Paracrine induction of endothelium by tumor exosomes. *Lab Invest.* 89(11):1317-28.
- Huang D, Lan H, Liu F, Wang S, Chen X, Jin K, Mou X. (2015) Anti-angiogenesis or pro-angiogenesis for cancer treatment: focus on drug distribution. *Int J Clin Exp Med.* 8(6):8369-76.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.* 52(11):2745-56.
- Kahlert C, Kalluri R. (2013) Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)* 91(4):431-7.
- Kholia S1, Ranghino A1, Garnieri P2, Lopatina T1, Deregibus MC1, Rispoli P2, Brizzi MF1, Camussi G3 (2016) Extracellular vesicles as new players in angiogenesis. *Vascul Pharmacol.* pii: S1537-1891(15)30105-1
- Martinez MC, Andriantsitohaina R (2011) Microparticles in angiogenesis: therapeutic potential. *Circ Res.* 109(1):110-9.
- Minciocchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. (2015) Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. Minciocchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. *Semin Cell Dev Biol.* 40:41-51.
- Morandi V, Cherradi SE, Lambert S, Fauvel-Lafève F, Legrand YJ, Legrand C. (1994); Proinflammatory cytokines (interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha) down

regulate synthesis and secretion of thrombospondin by human endothelial cells. *J Cell Physiol.* 160(2):367-77.

Ramachandran S, Palanisamy V. (2012) Horizontal transfer of RNAs: exosomes as mediators of intercellular communication. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 3(2):286-93.

Rautou PE, Vion AC, Amabile N, Chironi G, Simon A, Tedgui A, Boulanger CM. (2011) Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ Res.* 109(5):593-606.

Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.*10(12):1470-6.

Soleti R, Benameur T, Porro C, Panaro MA, Andriantsitohaina R, Martínez MC. (2009) Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis* 30(4):580-8.

Turturici G, Tinnirello R, Sconzo G, Geraci F. (2014) Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *Am J Physiol Cell Physiol.* 306(7):C621-33.

Vader P, Breakefield XO, Wood MJ. (2014) Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. *Trends Mol Med.* 20(7):385-93.

Vaupel P, Mayer A. (2007) Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* 26(2):225-39.

Wang Y, Jiang T. (2013) Understanding high grade glioma: molecular mechanism, therapy and comprehensive management. *Cancer Lett.* 331(2):139-46.

Weihua Z, Tsan R, Schroit AJ, Fidler IJ. (2005) Apoptotic cells initiate endothelial cell sprouting via electrostatic signaling. *Cancer Res.* 65(24):11529-35.

Wietecha MS, Cerny WL, DiPietro LA. (2013) Mechanisms of vessel regression: toward an understanding of the resolution of angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 367:3-32

Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Köppel T, Jahantigh MN, Lutgens E, Wang S, Olson EN, Schober A, Weber C. (2009) Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal.* 2(100):ra8

4 DISCUSSÃO

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. As principais fontes destes sinais ambientais são as interações entre a célula e a MEC (Eckes *et al.* 2010).

Mecanismos reguladores garantem a produção, degradação e remodelamento da MEC durante o desenvolvimento e funcionamento normal dos órgãos (McCaw *et al.* 2007). A ruptura de tais mecanismos de controle desregula e desorganiza a MEC, levando a comportamentos anormais das células e consequentemente ao fracasso da homeostase. Na verdade, anormalidades na MEC são um dos resultados clínicos mais ostensivos em diversos tipos de tumores (Cox e Erler, 2011). Um grande desafio atualmente é entender como a perturbação da dinâmica da MEC pode contribuir para essas doenças.

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). Além disso, 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 as células endoteliais humanas (HUVECs) da apoptose mediada por Fas/FasL, ao passo que células mantidas em suspensão ficam suscetíveis à apoptose mediada por Fas (Aoudjit e Vuori, 2005).

A maioria das glicoproteínas da MEC, como por exemplo, a fibronectina, a laminina, o colágeno e a vitronectina, promove a adesão celular e reorganização do citoesqueleto, levando a sinais que estão diretamente envolvidos na diferenciação e na sobrevivência celular. No entanto, existe outra classe de proteínas da MEC, as proteínas matricelulares que, em geral, não são constituintes estruturais permanentes da MEC, mas podem ter sua expressão modificada por diferentes estímulos, funcionando como moduladores das interações célula-matriz. Muitas delas possuem atividade anti-adesiva e, neste grupo bastante heterogêneo, estão as tenascinas, SPARC (proteína ácida secretada e rica em cisteína) e trombospondinas (TSP), cuja expressão aumenta durante o desenvolvimento, após lesões teciduais e durante o desenvolvimento tumoral. A classe das proteínas matricelulares inclui ainda a osteopontina;

os membros da família CCN (Cyr61, CCN2, CCN3); a periostina; as R-spondinas; as fibulinas curtas (ex.: hemicentina); as galectinas; os pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRPs); a autotaxina; o fator derivado de epitélio pigmentar (PEDF) e o inibidor-1 do ativador de plaminogênio (PAI-1) (Murphy-Ullrich e Sage, 2014).

A MEC secretada por gliomas difere qualitativa e quantitativamente da MEC do cérebro adulto normal (Ruoslahti, 1999; Castellani *et al.*, 2002; Bellail *et al.*, 2004). Nestes tumores, a MEC pode apresentar diferentes graus de expressão de TN-C, porém sua presença está sempre correlacionada com um péssimo prognóstico para o paciente, uma vez que sua presença aumenta com a gradação do tumor (Herold-Mende *et al.*, 2002; Leins *et al.*, 2003; Hirata *et al.*, 2009) e está correlacionada inversamente com a expressão da fibronectina (FN).

Efetivamente, na **Parte I** de nossos resultados, conseguimos verificar que astrócitos humanos não transformados secretam grandes quantidades de FN e níveis indetectáveis de TN-C, corroborando a literatura que indica o aumento de expressão da TN-C como um importante parâmetro da transformação tumoral, em alguns tipos de tumores sólidos (Xia S *et al.*, 2016). A importância dessa relação inversa entre os conteúdos de FN e TN-C na matriz de astrocitomas para a adesão e tubulogênese de células endoteliais foi demonstrada em nosso trabalho prévio (Alves *et al.*, 2011), no qual observamos que matrizes apresentando elevadas relações TN:FN resultavam em defeitos tubulogênicos nas células endoteliais incubadas com estas matrizes.

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, 2009). Embriões *knockout* para FN apresentam defeito na vasculogênese, com clara insuficiência nas etapas de formação do lúmen (Astrof e 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).

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 (Brösicke e Faissner, 2015).

A adesão celular tornou-se um mecanismo bastante investigado, envolvido na *anoikis*, na proliferação, migração e diferenciação celular (Murphy-Ullrich, 2001). Como um importante sensor do microambiente celular, os diferentes tipos de integrinas regulam numerosas vias de sinalização em resposta a variações na composição da MEC (Blandin *et al.* 2015). Por exemplo, adesão a fibronectina através de integrinas, promove a associação da proteína tirosina fosfatase (SPH2) com o receptor de fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGFR) levando a ativação sustentada de Ras e ERK1 (DeMali *et al.* 1999; Streuli, 2009). Sinais bioquímicos e biomecânicos da MEC transmitidas para as células através das integrinas são extensivamente modificados no microambiente tumoral. O repertório de integrinas é submetido a alterações do nível de expressão, tanto nas células tumorais quanto nas células do estroma do tumor (Hanahan e Weinberg, 2011).

As integrinas são as principais proteínas responsáveis por ligar as proteínas da MEC ao citoesqueleto de actina. Adicionalmente, como as integrinas não possuem atividade quinase intrínseca, moléculas de sinalização e adaptadores são recrutadas para as suas porções citoplasmáticas (Eke *et al.* 2012). A quinase de adesão focal (FAK) é recrutada para as regiões de adesão na membrana através da interação de seu domínio FAT com as proteínas talina e paxilina, associadas às integrinas. O recrutamento para a membrana leva à associação do domínio FERM com fosfolipídeos de membrana, liberando o sítio de autofosforilação Y397 e a alça de ativação (Frame *et al.* 2010). Desta forma, as integrinas podem regular a sobrevivência celular associando-se com a quinase de adesão focal (FAK), iniciando a sinalização MAPK/ERK (Streuli *et al.* 2009).

Dados anteriores do nosso grupo mostraram que as células endoteliais capazes de aderir à matriz de astrocitoma (U-373 MG) se encontravam na fase G0/G1 do ciclo celular. Levando em conta o conteúdo de TN-C e FN da matriz das células de astrocitoma, sugerimos que o mecanismo na base desse efeito biológico fosse a seleção de células endoteliais que apresentassem uma maior expressão integrinas capazes de ligar a TN-C.

Desta forma, resolvemos avaliar a expressão da integrina $\alpha 9\beta 1$, principal receptor de TN-C, nas células endoteliais que aderiram as diferentes matrizes. Observamos que a MEC da linhagem de astrocitoma humano (U-373 MG) selecionou células endoteliais com maior expressão desta integrina quando comparada com aquelas que aderiram a MEC autóloga. No presente trabalho, células endoteliais condicionadas pelas diferentes matrizes nativas imobilizadas mostraram diferenças tanto na cinética de ativação da FAK quanto da ERK. Embora a integrina $\alpha 9\beta 1$ utilize algumas proteínas adaptadoras - como FAK, Src e ERK - em comum com outras integrinas da subfamília $\beta 1$ (Gupta e Vlahakis, 2009), pudemos verificar

que o padrão de ativação de FAK e ERK foi muito diferente do observado quando o estímulo foi proporcionado pela matriz endotelial autóloga, rica em FN, sugerindo uma cinética de ativação mais lenta. Este resultado corroborou a hipótese da MEC tumoral permitir a adesão de uma subpopulação de células endoteliais que expressa um determinado perfil de integrinas e, conseqüentemente, levam a ativação diferenciada dessas vias de sinalização. No entanto, o significado funcional das diferenças observadas nas vias de sinalização que analisamos ainda precisa ser melhor investigado.

A cadeia $\alpha 9$ das integrinas, identificada em 1993, forma um dímero unicamente com a cadeia beta 1 e é uma das mais recentes integrinas dos vertebrados, em termos evolutivos (Palmer et al, 1993; Hoye et al, 2012). Apesar de pouca atenção ter sido dedicada até hoje aos mecanismos de ação desta integrina, o fato dela ser expressa por uma imensa variedade de tipos celulares como epitélio das vias aéreas, queratinócitos, células musculares (lisas, esqueléticas e cardíacas), hepatócitos, neutrófilos, osteoclastos e células endoteliais, entre outras, sugere que a integrina $\alpha 9\beta 1$ desempenhe um importante papel na maioria dos tecidos dos vertebrados (Hoye et al, 2012).

No endotélio em particular, foi demonstrado que a integrina $\alpha 9\beta 1$ é capaz de se ligar diretamente ao VEGF-A, -C e D (Vlahakis et al, 2005 e 2007), aumentando a ativação do receptor tirosina quinase VEGFR2. Mais recentemente, o mesmo grupo mostrou que o mesmo mecanismo “tripartite” que envolve a interação $\text{VEGF} \leftrightarrow \text{integrina} \leftrightarrow \text{VEGFR2}$ é responsável pela migração de células endoteliais, estimulada por VEGF-A (Oommen *et al.* 2011). Dessa maneira, sugerimos que o aumento de migração, igualmente estimulada por VEGF-A que detectamos nas células endoteliais selecionadas pela matriz de células U-373 MG (**Figura 26**) possa ser, em parte, explicada pelo mesmo mecanismo, possibilidade que procuraremos explorar nas próximas etapas desse trabalho.

Entretanto, a expressão de outras integrinas ligantes de TN-C precisa ser também avaliada em nosso modelo. Adicionalmente, mecanismos de interferência da TN-C na função da FN têm sido descritos em diferentes contextos celulares. Em fibroblastos, a TN-C liga-se à FN e inibe a adesão celular de forma RGD-independente (Chiquet-Ehrismann *et al.* 1988). Além disso, a ligação do sindecan-4 a um domínio C-terminal (Hep II) da FN, tem um papel crucial na estabilização da adesão focal (Woods e Couchman, 1994), em cooperação com a interação das integrinas com o domínio RGD (principalmente a integrina $\alpha 5\beta 1$) (Iwamoto e Calderwood, 2015). A TN-C pode competir com o sindecan-4 pela ligação ao domínio Hep II da FN, levando ao aumento ao relaxamento da adesão de células de glioma, com conseqüente aumento da proliferação tumoral (Huang *et al.*, 2001).

Além disso, a ligação da integrina $\alpha 5\beta 1$ com a fibronectina aumenta a expressão de FGF-2, que se liga a integrina $\alpha \nu\beta 3$ estimulando a adesão celular (Klein *et al.* 1996; Rusnati *et al.* 1997; Murakami *et al.* 2007). A importância da integrina $\alpha \nu\beta 3$ na formação de novos vasos foi descrita originalmente por Cheresch e colegas (Brooks *et al.*, 1994a e 1994b). De forma interessante, a TN-C também pode servir como ligante para a integrina $\alpha \nu\beta 3$, cuja principal função na angiogênese é a capacidade de manter seletivamente a viabilidade de células endoteliais, somente em ramos capilares em formação ou recém-formados (vasos imaturos) (Tucker e Chiquet-Ehrismann, 2015). Ainda, o Cilengitide, um potente inibidor seletivo das integrinas $\alpha \nu\beta 3$ e $\alpha \nu\beta 5$, foi recentemente avaliado em estudos clínicos (fases I e II), com resultados promissores (Batchelor *et al.*, 2014). Desta forma, pretendemos avaliar se o elevado conteúdo da TN-C na matriz de astrocitoma pode também modular a expressão e atividade de outras integrinas nas células endoteliais, além da integrina $\alpha 9\beta 1$.

O FGF-2 é um fator de crescimento pleiotrópico que também possui fortes propriedades angiogênicas sobre células endoteliais e induz seus efeitos através do receptor tirosina-quinase FGFR1 (Kottakis *et al.* 2011). Este receptor pode se associar com a integrina $\alpha \nu\beta 3$ formando um complexo que potencializa a sinalização via FGF-2, particularmente na ativação de ERK1/2 (Tanghetti *et al.* 2002).

O proteoglicano sindecan-4 tem um papel na sinalização induzida por FGFR1 em células endoteliais (Elfenbein *et al.* 2012). Em circunstâncias normais, o sítio Ser183 do sindecan-4 está fosforilado pela PKC δ , impedindo sua oligomerização. Entretanto, na presença de FGF-2 este sítio é desfosforilado, o que permite a oligomerização do sindecan-4, ligação ao PIP2 e ativação da PKC α (Takenko *et al.* 2005). Além disso, sítios de adesão entre a integrina $\alpha 5\beta 1$ e a fibronectina extracelular pode levar a maturação de unidades funcionais de sinalização e este processo depende da habilidade do sindecan-4 de ligar e ativar PKC α (Mostafavi-Pour *et al.* 2003).

Desta maneira, o fato de que em nossos resultados, ambos os receptores (FGFR1 e sindecan-4) estejam com seus níveis alterados no mesmo sentido - ou seja, diminuídos nas células endoteliais que foram incubadas sobre matrizes de astrocitoma - parece compatível com uma modulação coordenada de ambos.

A família das proteína-quinases C (PKCs) está envolvida no cruzamento de muitas vias de sinalização e por isso participa 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. Existe ainda um relato demonstrando que a PKC α 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 superexpressão de PKC δ em células endoteliais de ratos inibiu a diferenciação endotelial em matrigel, enquanto a inibição/ diminuição de expressão de PKC α 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 α (Vartanian *et al.* 2010). Considerando a participação dessas duas isoformas de PKC na tubulogênese, resolvemos investigar se a sinalização gerada pela MEC de astrocitoma nas células endoteliais envolveria a participação dessas PKCs.

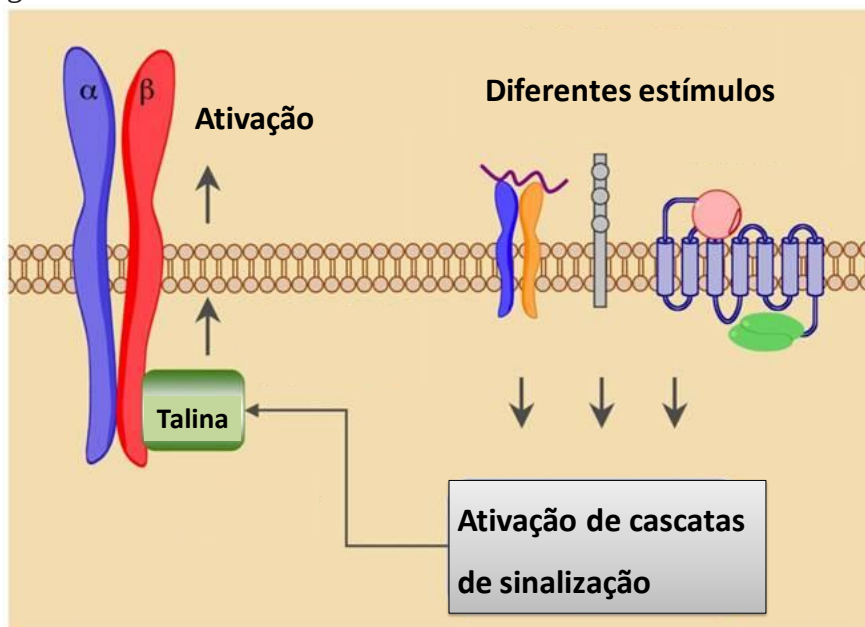
A ativação das PKCs é acompanhada pela sua translocação, isto é, o movimento da fração solúvel (citossol) para a fração particulada (membranar), composta por membrana plasmática e membranas de diversas organelas (Kraft, Anderson *et al.*, 1982; Saito e Shirai, 2002). No presente trabalho, pudemos demonstrar a participação da isoforma α por diversas estratégias experimentais, mostrando que: (i) esta quinase teve sua translocação para a fração membranar diminuída nas células que foram incubadas com MEC de astrocitoma U-373 MG; e (ii) diferentes moduladores farmacológicos que inibem ou ativam seletivamente as isoformas α ou δ foram capazes de direcionar a diferenciação endotelial de maneira compatível com a hipótese de que a formação de tubos endoteliais dependa da ativação de PKC α concomitante à inibição da PKC δ . Embora as imagens obtidas por microscopia confocal sugiram fortemente que a atividade “pró-tubulogênica” de PKC α esteja relacionada à sua localização na região nuclear – ainda que associada à membrana da organela – esta possibilidade ainda precisa ser corroborada por estudos mais detalhados de co-localização. Desta forma, podemos sugerir que a sinalização gerada pela MEC da linhagem de astrocitoma U-373 MG leva à deficiência na habilidade de formar estruturas tubulares nas células endoteliais, por um mecanismo que interfere na atividade de isoformas de PKC.

Além da diminuição da expressão do proteoglicano sindecan-4, que pode contribuir para a diminuição da atividade de PKC α , sabe-se ainda que a própria ativação de integrinas envolvidas nas adesões focais mediadas por FN geram atividade de PKC (Vuori e Ruoslahti, 1993; Lewis *et al.*, 1996). Este estímulo também pode ser proporcionado por receptores de

fatores de crescimento e GPCRs, ativados por seus ligantes específicos, levando à ativação *inside-out* de outras integrinas, mediada por talina: sob esses estímulos, ativada por PKC, a talina é rapidamente recrutada para a membrana plasmática, onde estabiliza os agregados (“clusters”) de integrinas no estado ativado (Kim e Ginsberg, 2011 e 2012). Assim, PKC α , Rap1A, RIAM e fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) têm um importante papel na ativação de integrinas e na localização da talina na membrana plasmática.

Desta forma, o conjunto de resultados apresentado até este ponto sugere que o defeito na formação de estruturas tubulares nas células endoteliais que foram incubadas com a MEC da linhagem de astrocitoma U-373 MG, possa ser explicada pela ausência de sinalização de um conjunto de integrinas impossibilitadas de serem ativadas nesta condição, devido à composição desta matriz tumoral, deficiente em FN. Desta forma, o tratamento com PMA, ativador de PKC α , teria um papel fundamental na ativação *inside-out* dessas integrinas e consequentemente na ativação de vias de sinalização essenciais para a restauração da capacidade de formar estruturas tubulares nestas células (**Figura 29**).

Figura 29 - Sinalização "Inside -out" promove ativação da integrina e aumenta a afinidade ao ligante



Legenda: Estímulos externos, tais como ligação de integrinas a proteínas de matriz, ligação via selectinas ou ainda ligação de citocinas a receptores acoplados à proteína G, desencadeiam cascatas de sinalização que convergem para a cauda da subunidade β da integrina. Os sinais de ativação induzem alterações conformacionais nas caudas da integrina que facilitam o encaixe de componentes de adesão focal, como a proteína Talina. As mudanças conformacionais na região da cauda são transduzidas com o rearranjo estrutural do domínio extracelular que promovem a ativação e o aumento da afinidade para o ligante.

Fonte: Adaptado de Millard *et al.* 2011

Como já mencionado anteriormente, a formação de estruturas vasculares funcionais requer dois tipos de células endoteliais com diferentes morforlogia e propriedades funcionais: as células líderes (*tip cells*), que guiam direcionalmente a formação de ramificações vasculares e as células da haste (*stalk cells*), responsáveis pela formação do lúmen vascular. Células endoteliais líderes são caracterizadas pela sua posição na extremidade dos brotos angiogênicos, bem como pela presença de filopódios que funcionam como sensores de pistas angiogênicas atrativas como o VEGF-A (Hellström *et al.* 2007), distinguem das células *stalk*, por níveis mais elevados de expressão de VEGFR2 (Gerhardt *et al.* 2003).

Muitas células tumorais humanas expressam VEGF-A, e o seu principal receptor (VEGFR-2) é altamente expresso em células endoteliais comprometidas com a angiogênese tumoral (Ferrara e Kerbel, 2005; Kerbel, 2008). Para que ocorra uma expansão organizada da vasculatura, o número de células líderes deve ser limitado. No entanto, em situações patológicas como, por exemplo, na angiogênese tumoral, a organização deste processo é geralmente interrompida por qualquer excesso de produção de sinais pró-angiogênicos, ou pela falta de inibidores angiogênicos, conduzindo assim à formação excessiva de células endoteliais líderes que não assumem um fenótipo quiescente associado com uma vasculatura saudável. Como resultado deste desequilíbrio, os vasos sanguíneos do tumor exibem muitas anormalidades estruturais e funcionais, incluindo tortuosidades e hiperpermeabilidade (Nagy *et al.* 2012), pouca cobertura de pericitos e célula muscular lisa, além de má perfusão (Hosaka *et al.* 2013; Hedlund *et al.* 2013).

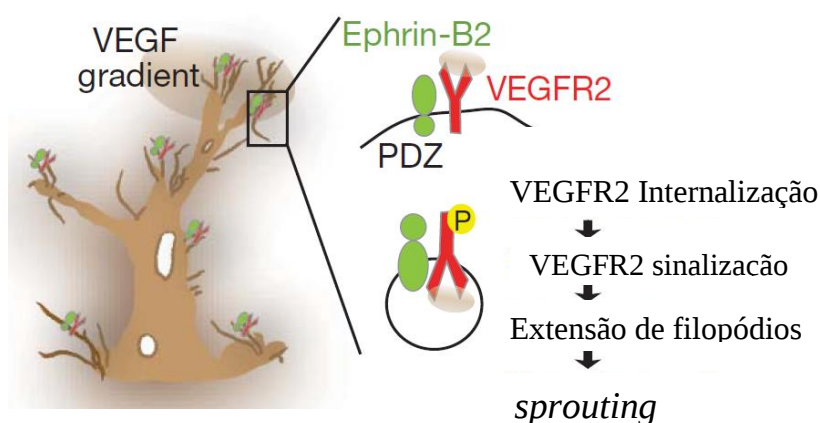
Neste trabalho, observamos que as células endoteliais que foram incubadas com a MEC da linhagem de astrocitoma U-373 MG, apresentaram maior expressão do receptor VEGFR2 quando comparada com as células endoteliais que foram semeadas sobre a MEC autóloga. Para testar a hipótese de que a deficiência na capacidade de formar estruturas vasculares nas células endoteliais incubadas com a MEC de astrocitoma U-373 MG poderia ser devida à uma possível desproporção entre células com fenótipos compatíveis com o de células líderes e células da haste, fizemos ensaios funcionais de migração e tubulogênese com essas células, porém na presença de estímulos angiogênicos.

Observamos que as células endoteliais previamente incubadas com a MEC da linhagem de astrocitoma U-373 MG, na presença de VEGF-A, possuem uma maior capacidade migratória em direção ao estímulo, porém se tornam ainda mais deficientes na formação de estruturas tubulares. Este efeito parece específico para o VEGF-A, uma vez que as células respondem positivamente, formando mais estruturas, quando estimulada pelo FGF-2, um outro fator de crescimento com características angiogênicas. Conforme já discutimos aqui, o

estímulo a uma maior migração, pelo VEGF-A, pode ter relação com a maior expressão da integrina $\alpha\beta 1$ nessas células. No entanto, a falha na tubulogênese em resposta ao VEGFA poderia ser explicada por um excesso de células expressando um fenótipo similar ao de células líderes, prejudicando assim a formação das estruturas tubulares. Essas células já expressavam níveis elevados de VEGFR2, conforme já discutido.

Na análise da expressão global de transcritos das células endoteliais que foram incubadas com diferentes matrizes, encontramos um padrão diferenciado de expressão de transcritos de genes como *EFNB2*, *PLXD1* e *DLL4*, cujas proteínas codificadas são participantes da via sinalização Notch/Dll4, envolvida no destino fenotípico (*tip* ou *stalk*) da célula endotelial. Os transcritos desses genes estão significativamente **aumentados** nas células endoteliais que foram estimuladas pela MEC de astrocitoma U-373 MG. Por exemplo, a efrina B2 (gene *EFNB2*), um ligante transmembrana localizado em *clusters* nos filopódios de células líderes, se liga em um receptor que possui atividade intrínseca necessária para o remodelamento angiogênico (Pasquale *et al.* 2008; Adams *et al.* 1999; Adams *et al.* 2001). Sawamiphak e colaboradores (2010) demonstraram que a efrina-B2 induz a internalização e ativação de VEGFR2 em células endoteliais líderes, controlando a extensão dos filopódios e o brotamento de ramos vasculares (**Figura 30**)

Figura 30 - Função da efrina-B2 em células endoteliais líderes



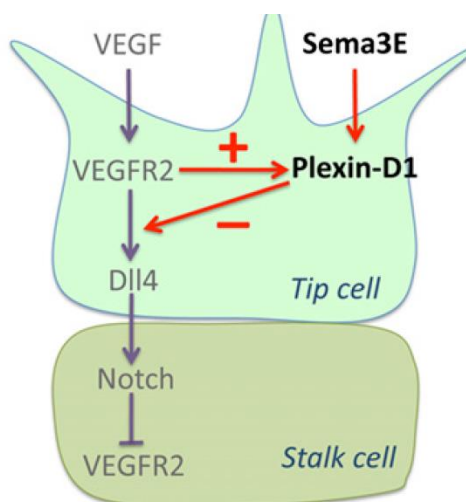
Legenda: Efrina-B2 (verde) expressa em células endoteliais líderes regula a internalização do VEGFR2 (vermelho) e a sinalização para o controle da extensão de filopódios e dos brotamentos.

Fonte: Adaptado de Sawamiphak *et al.* 2010.

Recentes estudos em ratos e peixe-zebra têm demonstrado que a via de inibição lateral clássica da sinalização Notch-Dll4 impede que as células da haste se tornem células líderes (Roca e Adams 2007; Thurston e Kitajewski, 2008; Phng e Gerhardt 2009). O fator de crescimento VEGF-A estimula a expressão de Dll4 (ligante de Notch) em altos níveis nas células líderes, que por sua vez se ligará ao Notch da célula adjacente e impedindo a aquisição do fenótipo líder (Hellstrom et al. 2007; Lobov et al. 2007; Suchting *et al.* 2007). Kin e colaboradores (2011), demonstraram que a plexina D1 (gene *PLXD1*) é seletivamente expressa em células endoteliais localizadas na frente de formação dos vasos e, sua expressão também é regulada pelo VEGF. A interação do ligante Sema3E à plexina D1 modula o balanço entre células líderes e da haste, ao regular negativamente a sinalização Dll4/ notch induzida por VEGF (**Figura 31**).

Desta forma, enquanto o ganho de função da sinalização Sema3E-Plexina D1 diminui a inibição lateral feita pela sinalização Dll4/Notch - aumentando assim o número de células líderes - a perda de função de Sema3E-plexina D1 induz a expressão de Dll4 e atividade Notch, diminuindo consequentemente a formação de células líderes.

Figura 31 - Modelo da função de Sema3E–Plexina-D1 na modulação da via Notch/Dll4



Legenda: Papel da Sema3E–Plexina-D1 na modulação da via Notch/Dll4 por um mecanismo de *feedback* negativo induzido por VEGF.

Fonte: Kim *et al.* 2011

Ainda pela análise feita através do transcriptoma dessas células, observamos que as células endoteliais semeadas sobre a MEC de astrocitoma U-373 MG, apresentaram um

aumento do número de transcritos como MMP-14 e AQP1 envolvidos no fenótipo migratório característico das células líderes.

O brotamento e ramificação vascular é um processo invasivo que requer a degradação proteolítica da matriz extracelular circundante e o seu remodelamento para que ocorra a migração e invasão das células endoteliais no tecido circundante. A MMP 14 (MT1-MMP) está envolvida na regulação da angiogênese e parece ser indispensável para as células endoteliais migrarem (Saunders *et al.* 2006). Existem muitas evidências que MMP-14 é regulada positivamente nas células líderes e negativamente nas células da haste (Hinsbergh *et al.* 2008; Hinsbergh *et al.* 2009).

Para migrar, as células líderes, tornam-se polarizadas, de modo que a sua parte frontal estende filopódios, enquanto sua retaguarda mantém contato com as células da haste para evitar a desintegração da estrutura tubular. Alguns estudos genéticos revelam que aquaporina- 1 (AQP1) , um canal proteico de permeabilidade à água, está envolvido na regulação da migração das células endoteliais. Como consequência da despolimerização local de actina e fluxo de íons transmembranas, ocorrem mudanças na pressão osmótica nas células migratórias. A aquaporina-1 facilita o fluxo de água através da membrana plasmática em lamelipódios, elevando a pressão hidrostática local, levando a expansão da membrana celular para formar uma protrusão, aumentando assim a dinâmica dos lamelipódios (Saadoun *et al.* 2005).

Além disso, no contexto dos gliomas, há uma correlação entre o aumento da expressão de AQP1 com o aumento do grau de tumores cerebrais. Possivelmente a diminuição da barreira hematoencefálica, o aumento da permeabilidade dos vasos, culminando com edema vasogênico característico desses tumores seja reflexo do aumento de AQP1. O VEGF e a HIF - 1 α são alguns dos vários fatores que podem induzir a expressão AQP1 no endotélio de tumores do SNC (Saadoun *et al.* 2002; Zagzag *et al.* 2000). Pan e colaboradores (2011) sugeriram que AQP1 promove a gênese e progressão de malignidade pela promoção da angiogênese .

Diante disto, podemos sugerir que o contato das células endoteliais com a MEC da linhagem de astrocitoma U-373 MG, leva a seleção de uma população de células endoteliais enriquecidas para o fenótipo líder, desregulando o balanço apropriado entre células líderes e da haste prejudicando assim, a formação de brotos angiogênicos na massa tumoral. Esta desproporção contribui para a formação de uma vascularização caótica e subfuncional característica desse tipo tumoral.

Por mais de uma década, esforços significativos em estratégias anti -angiogênicas visavam a redução da densidade de vasos sanguíneos no tumor para inibir seu crescimento (Teng *et al.* 2010; Huang *et al.* 2015). No entanto, a experiência clínica dessas terapias tem produzido, no melhor dos quadros, apenas modestas melhoras na sobrevida 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; Groot *et al.* 2010; Bergers e Hanahan, 2008; Pàez-Ribes *et al.* 2010). Recentemente, 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 anti-tumorais (Goel *et al.* 2011).

Assim, sugerimos que a matriz de astrocitoma, em especial a proteína matricelular TN-C, poderia ser considerada um alvo para uma nova possibilidade estratégica de **normalização** da vasculatura tumoral, uma vez influencia na desorganização da rede vascular desses tumores e de outros tipos que progridem com o aumento da TN-C em seus microambientes.

Na **Parte II** dos resultados desta tese, investigamos a subpopulação endotelial que entra em processo de apoptose por desaderência – ou *anoikis* – após contato prolongado com a matriz rica em TN-C, secretada pela linhagem de astrocitoma U-373 MG. Este processo apoptótico foi descrito por nosso grupo de forma preliminar (Alves *et al.* 2011), porém a potencial relevância das células apoptóticas para a tubulogênese endotelial não havia ainda sido explorada.

A apoptose é o maior tipo de morte celular regulada em nosso corpo. Este processo conservado evolutivamente tem um importante papel na escultura dos tecidos durante o desenvolvimento embrionário (Green, 2011). Entretanto, o aumento ou diminuição da apoptose tem sido implicado em diversas doenças, incluindo as neurodegenerativas e as auto-imunes (Mattson, 2000; Nagata, 2010). Apesar da morte por apoptose ser um evento celular autônomo, as células apoptóticas podem afetar o ambiente circundante, estimulando a proliferação das células vizinhas como também exercendo efeitos parácrinos no microambiente tumoral (Ichim e Tait, 2016). Muitas evidências demonstram o papel da inibição da apoptose na promoção dos tumores e redução da resposta terapêutica (Hanahan e Weinberg, 2000; Delbridge *et al.* 2016; Letai, 2008).

No contexto da angiogênese, a apoptose desempenha um papel importante durante o desenvolvimento e manutenção do sistema vascular. Por exemplo, a apoptose de células

endoteliais parece ser essencial para a formação de lúmen, ramificação vascular e regressão vascular fisiológica (Meyer *et al*, 1997; Segura *et al* , 2002; Tertemiz *et al* , 2004).

No presente trabalho, através de ensaios funcionais filmados em tempo real, pudemos observar que tanto tubulogênese quanto a migração endotelial foram induzidas na presença de meio condicionado contendo células endoteliais apoptóticas. No entanto, evidências recentes mostraram que, durante a ativação das células por estímulos químicos (mediadores apoptóticos, pró-inflamatórios, pró-trombóticos) ou físico (forças de cisalhamento do sangue - *shear stress*, por exemplo), eventos intracelulares e alterações nas membranas da célula podem ocorrer, conduzindo a formação de borbulhamento da membrana e subsequente liberação de vesículas extracelulares (VEs) (Martinez e Andriantsitohaina, 2011).

Assim, a possibilidade de que os meios condicionados contendo células apoptóticas pudessem também conter quantidades significativas de VEs, quantitativa e qualitativamente diferentes de VEs produzidas por células incubadas com MEC autóloga, nos levou a isolar essas partículas, com a finalidade de efetuar com elas testes funcionais. Observamos que as células endoteliais que foram condicionadas com a MEC de astrocitoma liberaram aproximadamente 2,5 vezes mais VEs do que as células endoteliais que tiveram contato com a MEC autóloga, corroborando a importância da apoptose como indutor da geração de VEs.

Avaliamos posteriormente o papel das vesículas das duas origens – células em matriz autóloga *versus* células em matriz de astrocitoma - em ensaio de tubulogênese e na migração endotelial *in vitro*, nos quais as VEs foram incubadas com células endoteliais que se tornaram deficientes na tubulogênese após incubação prolongada com a matriz da linhagem U-373 MG. Ambos os tipos de VEs foram capazes de estimular a tubulogênese, porém sem diferenças estatisticamente significativas entre elas. No entanto, quando o ensaio funcional utilizado foi o de migração celular, verificamos que VEs isoladas de culturas endoteliais apoptóticas (por *anoikis*) estimularam mais a migração endotelial do que VEs isoladas de células endoteliais bem aderidas em suas próprias matrizes, sugerindo que o conteúdo das VEs sofre modulação pelo estado de viabilidade das células que as produziram.

Recentemente foi demonstrado que VEs liberadas por diversos tipos celulares representam um importante mediador da comunicação celular e são parte integrante do microambiente intercelular (Cocucci E *et al.*, 2009; Ratajczak J, *et al.* 2006). Isto revela um novo cenário em termos da compreensão do sinal e transferências de moléculas entre as células, não só localmente, mas também a longas distâncias (Turturici *et al.* 2014). As vesículas extracelulares podem transportar uma bateria de moléculas de sinalização envolvidas em processos como inflamação, coagulação e angiogênese. Estudos recentes

demonstraram que VEs provenientes diversos tipos celulares podem carregar espécies reativas de oxigênio, receptores de superfície celular, mRNAs e miRNAs (Virgintino *et al.* 2012).

Em situações patológicas como no câncer, as VEs podem alterar o microambiente tumoral e ajudar na invasão celular, através da transferência horizontal de proteínas mutantes em sítios distantes (Vader *et al.* 2014). Além disso, diversas células do estroma tumoral são capazes de liberar vesículas extracelulares, como por exemplo, os fibroblastos que secretam exossomos capazes de promover a migração de células de tumor de mama através da sinalização Wnt-PCP (Luga *et al.* 2012). As células endoteliais também podem liberar VEs, contribuindo, assim, em conjunto com outros estímulos, para a atividade angiogênica de microvasos em crescimento.

Sob estímulos de VEGF e bFGF, as células endoteliais liberam VEs contendo MMPs e TIMPs, que estão possivelmente envolvidas no controle autócrino do crescimento de vasos (Taraboletti *et al.*, 2002). As vesículas extracelulares podem ainda ter efeitos na angiogênese, ao induzirem a produção de fatores pró-angiogênicos e interferirem na adesão, migração e proliferação da célula endotelial (Soleti *et al.* 2009; Zernecke *et al.* 2009). Além disso, essas vesículas são capazes de induzir a diferenciação das EPCs (Benameur *et al.*, 2010; Mause *et al.*, 2010).

Dessa maneira, nossos resultados sugerem uma contribuição importante da matriz extracelular de tumores para o mecanismo de liberação de VEs, que podem influenciar tanto a migração da célula endotelial quanto a formação das estruturas vasculares. Nas próximas etapas, será fundamental caracterizar o conteúdo das VEs analisadas neste trabalho, elucidando assim o tipo de sinal transmitido por essas estruturas subcelulares, ainda pouco compreendidas.

CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste trabalho permitiram concluir que:

- a) O elevado conteúdo em TN-C na matriz de astrocitomas de alto grau parecer ser uma característica distintiva e essencial da transformação celular desses tumores, com impacto direto não apenas no próprio tumor (dados da literatura), mas também na capacidade tubulogênica das células endoteliais;
- b) A matriz extracelular (MEC) secretada pela linhagem de astrocitoma humano U-373 MG é permissiva à adesão de uma subpopulação de células endoteliais que expressam maior quantidade de integrina $\alpha 9\beta 1$, um receptor já implicado na literatura na tumorigênese e angiogênese;
- c) As células endoteliais previamente incubadas com matriz de células U-373 MG apresentam menor expressão do receptor FGFR1 e do proteoglicano sindecan-4, envolvidos na ativação da proteína PKC α , necessária para a formação de estruturas tubulares.
- d) O comprometimento da sinalização da PKC α , em paralelo à ativação da isoforma PKC δ , são parcialmente responsáveis pelo defeito tubulogênico em células endoteliais induzido pela matriz de astrocitoma rica em TN-C;
- e) Células endoteliais com defeito tubulogênico (TDECs) apresentam ainda maior expressão de VEGFR2 e de transcritos como Dll4, plexina D1, efrina B2, aquaporina-1 e MMP-14, relacionados funcionalmente com o fenótipo endotelial de célula líder (*tip cell*). Uma possível transição para o fenótipo “líder” pode fornecer uma explicação adicional para o defeito tubulogênico já mencionado;
- f) A análise das células endoteliais que sofrem *anoikis* quando semeadas sobre matriz de astrocitoma, rica em TN-C, permitiu verificar que, nestas condições, a produção de vesículas extracelulares (VEs) foi cerca de três vezes maior do que o produzido quando as células são incubadas com sua própria matriz.

- g) VEs de ambas as origens foram capazes de estimular a tubulogênese em TDECs. No entanto, VEs presentes no meio condicionado de células que sofreram anoikis em contato com matriz de astrocitoma induziram significativamente mais a migração endotelial, quando comparadas às VEs isoladas de células endoteliais cultivadas sobre matriz autóloga.
- h) Em suma, nossos dados permitem sugerir que matrizes ricas em TN-C, especialmente no contexto de tumores sólidos para os quais importantes papéis tem sido atribuídos à esta glicoproteína matricelular, também podem influenciar a angioarquitetura e funcionalidade dos vasos presentes no microambiente tumoral.

REFERÊNCIAS

- Aaron H. Morris, Themis R. Kyriakides. Matricellular proteins and biomaterials. *Matrix Biol.* 2014; 0: 183–191.
- Adams RH, Diella F, Hennig S, Helmbacher F, Deutsch U, Klein R. The cytoplasmic domain of the ligand ephrinB2 is required for vascular morphogenesis but not cranial neural crest migration. *Cell.* 2001; 104(1):57-69.
- Aghi M, Cohen KS, Klein RJ, Scadden DT, Chiocca EA. Tumor stromal-derived factor-1 recruits vascular progenitors to mitotic neovasculature, where microenvironment influences their differentiated phenotypes. *Cancer Res.* 2006; 66(18):9054-64.
- Aird WC. Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; 2(1):a006429.
- Al Haj Zen A, Oikawa A, Bazan-Peregrino M, Meloni M, Emanuelli C, Madeddu P. Inhibition of delta-like-4-mediated signaling impairs reparative angiogenesis after ischemia. *Circ Res.* 2010; 107(2):283-93.
- Alves TR, da Fonseca AC, Nunes SS, da Silva AO, Dubois LG, Faria J, Kahn SA, Viana NB, Marcondes J, Legrand C, Moura-Neto V, Morandi V. Tenascin-C in the extracellular matrix promotes the selection of highly proliferative and tubulogenesis-defective endothelial cells. *Exp Cell Res.* 2011; 317(15):2073-85.
- Anthis NJ, Haling JR, Oxley CL, Memo M, Wegener KL, Lim CJ, Ginsberg MH, Campbell D. Beta integrin tyrosine phosphorylation is a conserved mechanism for regulating talin-induced integrin activation. *J Biol Chem.* 2009; 284(52):36700-10.
- Antoine M, Wirz W, Tag CG, Mavituna M, Emans N, Korff T, Stoldt V, Gressner AM, Kiefer P. Expression pattern of fibroblast growth factors (FGFs), their receptors and antagonists in primary endothelial cells and vascular smooth muscle cells. *Growth Factors.* 2005; 23(2):87-95.
- Arima S, Nishiyama K, Ko T, Arima Y, Hakozaki Y, Sugihara K, Koseki H, Uchijima Y, Kurihara Y, Kurihara H. Angiogenic morphogenesis driven by dynamic and heterogeneous collective endothelial cell movement. *Development.* 2011; 138(21):4763-76.
- Astrof, S. and Hynes, R.O. Fibronectins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis.* 2009; 12: 165-175.
- Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2008 ;8(8):604-17.
- 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.
- Bao Q, Zhao Y, Renner A, Niess H, Seeliger H, Jauch KW, Bruns C. Cancer stem cells in pancreatic cancer. *Cancers (Basel).* 2010; 2(3):1629-41.

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006; 444(7120):756-60.

Barth PJ, Moll R, Ramaswamy A. Stromal remodeling and SPARC (secreted protein acid rich in cysteine) expression in invasive ductal carcinomas of the breast. *Virchows Arch* 2005; 446(5):532-6.

Bayless KJ, Salazar R, Davis GE. RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the $\alpha(v)\beta(3)$ and $\alpha(5)\beta(1)$ 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.

Benjamini Y, Hochberg. Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society* 1995; 57(1): 289-300

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.

Birgit Obermeier, Richard Daneman, Richard M. Ransohoff. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier *Nat Med*. 2013; 19(12): 1584–1596.

Bornstein P. Matricellular proteins: an overview. *J Cell Commun Signal*. 2009; 3(3-4):163-5.

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

Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol*. 2003; 200(4):423-8.

Böttcher RT, Stremmel C, Meves A, Meyer H, Widmaier M, Tseng HY, Fässler R. Sorting nexin 17 prevents lysosomal degradation of $\beta 1$ integrins by binding to the $\beta 1$ -integrin tail. *Nat Cell Biol*. 2012; 14(6):584-92.

Boulanger CM, Tedgui A. Dying for attention: microparticles and angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 2005; 67(1):1-3.

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.

Bralten LB, French PJ. Genetic alterations in glioma. *Cancers (Basel)* 2011; 3(1):1129-40.

Brellier, F., Hostettler, K., Hotz, H.-R., Ozcakil, C., Çöloğlu, S. A., Togbe, D., Ryffel, B., 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.

Brösicke N, Faissner A. Role of tenascins in the ECM of gliomas. *Cell Adh Migr*. 2015; 9(1-2):131-40.

Brösicke N, Faissner A. Role of tenascins in the ECM of gliomas. *Cell Adh Migr*. 2015; 9(1-2):131-40.

Brunner A, Mayerl C, Tzankov A, Verdorfer I, Tschörner I, Rogatsch H, Mikuz G. Prognostic significance of tenascin-C expression in superficial and invasive bladder cancer *J Clin Pathol*. 2004; 57(9):927-31

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.

Cai H., Reinisch K., Ferro-Novick S. Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev. Cell*. 2007; 12:671–682

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 fibronectin. *American J Pathol*. 2002; 161: 1695-1700.

Cavenee WK. High-grade gliomas with chromosome 1p loss. *J Neurosurg*. 200; 92(6):1080-1.

Chiodoni C, Colombo MP, Sangaletti S. Matricellular proteins: from homeostasis to inflammation, cancer, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2010; 29(2):295-307

Chittenden TW, Claes F, Lanahan AA, Autiero M, Palac RT, Tkachenko EV, Elfenbein A, Ruiz de Almodovar C, Dedkov E, Tomanek R, Li W, Westmore M, Singh JP, Horowitz A, Mulligan-Kehoe MJ, Moodie KL, Zhuang ZW, Carmeliet P, Simons M. Selective regulation of arterial branching morphogenesis by synectin. *Dev Cell*. 2006; 10(6):783-95.

Clause KC, Barker TH. Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair. *Curr Opin Biotechnol*. 2013; 24(5):830-3.

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.

- Corti F, Finetti F, Ziche M, Simons M. The syndecan-4/protein kinase C α pathway mediates prostaglandin E2-induced extracellular regulated kinase (ERK) activation in endothelial cells and angiogenesis in vivo. *J Biol Chem*. 2013; 288(18):12712-21.
- Datta, S. R., Brunet, A., & Greenberg, M. E. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & development*. 1999; 13(22): 2905-27.
- David A Calderwood, Iain D Campbell, David R Critchley. Talins and kindlins; partners in integrin-mediated adhesion *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(8): 503–517.
- Davis GE, Bayless KJ. An integrin and Rho GTPase-dependent pinocytic vacuole mechanism controls capillary lumen formation in collagen and fibrin matrices. *Microcirculation*. 2003;10:27–44.
- Del Maestro RF, Megyesi JF, Farrell CL. Mechanisms of tumor-associated edema: a review. *Can J Neurol Sci*. 1990; 17:177–183.
- Delbridge, A. R., Grabow, S., Strasser, A., Vaux, D. L. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer*. 2016; 16, 99–109.
- Demou ZN, Hendrix MJ. Microgenomics profile the endogenous angiogenic phenotype in subpopulations of aggressive melanoma. *J Cell Biochem*. 2008; 105(2):562-73.
- Dias JV, Benslimane-Ahmim Z, Egot M, Lokajczyk A, Grelac F, Galy-Fauroux I, Juliano L, Le-Bonniec B, Takiya CM, Fischer AM, Blanc-Brude O, Morandi V, Boisson-Vidal C. A motif within the N-terminal domain of TSP-1 specifically promotes the proangiogenic activity of endothelial colony-forming cells. *Biochem Pharmacol*. 2012; 84(8):1014-23.
- Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 2008; 112(13):4793-807.
- Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*. 2009; 324(5935):1673-7..
- Do Carmo A1, Balça-Silva J, Maias D, Lopes MC. PKC signaling in glioblastoma. *Cancer Biol Ther*. 2013; 14(4):287-94
- Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passequé E, Song H, Vandenberg S, Johnson RS, Werb Z, Bergers G. HIF1 α induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell*. 2008; 213(3):206-20.
- Dvorak, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine*. 1996; 315(26), 1650-9.
- Elfenbein A, Simons M. Syndecan-4 signaling at a glance. *J Cell Sci*. 2012; 126(Pt 17):3799-804.
- 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.
- Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005; 16:139–149.

Eunyoung Keum, Yeonhee Kim, Jungyeon Kim, Soojin Kwon, Yangmi Lim, Innoc Han, Eok-Soo Oh. Syndecan-4 regulates localization, activity and stability of protein kinase C- α . *Biochem J.* 2004; 378(Pt 3): 1007–1014.

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.

Fan X, Khaki L, Zhu TS, Soules ME, Talsma CE, Gul N, Koh C, Zhang J, Li YM, Maciaczyk J, Nikkhah G, Dimeco F, Piccirillo S, Vescovi AL, Eberhart CG. NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells.* 2010; 28(1):5-16.

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 Rev.* 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.

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

Figarella-Branger D1, Bouvier C, Moroch J, Michalak S, F Burel-Vandenbos. Morphological classification of glioblastomas *Neurochirurgie.* 2010; 56(6):459-63.

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 J Cancer* 1999; 79:1828–1835

Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost.* 2003; 1(7):1655-62.

Friedl P.& Wolf K. Proteolytic and non-proteolytic migration of tumour cells and leucocytes. *Biochem Soc Symp.* 2003; (70):277-85.

Funahashi Y, Shawber CJ, Vorontchikhina M, Sharma A, Outtz HH, Kitajewski J. Notch regulates the angiogenic response via induction of VEGFR-1. *J Angiogenes Res.* 2010; 2(1):3.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 2007; 21(21):2683-710.

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.

- Gai C, Carpanetto A, Deregibus MC, Camussi G. Extracellular vesicle-mediated modulation of angiogenesis. *Histol Histopathol.* 2015;31(4):379-91.
- Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10(1):21-33.
- Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.* 2003; 314(1):15-23.
- Giancotti F. G. and Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999; 285: 1028–1032.
- Giblin SP, Midwood KS. Tenascin-C: Form versus function. *Cell Adh Migr.* 2015; 9(1-2):48-82.
- Giblin SP, Midwood KS. Tenascin-C: Form versus function. *Cell Adh Migr.* 2015; 9(1-2):48-82.
- Giovanni Camussi, Peter J. Quesenberry. Perspectives on the Potential Therapeutic Uses of Vesicles Exosomes Microvesicles. 2015; 1(6): 10.5772/57393.
- Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem.* 1996; 65:475–502.
- Graça Raposo, Willem Stoorvogel. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends *J Cell Biol.* 2013; 200(4): 373–383.
- Grant R, Kolb L, Moliterno J. Molecular and genetic pathways in gliomas: the future of personalized therapeutics. *CNS Oncol.* 2014; 3(2):123-36.
- Green, D. R. Means to an End: Apoptosis and Other Cell Death Mechanisms Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2011.
- 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.
- Hanahan, D, Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100, 57–70
- 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
- Hardee ME e Zagzag D. Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *Am J Pathol.* 2012; 181(4):1126-41.
- Harrington LS, Sainson RC, Williams CK, Taylor JM, Shi W, Li JL, Harris AL. Regulation of multiple angiogenic pathways by Dll4 and Notch in human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res.* 2008; 75(2):144-54.

- He J, Liu Y, Zhu T, Zhu J, Dimeco F, Vescovi AL, Heth JA, Muraszko KM, Fan X, Lubman DM. CD90 is identified as a candidate marker for cancer stem cells in primary high-grade gliomas using tissue microarrays. *Mol Cell Proteomics*. 2011; 11(6):M111.010744.
- Hedlund EM, Yang X, Zhang Y, Yang Y, Shibuya M, Zhong W, Sun B, Liu Y, Hosaka K, Cao Y. Tumor cell-derived placental growth factor sensitizes antiangiogenic and antitumor effects of anti-VEGF drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 110(2):654-9.
- Hellström M, Phng LK, Hofmann JJ, Wallgard E, Coultas L, Lindblom P, Alva J, Nilsson AK, Karlsson L, Gaiano N, Yoon K, Rossant J, Iruela-Arispe ML, Kalén M, Gerhardt H, Betsholtz C. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*. 2007; 445(7129):776-80.
- Herold-Mende C, Mueller MM, Bonsanto MM, Schmitt HP, Kunze S, Steiner HH. Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. *Int J Cancer*. 2002;98(3):362-9.
- 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.
- Hina Kalra, Gregor P. C. Drummen, and Suresh Mathivanan. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(2): 170.
- 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*. 1980; 30:907-11.
- Hirata E, Arakawa Y, Shirahata M, Yamaguchi M, Kishi Y, Okada T, Takahashi JA, Matsuda M, Hashimoto N. Endogenous tenascin-C enhances glioblastoma invasion with reactive change of surrounding brain tissue. *Cancer Sci*. 2009; 100(8):1451-9.
- Hirose Y, Sasaki H, Abe M, Hattori N, Adachi K, Nishiyama Y, Nagahisa S, Hayashi T, Hasegawa M, Yoshida K. Subgrouping of gliomas on the basis of genetic profiles. *Brain Tumor Pathol*. 2013; 30(4):203-8.
- Hofer S, Rushing E, Preusser M, Marosi C. Molecular biology of high-grade gliomas: what should the clinician know? *Chin J Cancer*. 2014; 33(1):4-7.
- 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
- Hosaka K, Yang Y, Seki T, Nakamura M, Andersson P, Rouhi P, Yang X, Jensen L, Lim S, Feng N, Xue Y, Li X, Larsson O, Ohhashi T, Cao Y. Tumour PDGF-BB expression levels determine dual effects of anti-PDGF drugs on vascular remodelling and metastasis. *Nat Commun*. 2013; 4:2129.
- Hsia HC, Schwarzbauer JE. Meet the tenascins: multifunctional and mysterious. *J Biol Chem*. 2005; 280(29):26641-4.

Huang D, Lan H, Liu F, Wang S, Chen X, Jin K, Mou X. Anti-angiogenesis or pro-angiogenesis for cancer treatment: focus on drug distribution. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(6):8369-76.

Huang H, Colella S, Kurrer M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. *Cancer Res*. 2000; 60(24):6868-74

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*. 2001; 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.

Iain D. Campbell, Martin J. Humphries. Integrin Structure, Activation, and Interactions Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011; 3(3): a004994.

Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*. 2002; 39(3):193-206.

Igor Kovacevic, Jiong Hu, Ann Siehoff-Icking, Nils Opitz, Aliesha Griffin, Andrew C Perkins, Alan L Munn, Werner Müller-Esterl, Rüdiger Popp, Ingrid Fleming, Benno Jungblut, Meike Hoffmeister, Stefanie Oess. The F-BAR protein NOSTRIN participates in FGF signal transduction and vascular development *EMBO J*. 2012; 31(15): 3309–3322.

Ingrid Nilsson, Fuad Bahram, Xiujuan Li, Laura Gualandi, Sina Koch, Malin Jarvius, Ola Söderberg, Andrey Anisimov, Ivana Kholová, Bronislaw Pytowski, Megan Baldwin, Seppo Ylä-Herttuala, Kari Alitalo, Johan Kreuger, Lena Claesson-Welsh. VEGF receptor 2/-3 heterodimers detected *in situ* by proximity ligation on angiogenic sprouts *EMBO J*. 2010; 29(8): 1377–1388.

Iruela-Arispe ML, Davis GE. Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. *Dev Cell*. 2009; 16(2):222-31.

Iwamoto DV, Calderwood DA. Regulation of integrin-mediated adhesions. *Curr Opin Cell Biol*. 2015; 36:41-7.

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(11):2745-56.

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

Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, Collins RT, Ponsioen B, Aspalter IM, Rosewell I, Busse M, Thurston G, Medvinsky A, Schulte-Merker S, Gerhardt H. (2010); Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol.* 12(10):943-53.

Jallo GI, Friedlander DR, Kelly PJ, Wisoff JH, Grumet M, Zagzag D. (1997) Tenascin-C expression in the cyst wall and fluid of human brain tumors correlates with angiogenesis. *Neurosurgery.* 41(5):1052-9.

Järveläinen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN, Penttinen R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 2009; 61(2):198-223.

Jhaveri N, Chen TC, Hofman FM. Tumor vasculature and glioma stem cells: Contributions to glioma progression. *Cancer Lett.* 2014; 3835(14)00783-6

Jiang, X. & Couchman, J.R. Perlecan and tumor angiogenesis. *J. Histochem. Cytochem.* 2003; 51 (11):1393-1410

Jones EV, Bouvier DS. Astrocyte-secreted matricellular proteins in CNS remodelling during development and disease. *Neural Plast.* 2014; 2014:321209.

Jones PL, Jones FS. Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell; function” *Matrix Biol.* 2000; 19:581-96.

Jones EV, Bouvier DS. Astrocyte-secreted matricellular proteins in CNS remodelling during development and disease. *Neural Plast.* 2014; 2014:321209.

Jovčevska I, Kočevkar N, Komel R . Glioma and glioblastoma - how much do we (not) know? *Mol Clin Oncol.* 2013; 1(6):935-941

Jung Eun Park, Hon Sen Tan, Arnab Datta, Ruenn Chai Lai, Huoming Zhang, Wei Meng, Sai Kiang Lim, Siu Kwan Sze. Hypoxic Tumor Cell Modulates Its Microenvironment to Enhance Angiogenic and Metastatic Potential by Secretion of Proteins and Exosomes *Mol Cell Proteomics.* 2010; 9(6): 1085–1099.

Kang JH, Toita R, Kim CW, Katayama Y. Protein kinase C (PKC) isozyme-specific substrates and their design. *Biotechnol Adv.* 2012; 30(6):1662-72.

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.

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

Katoh M. Therapeutics targeting angiogenesis: genetics and epigenetics, extracellular miRNAs and signaling networks. *Int J Mol Med.* 2013; 32(4):763-7.

- Kawamura H, Li X, Harper SJ, Bates DO, Claesson-Welsh L. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165b is a weak in vitro agonist for VEGF receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity. *Cancer Res.* 2008; 68(12):4683-92.
- 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.
- Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med.* 2008; 358(19):2039-49.
- 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.
- Kim *et al.* 2012 Kim H.S., Choi D.Y., Yun S.J., Choi S.M., Kang J.W., Jung J.W., Hwang D., Kim K.P., Kim D.W. Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *J. Proteome Res.* 2012; 11:839–849
- 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.
- Klein S, Bikfalvi A, Birkenmeier TM, Giancotti FG, Rifkin DB. Integrin regulation by endogenous expression of 18-kDa fibroblast growth factor-2. *J Biol Chem.* 1996; 271(37):22583-90.
- 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.
- Koch S, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; 2(7):a006502.
- Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell.* 2009; 137(2):216-33.

- Kostourou V, Papalazarou V. Non-collagenous ECM proteins in blood vessel morphogenesis and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1840(8):2403-13.
- Kottakis F, Polytarchou C, Foltopoulou P, Sanidas I, Kampranis SC, Tsiachlis PN. FGF-2 regulates cell proliferation, migration, and angiogenesis through an NDY1/KDM2B-miR-101-EZH2 pathway. *Mol Cell*. 2011; 43(2):285-98.
- 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
- Kreis, T & Vale, R. (1999) *Guidebook to Extracellular Matrix, Anchor and Adhesion proteins*. Oxford University.
- Kumra H, Reinhardt DP. Fibronectin-targeted drug delivery in cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015; 97:101-10.
- 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
- Lau TL, Kim C, Ginsberg MH, Ulmer TS. The structure of the integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. *EMBO J* 2009; 28:1351-1361.
- Legate KR, Takahashi S, Bonakdar N, Fabry B, Boettiger D, Zent R, Fässler R. Integrin adhesion and force coupling are independently regulated by localized $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ synthesis. *EMBO J*. 2011; 30(22):4539-53.
- 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.
- Letai, A. G. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*. 2008; 8, 121–132.
- Lewis CE, De Palma M, Naldini L. Tie2-expressing monocytes and tumor angiogenesis: regulation by hypoxia and angiopoietin-2. *Cancer Res*. 2007; 15;67(18):8429-32.
- Li B, Sharpe EE, Maupin AB, Teleron AA, Pyle AL, Carmeliet P, Young PP. VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J*. 2006; 20(9):1495-7.
- Lindahl P, Johansson BR, Leveen P et al. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*. 1997; 277:242–245.
- Liu J, Agarwal S. Mechanical signals activate vascular endothelial growth factor receptor-2 to upregulate endothelial cell proliferation during inflammation. *J Immunol*. 2010; 185(2):1215-21

- Liu Q, Nguyen DH, Dong Q, Shitaku P, Chung K, Liu OY, Tso JL, Liu JY, Konkankit V, Cloughesy TF, Mischel PS, Lane TF, Liao LM, Nelson SF, Tso CL. Molecular properties of CD133+ glioblastoma stem cells derived from treatment-refractory recurrent brain tumors. *J Neurooncol.* 2009; 94(1):1-19.
- Liu X, Driskell RR, Engelhardt JF. Stem cells in the lung. *Methods Enzymol* 2006; 419:285-321.
- Lobov IB, Renard RA, Papadopoulos N, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; (9):3219-24.
- Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2009; 21(2):154-65.
- 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 Y, Parker KH, Wang W. Effects of osmotic pressure in the extracellular matrix on tissue deformation. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2006; 364(1843):1407-22.
- Luga V, Zhang L, Vitoria-Petit AM, Ogunjimi AA, Inanlou MR, Chiu E, Buchanan M, Hosein AN, Basik M, Wrana JL. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell.* 2012; 151(7):1542-56.
- Mammoto A, Ingber DE. Cytoskeletal control of growth and cell fate switching. *Curr Opin Cell Biol.* 2009; 21(6):864-70.
- 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.
- Marcin Wysoczynski, Mariusz Z. Ratajczak. Lung cancer secreted microvesicles: underappreciated modulators of microenvironment: expanding tumors *Int J Cancer.* 2009; 125(7): 1595–1603.
- Margadant C, Kreft M, de Groot DJ, Norman JC, Sonnenberg A. Distinct roles of talin and kindlin in regulating integrin $\alpha 5 \beta 1$ function and trafficking. *Curr Biol.* 2012; 22:1554-1563.
- Martineau M, Shi T, Puyal J, Knolhoff AM, Dulong J, Gasnier B, Klingauf J, Sweedler JV, Jahn R, Mothet JP. Storage and uptake of D-serine into astrocytic synaptic-like vesicles specify gliotransmission. *J Neurosci.* 2013; 33(8):3413-23.
- Martinez MC, Andriantsitohaina R. Microparticles in angiogenesis: therapeutic potential. *Circ Res.* 2011; 109(1):110-9.

- Mattson, M. P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000; 1, 120–129.
- Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res.* 2010; 107(9):1047-57.
- 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.
- Mentlein R, Held-Feindt J. Angiogenesis factors in gliomas: a new key to tumour therapy? *Naturwissenschaften.* 2003; 90(9):385-94.
- Meredith JE Jr, Fazeli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell.* 1993; 4(9):953-61.
- Mettouchi A. The role of extracellular matrix in vascular branching morphogenesis. *Cell Adh Migr.* 2012; 6(6):528-34.
- Meyer, GT; Matthias, LJ; Noack, L; vadas, MA; gamble, JR. Lumen formation during angiogenesis in vitro involves phagocytic activity, formation and secretion of vacuoles, cell death, and capillary tube remodeling by different populations of endothelial cells *The Anatomical Record.* 1997; 249: 327-340.
- Midwood, K. S., Hussenet, T., Langlois, B., & Orend, G. (2011). Advances in tenascin-C biology. *Cellular and molecular life sciences* 68(19): 3175-99.
- Miller CR, Perry A. (2007) Glioblastoma. *Arch Pathol Lab Med.* 131(3):397-406.
- Mochly-Rosen, D. e A. S. Gordon (1998) Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *Faseb J* 12 (1): 35-42.
- Morse EM, Brahme NN, Calderwood DA(2014) Integrin cytoplasmic tail interactions. *Biochemistry* 53:810-820.
- Mostafavi-Pour Z, Askari JA, Parkinson SJ, Parker PJ, Ng TT, Humphries MJ. (2003) Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration. *J Cell Biol.*161(1):155-67.
- Mukherjee A, Roy S, Saha B, Mukherjee D. Spatio-Temporal Regulation of PKC Isoforms Imparts Signaling Specificity. *Front Immunol.* 2016; 17:7:45
- Murakami M, Nguyen LT, Zhuang ZW, Moodie KL, Carmeliet P, Stan RV, Simons M. The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *J Clin Invest.* 2008;118(10):3355-66
- Murdoch C, Tazzyman S, Webster S, Lewis CE. Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2. *J Immunol.* 2007; 178(11):7405-11.
- 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.

- Nagata, S. Apoptosis and autoimmune diseases. *Ann. NY Acad. Sci.* 2010; 1209, 10–16.
- Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular hyperpermeability, angiogenesis, and stroma generation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; 2(2):a006544.
- Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. *Annu Rev Pathol.* 2007; 2:251-75.
- Nishizuka, Y. The heterogeneity and differential expression of multiple species of the protein kinase C family. *Biofactors.* 1988; 1(1): 17-20.
- Nishizuka, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science (New York, N.Y.).* 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.
- Nobuta K, Vemaraju K, Meyers BC. Methods for analysis of gene expression in plants using MPSS. *Methods Mol Biol.* 2007; 406:387-408.
- Noguera-Troise I1, Daly C, Papadopoulos NJ, Coetzee S, Boland P, Gale NW, Lin HC, Yancopoulos GD, Thurston G. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature.* 2006; 444(7122):1032-7.
- 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.
- Nourse MB, Rolle MW, Pabon LM, Murry CE. Selective control of endothelial cell proliferation with a synthetic dimerizer of FGF receptor-1. *Lab Invest.* 2007; 87:828–835.
- 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.
- Obberghen-Schilling, Tucker, Saupe, Gasser, Cseh, Orend. Fibronectin and tenascin-C: accomplices in vascular morphogenesis during development and tumor growth. *Int. J. Dev. Biol.* 2011; 55: 511-525
- Ohgaki H, Kleihues P. (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 170(5):1445-53.
- 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. 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

- Okada H, Kohanbash G, Zhu X, Kastenhuber ER, Hoji A, Ueda R, Fujita M. Immunotherapeutic approaches for glioma. *Crit Rev Immunol.* 2009; 29(1):1-42.
- 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.
- Ortensi B, Setti M, Osti D, Pelicci G. (2013) Cancer stem cell contribution to glioblastoma invasiveness. *Stem Cell Res* 4(1):18.
- Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Pekmezci M, Schwartzbaum JA, Turner MC, Walsh KM, Wrensch MR, Barnholtz-Sloan JS. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol.* 2014; 16(7):896-913.
- Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol.* 2015; 4:iv1-iv62.
- 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)₂Cys₆ binuclear cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1990; 87(6): 2077-81.
- Pasquale, E. B. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell.* 2008; 133, 38–52.
- Pfister S, Witt O. Pediatric gliomas. *Recent Results Cancer Res.* 2009; 171:67-81.
- Phng LK, Gerhardt H. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev Cell.* 2009; (2):196-208.
- Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. (2014) The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* 15(12):1243-53.
- Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984; 81(19):5985-8.
- Plate, KH; Risau, W. Angiogenesis in malignant gliomas. *Glia.* 1995; 15: 339-347.
- Pouratian N, Mut M, Jagannathan J, Lopes MB, Shaffrey ME, Schiff D. Low-grade gliomas in older patients: a retrospective analysis of prognostic factors. *J Neurooncol.* 2008; 90(3):341-50.
- Prenzel KL, Warnecke-Eberz U, Xi H, Brabender J, Baldus SE, Bollschweiler E, Gutschow CA, Hölscher AH, Schneider PM. Significant overexpression of SPARC/osteonectin mRNA

in pancreatic cancer compared to cancer of the papilla of Vater. *Oncol Rep.* 2006; 15(5):1397-401.

Rahman R, Smith S, Rahman C, Grundy R. Antiangiogenic therapy and mechanisms of tumor resistance in malignant glioma. *J Oncol.* 2010;251231.

Rao JS, Yamamoto M, Mohaman S, Gokaslan ZL, Fuller GN, Stetler-Stevenson WG, Rao VH, Liotta LA, Nicolson GL, Sawaya RE. Expression and localization of 92 kDa type IV collagenase/gelatinase B (MMP-9) in human gliomas. *Clin Exp Metastasis.* 1996; 4(1):12-8.

Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia.* 2006; 20(9):1487-95.

Rautou PE, Vion AC, Amabile N, Chironi G, Simon A, Tedgui A, Boulanger CM. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ Res.* 2011; 109(5):593-606.

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

Read TA, Fogarty MP, Markant SL, McLendon RE, Wei Z, Ellison DW, Febbo PG, Wechsler-Reya RJ. Identification of CD15 as a marker for tumor-propagating cells in a mouse model of medulloblastoma. *Cancer Cell* 2009; 15(2):135-47.

Ricci-Vitiani L., Pallini R., Biffoni M., Todaro M., Invernici G., Cenci T., Maira G., Parati E.A., Stassi G., Larocca L.M., De Maria R. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells *Nature* 2011, 469:432

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.

Roca C, Adams RH. Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes Dev.* 2007; 21(20):2511-24.

Rocco M, Malorni L, Cozzolino R, Palmieri G, Rozzo C, Manca A, Parente A, Chambery A. Proteomic profiling of human melanoma metastatic cell line secretomes. *J Proteome Res.* 2011; 10(10):4703-14.

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.

Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol.* 2010; 341(1):126-40.

Rubin J.B., Kung A.L., Klein R.S., Chan J.A., Sun Y., Schmidt K., Kieran M.W., Luster A.D., Segal R.A. A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100:13513–13518.

Ruhrberg C1, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H, Betsholtz C, Shima DT. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev*. 2002; 16(20):2684-98.

Ruoslahti E. Fibronectin and its integrin receptors in cancer. *Adv Cancer Res*. 1999; 76:1-20

Rusnati M, Tanghetti E, Dell'Era P, Gualandris A, Presta M. $\alpha v \beta 3$ integrin mediates the cell-adhesive capacity and biological activity of basic fibroblast growth factor (FGF-2) in cultured endothelial cells. *Mol Biol Cell*. 1997; 8(12):2449-61.

Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, Bell BA, Krishna S. Increased aquaporin1 water channel expression in human brain tumours. *Br J Cancer*. 2002; 87(6):621-3.

Saadoun S, Papadopoulos MC, Hara-Chikuma M, Verkman AS. Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. *Nature*. 2005; 434(7034):786-92.

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.

Saltel F, Mortier E, Hytönen VP, Jacquier MC, Zimmermann P, Vogel V, Liu W, Wehrle-Haller B. New PI(4,5)P₂- and membrane proximal integrin-binding motifs in the talin head control $\beta 3$ -integrin clustering. *J Cell Biol*. 2009;187(5):715-31

Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med*. 2005; 353(8):811-22.

Sanz L, Alvarez-Vallina L. The extracellular matrix: a new turn-of-the-screw for anti-angiogenic strategies. *Trends Mol Med*. 2003; 9(6):256-62

Saunders WB, Bohnsack BL, Faske JB, Anthis NJ, Bayless KJ, Hirschi KK, Davis GE. Coregulation of vascular tube stabilization by endothelial cell TIMP-2 and pericyte TIMP-3. *J Cell Biol*. 2006; 175(1):179-91.

Savina A, Vidal M, Colombo MI. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J Cell Sci*. 2002; 115:2505_15.

Sawamiphak S, Seidel S, Essmann CL, Wilkinson GA, Pitulescu ME, Acker T, Acker-Palme A. EphrinB2 regulates function in developmental and tumor angiogenesis. *Nature*. 2010; 465(7297):487-91.

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.

Schultz GS1, Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2009; 17(2):153-62.

Schwarzbauer, J. E., & DeSimone, D. W. Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2011; 3(7).

Seguin L, Desgrosellier JS, Weis SM, Cheresch DA. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends Cell Biol.* 2015; 25(4):234-40.

Segura I, Serrano A, De Buitrago GG, González MA, Abad JL, Clavería C, Gómez L, Bernad A, Martínez-A C, Riese HH. Inhibition of programmed cell death impairs in vitro vascular-like structure formation and reduces in vivo angiogenesis. *FASEB J.* 2002; 16(8):833-41.

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 DR, Perruzzi CA, Streit M, Kotliansky VE, de Fougères AR, Detmar M. The $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. *Am J Pathol.* 2002; 160(1):195-204.

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

Shafer C.A., Huang J., Lin P.C. Glioblastoma cells incorporate into tumor vasculature and contribute to vascular radioresistance. *Int J Cancer.* 2010; 127:2063–2075

Shalaby F1, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature.* 1995; 376(6535):62-6.

Shaw J.P., Basch R., Shamamian P. Hematopoietic stem cells and endothelial cell precursors express Tie-2, CD31 and CD45. *Blood Cells Mol Dis.* 2004; 32:168–175.

Shen Q., Goderie S.K., Jin L., Karanth N., Sun Y., Abramova N., Vincent P., Pumiglia K., Temple S. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science.* 2004; 304:1338–1340.

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.

Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, St Clair R, Baljevic M, White I, Jin DK, Chadburn A, Murphy AJ, Valenzuela DM, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, D'Angelica M, Kemeny N, Lyden D, Rafii S. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest.* 2008; 118(6):2111-20.

Siekmann AF, Lawson ND. Notch signalling and the regulation of angiogenesis. *Cell Adh Migr*. 2007; 1(2):104-6.

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

Soleti R, Benameur T, Porro C, Panaro MA, Andriantsitohaina R, Martínez MC. Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis*. 2009; 30(4):580-8.

Song Nie, Mikel Gurrea, Jianhui Zhu, Smathorn Thakolwiboon, Jason A. Heth, Karin M. Muraszko, Xing Fan, David M. Lubman. Tenascin-C: A Novel Candidate Marker for Cancer Stem Cells in Glioblastoma Identified by Tissue Microarrays *J Proteome Res*. 2015; 14(2): 814–822.

Song X, Yang J, Hirbawi J, Ye S, Perera HD, Goksoy E, Dwivedi P, Plow EF, Zhang R, Qin J. A novel membrane-dependent on/off switch mechanism of talin FERM domain at sites of cell adhesion. *Cell Res*. 2012; 22(11):1533-45.

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

Stratman AN, Malotte KM, Mahan RD, Davis MJ, Davis GE. (2009) 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.

Suchting S, Freitas C, le Noble F, Benedito R, Bréant C, Duarte A, Eichmann A. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(9):3225-30.

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.

Svendsen A, Verhoeff JJ, Immervoll H, Brøgger JC, Kmiecik J, Poli A, Netland IA, Prestegarden L, Planagumà J, Torsvik A, Kjersem AB, Sakariassen PØ, Heggdal JI, Van Furth WR, Bjerkvig R, Lund-Johansen M, Enger PØ, Felsberg J, Brons NH, Tronstad KJ, Waha A, Chekenya M. Expression of the progenitor marker NG2/CSPG4 predicts poor survival and resistance to ionising radiation in glioblastoma. *Acta Neuropathol*. 2011; 122(4):495-510.

Tabatabai G., Frank B., Möhle R., Weller M., Wick W. Irradiation and hypoxia promote homing of haematopoietic progenitor cells towards gliomas by TGF-beta-dependent HIF-1alpha-mediated induction of CXCL12. *Brain*.2006; 129:2426–2435.

Takahashi S, Leiss M, Moser M, Ohashi T, Kitao T, Heckmann D, Pfeifer A, Kessler H, Takagi J, Erickson HP, Fässler R. The RGD motif in fibronectin is essential for development but dispensable for fibril assembly. *J Cell Biol*. 2007; 178(1):167-78.

Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, Murtomäki A, Suchting S, Wirzenius M, Waltari M, Hellström M, Schomber T, Peltonen R, Freitas C, Duarte A, Isoniemi H, Laakkonen P, Christofori G, Ylä-Herttuala S, Shibuya M, Pytowski B, Eichmann A, Betsholtz C, Alitalo K. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature*. 2008; 454(7204):656-60.

Tanghetti E, Ria R, Dell'Era P, Urbinati C, Rusnati M, Ennas MG, Presta M. Biological activity of substrate-bound basic fibroblast growth factor (FGF2): recruitment of FGF receptor-1 in endothelial cell adhesion contacts. *Oncogene*. 2002; 21(24):3889-97.

Taraboletti, Sandra D'Ascenzo, Patrizia Borsotti, Raffaella Giavazzi, Antonio Pavan, Vincenza Dolo. Shedding of the Matrix Metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as Membrane Vesicle-Associated Components by Endothelial Cells *Am J Pathol*. 2002; 160(2): 673–680.

Tate MC1, Aghi MK. Biology of angiogenesis and invasion in glioma. *Neurotherapeutics*. 2009; (3):447-57.

Teng LS, Jin KT, He KF, Wang HH, Cao J, Yu DC. Advances in combination of antiangiogenic agents targeting VEGF-binding and conventional chemotherapy and radiation for cancer treatment. *J Chin Med Assoc*. 2010; 73(6):281-8..

Tertemiz F, Kayisli UA, Arici A, Demir R. Apoptosis contributes to vascular lumen formation and vascular branching in human placental vasculogenesis. *Biol Reprod*. 2004; 72(3):727-35.

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.

Thurston G, Kitajewski J. VEGF and Delta-Notch: interacting signalling pathways in tumour angiogenesis. *Br J Cancer*. 2008; 99(8):1204-9.

Ting Wang, Daniele M. Gilkes, Naoharu Takano, Lisha Xiang, Weibo Luo, Corey J. Bishop, Pallavi Chaturvedi, Jordan J. Green, Gregg L. Semenza. Hypoxia-inducible factors and RAB22A mediate formation of microvesicles that stimulate breast cancer invasion and metastasis *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(31): E3234–E3242.

Tkachenko E, Elfenbein A, Tirziu D, Simons M. Syndecan-4 clustering induces cell migration in a PDZ-dependent manner. *Circ Res*. 2006; 98(11):1398-404.

Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res*. 2005; 96(5):488-500.

- Turturici G., Tinnirello R., Sconzo G., Geraci F. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2014; 306, C621–C633.
- Udani V., Santarelli J., Yung Y., Cheshier S., Andrews A., Kasad Z., Tse V. Differential expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 may enhance recruitment of bone-marrow-derived endothelial precursor cells into brain tumors. *Neurol Res.* 2005; 27:801–806.
- Vader P, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. *Trends Mol Med.* 2014; 20(7):385-93.
- van Hinsbergh VW, Koolwijk P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res.* 2008; 78(2):203-12.
- Vartanian A, Stepanova E, Grigorieva I, Solomko E, Baryshnikov A, Lichinitser M. VEGFR1 and PKC α signaling control melanoma vasculogenic mimicry in a VEGFR2 kinase-independent manner. *Melanoma Res.* 2011; 21 (2) :91-8.
- Vehlow A, Cordes N. Invasion as target for therapy of glioblastoma multiforme. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1836(2):236-44.
- Venneri MA, De Palma M, Ponzoni M, Pucci F, Scielzo C, Zonari E, Mazziere R, Doglioni C, Naldini L. Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood.* 2007;109(12):5276-85.
- Virgintino, Marco Rizzi, Mariella Errede, Maurizio Strippoli, Francesco Girolamo, Mirella Bertossi, Luisa Roncali. Plasma membrane-derived microvesicles released from tip endothelial cells during vascular sprouting Angiogenesis. 2012; 15(4): 761–769.
- Vlodavsky, 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(Pt 19):4559-69.
- Wang A, Nomura M, Patan S, Ware JA. Inhibition of protein kinase C α prevents endothelial cell migration and vascular tube formation in vitro and myocardial neovascularization in vivo. *Circ Res.* 2002; 90: 609–616.
- Wang A, Nomura M, Patan S, Ware JA. Inhibition of protein kinase C α prevents endothelial cell migration and vascular tube formation in vitro and myocardial neovascularization in vivo. *Circ Res.* 2002; 90(5):609-16.
- 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.

- Wikman H, Kettunen E, Seppänen JK, Karjalainen A, Hollmén J, Anttila S, Knuutila S. Identification of differentially expressed genes in pulmonary adenocarcinoma by using cDNA array. *Oncogene*. 2002; 21(37):5804-13.
- Williams CK, Li JL, Murga M, Harris AL, Tosato G. Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function. *Blood*. 2006; 107(3):931-9.
- Wong GS, Rustgi AK. Matricellular proteins: priming the tumour microenvironment for cancer development and metastasis. *Br J Cancer*. 2013;108(4):755-61.
- 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
- Xiong JP, Mahalingham B, Alonso JL, Borrelli LA, Rui X, Anand S, Hyman BT, Rysiok T, Müller-Pompalla D, Goodman SL, Arnaout MA. Crystal structure of the complete integrin $\alpha V\beta 3$ ectodomain plus an α/β transmembrane fragment. *J Cell Biol*. 2009;186(4):589-600.
- Xu H, Czerwinski P, Hortmann M, Sohn HY, Förstermann U, Li H. Protein kinase C α promotes angiogenic activity of human endothelial cells via induction of vascular endothelial growth factor. *Cardiovasc Res*. 2007; 78(2):349-55.
- Yan X, Liu B, Lu SH, Ge ML, Li XX, Zheng YZ. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. The effects of stem cell factor on proliferation, transmigration, capillary tube formation of endothelial cells and on the chemotaxis of CD133(+) cells]. Chinese. 2011; 32(5):326-30.
- Yang Z, Lei Z, Li B, Zhou Y, Zhang GM, Feng ZH, Zhang B, Shen GX, Huang B. Rapamycin inhibits lung metastasis of B16 melanoma cells through down-regulating αv integrin expression and up-regulating apoptosis signaling. *Cancer Sci*. 2009; 101(2):494-500.
- Ye F, Petrich BG, Anekal P, Lefort CT, Kasirer-Friede A, Shattil SJ, Ruppert R, Moser M, Fassler R, Ginsberg MH. The mechanism of kindlin-mediated activation of integrin $\alpha IIb\beta 3$. *Curr Biol*. 2013; 23:2288-2295.
- Ye F, Snider AK, Ginsberg MH. Talin and kindlin: the one-two punch in integrin activation. *Front Med*. 2014; 8:6-16.
- Yi JM, Tsai HC, Glöckner SC, Lin S, Ohm JE, Easwaran H, James CD, Costello JF, Riggins G, Eberhart CG, Lattera J, Vescovi AL, Ahuja N, Herman JG, Schuebel KE, Baylin SB. Abnormal DNA methylation of CD133 in colorectal and glioblastoma tumors. *Cancer Res*. 2008; 68(19):8094-103.
- 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.

Yue WY, Chen ZP. Does vasculogenic mimicry exist in astrocytoma? *J Histochem Cytochem.* 2005; 53(8):997-1002.

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.

Zagzag D, Esencay M, Mendez O, Yee H, Smirnova I, Huang Y, Chiriboga L, Lukyanov E, Liu M, Newcomb EW. Hypoxia- and vascular endothelial growth factor-induced stromal cell-derived factor-1 α /CXCR4 expression in glioblastomas: one plausible explanation of Scherer's structures. *Am J Pathol.* 2008; 173(2):545-60.

Zemani F, Benisvy D, Galy-Fauroux I, Lokajczyk A, Collic-Jouault S, Uzan G, Fischer AM, Boisson-Vidal C. Low-molecular-weight fucoidan enhances the proangiogenic phenotype of endothelial progenitor cells. *Biochem Pharmacol.* 2005; 70(8):1167-75.

Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Köppel T, Jahantigh MN, Lutgens E, Wang S, Olson EN, Schober A, Weber C. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal.* 2009 Dec 8;2(100):ra8

Zhou J, Schmid T, Schnitzer S, Brüne B. Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer Lett.* 2006; 237(1):10-21.

Zhu J, Luo BH, Barth P, Schonbrun J, Baker D, Springer TA (2009) The structure of a receptor with two associating transmembrane domains on the cell surface: integrin α IIb β 3. *Mol Cell.* 2009; 34:234-249.

Zovein AC, Luque A, Turlo KA, Hofmann JJ, Yee KM, Becker MS, Fassler R, Mellman I, Lane TF, Iruela-Arispe ML. Beta1 integrin establishes endothelial cell polarity and arteriolar lumen formation via a Par3-dependent mechanism. *Dev Cell.* 2010; 18(1):39-51.