



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA

TERCIA RODRIGUES ALVES

MODULAÇÃO DA APOPTOSE E DA DIFERENCIAÇÃO
ANGIOGÊNICA EM GLIOMAS HUMANOS:
PAPEL DA MATRIZ EXTRACELULAR TUMORAL

RIO DE JANEIRO
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

TERCIA RODRIGUES ALVES

MODULAÇÃO DA APOPTOSE ENDOTELIAL E DA
DIFERENCIAÇÃO ANGIOGÊNICA EM GLIOMAS HUMANOS:
PAPEL DA MATRIZ EXTRACELULAR TUMORAL

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular.

Orientadores: Vivaldo Moura Neto
Verônica Morandi

Laboratório de Morfogênese Celular – Departamento de Anatomia - Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade Federal do Rio de Janeiro

RIO DE JANEIRO
2007

ALVES, Tercia Rodrigues.

Modulação da apoptose e da diferenciação angiogênica em gliomas humanos: papel da matriz extracelular tumoral / Tercia Rodrigues Alves. Rio de Janeiro, 2007.

xviii, 160

Tese (Doutorado) – UFRJ / Instituto de Ciências Biomédicas / Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas

Orientadores: Vivaldo Moura Neto
Verônica Morandi

1. Célula endotelial. 2. Matriz extracelular. 3. Glioma. 4. Apoptose
I. Moura Neto, Vivaldo (orient.). II Morandi, Verônica (orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas. IV. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

“Modulação da apoptose e da diferenciação angiogênica em gliomas humanos: papel da matriz extracelular tumoral”

Tercia Rodrigues Alves

Rio de Janeiro, 22 de Junho de 2007

Presidente da Banca:

Prof.: Vivaldo Moura Neto
Professor Titular, Departamento de Anatomia, UFRJ, RJ

Dra.: Eliete Bouskela
Professora Adjunta, Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF)/IBRAG- UERJ, RJ

Dr. Jorge Marcondes
Médico Neurocirurgião, HUCCF, RJ

Dra.: Daniela Uziel
Professora Adjunta, Departamento de Anatomia, UFRJ, RJ

Revisor e Suplente Externo: Dra.: Loraine Campanati, Professora Adjunta - UFRJ

Suplente Interno: Dra.: Flávia Gomes, Professora Adjunta - UFRJ

Orientadores: Dr.: Vivaldo Moura Neto, Orientador, professor Titular – UFRJ

Dra. Verônica Morandi, Orientadora, professora Adjunta - UERJ

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Morfogênese Celular, do Instituto de Ciências Biomédicas – Departamento de Anatomia – UFRJ; Laboratório de Biologia da Célula Endotelial e Angiogênese – Departamento de Biologia Celular e Genética – UERJ; Laboratoire de Protéines Adhésives des Cellules Vasculaires et Sanguines –INSERM U353, Paris, França, e sob a orientação dos Professores Vivaldo Moura Neto e Verônica Morandi. Contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Programa de Cooperação Internacional com a França (CAPES-COFECUB) e Programa dos Núcleos de Excelência (PRONEX).

*Trabalhe como se não precisasse de dinheiro,
ame como se nunca tivesse sido ferido, dance
como se ninguém estivesse olhando, e viva
como se o Céu fosse na Terra!*

Em memória da Jojô

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre em primeiro;

À minha família, que sempre me apoiou. Nunca conseguiria sem vocês!

À minha orientadora, Verônica Morandi que me iniciou na ciência e é alguém que sempre tem muito a me ensinar;

Ao meu orientador, Vivaldo Moura Neto com quem aprendi e cresci muito nesses anos de convívio em seu laboratório;

À Chantal Legrand, pela oportunidade de estágio em seu laboratório INSERM U353, Paris-França;

À CAPES e à FAPERJ pelas bolsas concedidas nesses quatro anos de tese;

Ao Dr. Jorge Marcondes, neurocirurgião e colaborador do nosso grupo;

À professora Cristina Takyia pela grande simpatia e apoio científico;

Ao professor George dos Reis, pela imensa ajuda e gentileza na doação do meu primeiro lote de anexinaV-FITC;

Ao professor Alberto Nóbrega, pela paciência e grande disponibilidade em me ajudar na padronização dos experimentos em citometria de fluxo;

À amiga Sandra Konig, pela amizade, carinho e ajuda, especialmente, neste caso, na redação desse trabalho. Obrigada Chuchu!

Aos amigos que contribuíram diretamente neste projeto: Jane Amaral, com quem passei dias de intenso trabalho no lab; Anna Fonseca, que nunca se negou a analisar amostras de citometria de fluxo num domingo de manhã; Suzana Kahn, pela cultura sempre de astrócitos a mão e ajuda na incorporação de Timdina-H³; Sara Nunes, pela disponibilidade de ir a UFRJ e me proporcionar a primeira figura da Tese; Nathan Vianna, pelo vídeo de apoptose mais lindo que eu já vi e pelas sugestões maravilhosas de quantificação morte X tempo; Luciana Romão, pela gentileza em me ceder astrócitos; Bruno Pontes, pelo suporte com a videomicroscopia; Rose, pelo preparo dos reagentes e etc indispensáveis ao trabalho; Temperinni, pelas HUVECs sempre na medida e na hora exata, Dona

Luiza, pela simpatia e ajuda no material do lab; A Giselle, por ter me ajudado sempre na citometria mesmo se fosse as 22h da noite;

Aos amigos que sempre me ajudaram com protocolos, dúvidas, disponibilidade, e amizade: Camila, Marianna, Francisco, Andréa, Gabriela, Viviane, Paula, Sheila, Gustavo, Rossana, Loraine, Flávia, Helena, Karla, Michele, Jean-Christophe.

A Rosângela Ramos, pela amizade, carinho e ajuda pra toda e qualquer hora;

Ao Marcos e ao Vitor, secretários do DBCG, pela amizade e ajuda dada sempre!

A Tânia, secretária do PCM, pela disponibilidade e ajuda.

A todos os professores, funcionários e amigos dos departamentos de Anatomia (UFRJ) e do DBCG (UERJ), vizinhos que sempre me ajudaram.

Aos amigos que não participam diretamente na minha vida profissional, porém me apoiaram tanto nos dias mais difíceis.

A Deus, à família, aos meus orientadores, aos colaboradores, aos não-colaboradores, aos amigos-irmãos, aos amigos, aos colegas e aos conhecidos. Obrigada! Eu não teria conseguido sozinha.

RESUMO

ALVES, Tercia Rodrigues. **Modulação da apoptose endotelial e da diferenciação angiogênica em gliomas humanos: papel da matriz extracelular tumoral.** Rio de Janeiro, 2007. Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

Os gliomas são tumores de origem glial e constituem mais de 40% de todos os neoplasmas do sistema nervoso central (SNC), em particular aqueles de composição astrocítica ou astrocitomas. São extremamente invasivos, infiltrativos, destrutivos e fatais. Apesar de serem altamente vascularizados, possuem uma angioarquitetura aberrante e sub-funcional. Dentre as particularidades dos gliomas, destacamos a distinta matriz extracelular (MEC) que secretam, onde a tenascina-C (TN-C) é expressa e incorporada em elevados níveis, uma glicoproteína matricelular desadesiva que compete com a glicoproteína adesiva fibronectina (FN), desestabilizando os contatos focais e induzindo proliferação celular em gliomas. Nos vasos quiescentes neurais a TN-C não é expressa, porém está fortemente localizada ao redor dos vasos recém-formados do glioma e parece colaborar com a angiogênese tumoral. Neste trabalho, nós nos propusemos a investigar o papel da MEC de gliomas na interação com células endoteliais. Nós demonstramos assim, que a MEC de gliomas induz *anoikis* (apoptose por perda/falta de adesão) numa sub-população de células endoteliais em progressão do ciclo celular (S-G2/M). O processo de desaderência endotelial também se repetiu em sistemas de co-cultura com linhagens celulares de glioma ou explantes de tumores gliais humanos, sugerindo que a morte endotelial provém do contato direto com tais células e não pela lise celular e desarranjo da arquitetura matricial. Contudo, as células endoteliais que sobreviveram à *anoikis* são mais proliferativas, apesar de menos eficientes na formação de estruturas tipo capilares *in vitro*, quando comparadas a células endoteliais cultivadas sobre MEC de fibroblastos ou autólogas. Ao estudarmos a composição da MEC de diferentes linhagens de gliomas humanos, vimos que todas possuem uma elevada relação TN/FN, sendo os níveis de FN muito abaixo dos níveis das MECs consideradas adesivas para as células endoteliais (secretadas por fibroblastos ou autólogas). Nós mostramos também que o domínio EGF-like da TN-C presente na MEC de glioma U373 está envolvido no comprometimento da angioarquitetura das células endoteliais. Nós sugerimos que esta proliferação endotelial acentuada e a má organização endotelial é condizente com o perfil de vascularização da massa tumoral *in vivo* e que a MEC do glioma parece exercer um papel ativo e essencial no estabelecimento da rede vascular tumoral.

ABSTRACT

ALVES, Tercia Rodrigues. **Modulação da apoptose endotelial e da diferenciação angiogênica em gliomas humanos: papel da matriz extracelular tumoral.** Rio de Janeiro, 2007. Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

Gliomas are tumors of glial origin responsible for more than 40% of all neoplasms of the central nervous system (CNS), in particular, those of astrocytic origin or astrocytomas. These solid tumors are extremely invasive, infiltrative, destructive and lethals. Despite their high vascularity, they exhibit an abnormal and subfunctional vascular network. Among the particularities of gliomas, we focused on their secreted extracellular matrix (ECM) composition, with high levels of tenascin-C (TN-C), a matricellular glycoprotein that disorganizes focal adhesion induced by fibronectin, thus resulting in glioma cells proliferation. TN-C is not expressed by quiescent brain endothelial cells, but instead, it is strongly upregulated around angiogenic vessels inside the tumor mass, and it seems to induce angiogenesis. In this work, we investigated the role of glioma ECM in the endothelial-tumoral context. We demonstrated that an endothelial sub-population in progress through the cell cycle (S-G2/M) undergo *anoikis* (cell adhesion-dependent apoptosis). The endothelial *anoikis* was also observed in co-culture systems with glioma cell lines or explants from glioma human tumors, and it may suggest that endothelial cell death could be induced by direct tumor contact. However, endothelial cells that survived to *anoikis* were more proliferative and less efficient to form tube-like structures *in vitro*, when compared to endothelial cells cultures plated on autologous matrix or onto the matrix secreted by fibroblasts. We also studied the composition of glioma ECM from different cell lines and all of them exhibited an increased TN/FN ratio as compared to autologous ECM or to that secreted by fibroblasts, shown to be highly adhesive for endothelial cells. We also showed that the EGF-like domain of the U373 glioma TN-C is involved in the impairment of tubulogenesis by endothelial cells that interacted with tumoral matrix. Thus, we suggest that these effects of tumor ECM on endothelial tubulogenesis or proliferation would match with the pattern of angioarchitecture of the tumor mass *in vivo*. We also propose that the extracellular matrix of gliomas have an active and very important role in the tumoral vascular network.

LISTA DE ESQUEMAS, FIGURAS E TABELAS

- Esquema 1.** Progressão maligna de astrocitoma humano (do grau I ao IV) segundo a classificação da WHO.
- Esquema 2.** Estágios de adesão e indução do *estágio de adesão intermediário* por proteínas matricelulares.
- Esquema 3.** Domínios estruturais da TN-C e sua expressão no tecido canceroso.
- Esquema 4.** Desenho esquemático mostrando as características do contato astrócito-endotélio, os pés vasculares.
- Esquema 5.** Modelo *in vivo* em camundongo mostrando cinco estágios da progressão do glioma.
- Figura 1.** HUVECs aderem sobre diferentes tipos de MEC nas primeiras horas de cultivo.
- Figura 2.** HUVECs descolam mais acentuadamente da MEC de glioma U373 em 24 horas de cultura.
- Figura 3.** Quantificação em tempo real (videomicroscopia) da desaderência das células endoteliais sobre diferentes matrizes.
- Figura 4.** Quantificação das células endoteliais em apoptose sobre as diferentes matrizes.
- Figura 5.** HUVECs morrem por apoptose mais acentuadamente por desaderência de matrizes de glioma.
- Figura 6.** Meio condicionado (MC) de glioma ou de astrócitos normais não revertem o efeito de indução de apoptose causado pelas matrizes secretadas por estas células gliais.
- Figura 7.** Desaderência das HUVECs das MECs de gliomas humanos em 24 h de cultura.
- Figura 8.** Marcação de anexina V-FITC e iodeto de propídeo em HUVECs após 24 h de cultivo sobre MECs de outros tipos de glioma e outros tumores não gliais.
- Figura 9.** As HUVECs entram em apoptose em contato direto com MECs imobilizadas livre de células ou em contato direto com células endoteliais de glioma (co-cultura).
- Figura 10.** Explantes de GBM induzem *anoikis* das células endoteliais próximas e diferenciação indicativa de tubulogênese nas células mais distantes ao tumor.

- Figura 11.** Explante embebido em gel de fibrina induz diferenciação tubulogênica das HUVECs mais distais ao fragmento e parece induzir *anoikis* nas células endoteliais proximais.
- Figura 12.** O repouso do explante de oligodendroglioma não danifica o tapete celular endotelial.
- Figura 13.** Explante de oligodendroglioma induz *anoikis* endotelial de HUVECs próximas e diferenciação angiogênica das HUVECs distais ao explante tumoral.
- Figura 14.** Explante de oligodendroglioma acentua a *anoikis* de HUVECs próximas ao tumor após 48 horas de cultivo.
- Figura 15.** Explante do mesmo oligodendroglioma humano não causa *anoikis* na monocamada de fibroblastos FGH.
- Figura 16.** A linhagem de glioma humano U373 incorpora pouca quantidade de FN e alta quantidade de TN em sua matriz.
- Figura 17.** Padronização de um método semi-quantitativo para determinação do conteúdo de fibronectina e tenascina em matrizes nativas.
- Figura 18.** Células endoteliais resistentes à *anoikis* induzida pela matriz do glioma U373 se tornam mais proliferativas.
- Figura 19.** Células endoteliais resistentes à *anoikis* induzida pela matriz do glioma U373 não estabelecem uma correta angioarquitetura.
- Figura 20.** O domínio EGF-like da TN não interfere na desaderência das HUVECs após 6 horas de contato com as matrizes testadas.
- Figura 21.** HUVECs em fase G0/G1 do ciclo celular permanecem aderidas à MEC de glioma de maneira equivalente às MECs adesivas.
- Figura 22.** O domínio EGF-like da TN influencia na capacidade tubulogênica de células endoteliais que estão em fase G0/G1.
- Figura 23.** O domínio EGF-like da TN influencia na capacidade tubulogênica de células endoteliais heterogêneas.

Figura 24. Modelo esquemático da indução de apoptose endotelial em fase S-G2/M na co-optação de células de glioma humano *in vivo*.

Figura 25. ANEXO 1. Cultura de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC).

Figura 26. ANEXO 1. Co-cultura de neurônios e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC).

Figura 27. ANEXO 1. Co-cultura de neurônios e células de astrócitos corticais ou de células de glioblastoma humano .

Tabela 1. Mudanças vasculares que acompanham a progressão maligna de astrocitomas são incluídas no critério de classificação, segundo a WHO.

Tabela 2. Marcadores endoteliais.

Tabela 3. Exemplos de algumas aberrações do endotélio em gliomas.

Tabela 4. Comparação dos teores de fibronectina e tenascina em matrizes nativas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

9L - linhagem de glioma humano
A172 - linhagem de glioma humano
ADP - difosfato de adenosina
AH - ácido hialurônico
APC - célula precursora astrocitária
ATCC - American Type Culture Collection
ATP - trifosfato de adenosina
BRE - linhagem de célula endotelial de retina bovina
C6 - linhagem de glioma humano
Cdk - ciclina dependente de quinase
CDK4 - gene da CDK4 (ciclina dependente de quinase 4)
CKI - inibidor de ciclina dependente de quinase
CPHE - célula progenitora hematopoiética/endotelial
EGF - fator de crescimento epidermal
EGFR- receptor de EGF
EPC - célula endotelial progenitora
FAK - quinase de adesão focal
FGF - fator de crescimento de fibroblastos
Flk-1 (VEGFR2) - receptor tipo tirosina quinase do VEGF
Flt-1 (VEGFR1) - receptor tipo tirosina quinase para VEGF
FN - fibronectina
GAG - glicosaminoglicano
GBM - glioblastoma
GBM0202 - linhagem de glioblastoma humano
GBM0302 - linhagem de glioblastoma humano
GBM95 - linhagem de glioblastoma humano
GFAP - proteína acídica fibrilar glial
GFP - proteína fluorescente verde
HUCCF - Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

HUVEC - célula endotelial de veia umbilical humana
LN - laminina
MC - meio condicionado
MCF-7 - linhagem de carcinoma mamário
MDA-MB-431 - linhagem de carcinoma mamário
Mdr-1 - produto do gene de multiresistência a drogas
MEC - matriz extracelular
MMAC1 - (gene) mutado em múltiplos câncer avançados
MMP - metaloproteinase
NFP - neurofilamento neuronal
PDGF - fator de crescimento derivado
SPARC - proteína secretada ácida rica em cisteína
TGF - fator de crescimento transformante
TGNM – tumor glioneuronal maligno
Tie-2 - receptor tipo tirosina quinase para angiopoietinas
TN - tenascina
TSP-1 – trombospondina-1
U373 - linhagem de glioma humano
U87 - linhagem de glioma humano
uPA – serino protease ativadora de plasminogênio tipo-uroquinase
VEGF – fator de crescimento de endotélio vascular
WHO – Organização Mundial de saúde

ÍNDICE

1- Introdução	19
1.1 Os gliomas	19
1.1.1 Classificação e diagnóstico	20
1.1.2 Gliomagenese: glia dulta x célula-tronco neural	26
1.1.3 Alterações genéticas	28
1.1.4 Invasão do glioma no parênquima cerebral	29
1.1.5 A matriz extracelular (MEC) tumoral: papel ativo na gliomagenese e angiogênese	32
Fibronectina	34
Laminina	36
Glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos	37
Proteínas matricelulares	38
Trombospondina-1	39
SPARC	41
Tenascina	41
1.2 As células endoteliais	45
1.2.1 Origem embrionária da célula endotelial	45
1.2.2 O endotélio cerebral	46
1.3 Mecanismos de formação de vasos sanguíneos	51
1.3.1 Angiogênese	51

Células endoteliais circulantes: vasculogênese pós-natal	54
Mimetismo vascular	55
Características do endotélio e da vascularização em gliomas	56
2. Foco do Estudo e Objetivos	65
2.1 Objetivos específicos	66
3. Materiais e Métodos	67
3.1 Animais	67
3.2 Cultura de células endoteliais humanas	67
3.3 Cultivo de linhagens celulares	67
3.4 Cultura primária de astrócitos de córtex de ratos neonatos	68
3.5 Obtenção das matrizes extracelulares (MEC) imobilizadas livre de células	69
3.6 Quantificação da adesão das células endoteliais cultivadas sobre MECs imobilizadas pelo método do MTT	70
3.7 Análise de adesões/contatos focais e formação de fibras de estresse durante a adesão inicial das células endoteliais sobre MECs imobilizadas	70
3.8 Quantificação da <i>anoikis</i> endotelial induzida por MECs imobilizadas	71
3.9 Quantificação em tempo real por videomicroscopia do descolamento endotelial das MECs imobilizadas	71
3.10 Análise das alterações morfológicas indicativas de apoptose endotelial no cultivo sobre MECs imobilizadas	72
3.11 Quantificação dos núcleos apoptóticos das células endoteliais por 24 horas sobre MECs imobilizadas	73

3.12 Análise da apoptose endotelial através de marcações com anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo (PI) por citometria de fluxo	73
3.13 Quantificação da apoptose endotelial por TUNEL em sistemas de co-cultura HUVEC x glioblastoma	74
3.14 Dosagem qualitativa e semi-quantitativa das proteínas matriciais secretadas por ELISA indireto (ELISA- <i>enzyme linked immnuoabsorbant assay</i>)	75
3.15 Co-cultivo e análise da apoptose endotelial em sistemas de co-cultura de HUVECs com explantes de GBMs humanos	76
3.16 Dosagem de proliferação celular por incorporação de timidina tritiada	77
3.17 Determinação da proliferação celular por incorporação de MTT	77
3.18 Sincronização em Go/G1 das células endoteliais	78
3.19 Ensaio da tubulogênese em Matrigel [®] após o contato de células endoteliais com as MECs imobilizadas	78
3.20 Análise estatística	79

4 – Resultados	80
4.1 - A matriz extracelular de gliomas mantém a adesão e viabilidade das células endoteliais nas primeiras horas de cultura	80
4.2 - As células endoteliais desaderem da MEC de glioma U373 ao longo de 24 horas de cultivo	80
4.3 - Células endoteliais cultivadas sobre a matriz extracelular (MEC) de glioma morrem por apoptose	85
4.4 - A apoptose endotelial também é induzida por contato célula-célula	93
4.4.1 - Células de glioma em cultura causam apoptose endotelial, em sistema de co-cultura	93
4.4.2 - Explantes de gliomas em co-cultura causam desaderência de células endoteliais	.93
4.5 - Investigação dos componentes matriciais das células envolvidas no modelo de interação com as HUVECs por ELISA indireto	96
4.6 - Células endoteliais resistentes à <i>anoikis</i> induzida por matrizes tumorais possuem maior capacidade proliferativa	105
4.7 - Células endoteliais resistentes à <i>anoikis</i> induzida por matrizes tumorais possuem menor capacidade tubulogênica	106
4.8 - O domínio EGF-like da tenascina não está envolvido na adesão inicial das células endoteliais sobre as MECs imobilizadas	106
4.9 - Células endoteliais sincronizadas na fase G0/G1 resistem mais à <i>anoikis</i> induzida pela matriz de glioma	107
4.10 - O domínio EGF-like da TN contribui para a baixa eficiência tubulogênica das células endoteliais causada pela matriz de glioma U373	111
5 – Discussão .	116

5.1 - Adesão e viabilidade celular no endotélio	116
5.2 - Apoptose endotelial no curso da angiogênese	120
5.3 - Relevância da composição da MEC de gliomas na interação com células endoteliais	123
5.4 Influência do glioma no comportamento de células endoteliais	125
5.5. O envolvimento da TN-C na eficiência tubulogênica	129
5.6 – Nossa contribuição ao modelo proposto de co-optação vascular por células tumorais gliais	133
6. Conclusão	136
7. Perspectivas	137
8. Referências Bibliográficas	138
ANEXOS	

1- Introdução

1.1 - Gliomas

Os astrócitos são células gliais, como a microglia (os macrófagos residentes do cérebro), oligodendrócitos e células endoteliais. E são característicos por sua morfologia tipicamente estrelada e longos prolongamentos celulares (Rataboul *et al.*, 1988). Os astrócitos expressam uma proteína de filamento intermediário do citoesqueleto chamada proteína acídica fibrilar glial (GFAP), conhecida como um marcador típico de diferenciação astrocitária (Eng *et al.*, 2000).

Gliomas são tumores de origem glial formados a partir da transformação maligna de astrócitos, oligodendrócitos ou de seus progenitores. Constituem os mais comuns tumores cerebrais, correspondendo a mais de 40% de todos os neoplasmas do sistema nervoso central (SNC), em particular aqueles de composição astrocítica ou astrocitomas (Kleihues *et al.*, 1995). Contudo, as células que dão origem ao glioma ainda não foram identificadas de maneira convincente (Sanaí *et al.*, 2005).

Os astrocitomas, em geral, são caracterizados por apresentarem heterogeneidade celular em múltiplos níveis – aparência, antigenicidade, estabilidade genética, quimiosensibilidade e radiosensibilidade (revisto por Guérin e Laterra, 1997). Apesar da barreira hematoencefálica nos gliomas apresentar disfunções, a mesma está em geral preservada na região peritumoral, fato que dificulta a disseminação sistêmica de drogas terapêuticas (Neuwelt *et al.*, 1986). Como são tumores muito invasivos e infiltrantes - embora não metastáticos (Hochberg & Puitt, 1980), a remoção cirúrgica é muitas vezes inviável e infrutífera.

A sobrevida média dos pacientes portadores de glioblastomas não ultrapassa um ano, sendo a sobrevida após 5 anos igual a 0% (revisto por Plate e Risau, 1995), a despeito do uso de estratégias agressivas tais como cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Este quadro de sobrevida não difere significativamente do descrito em um estudo de 1959, no qual a sobrevida média era de 10 meses, sem nenhum paciente sobrevivente após 5 anos do diagnóstico inicial da doença. Isto sugere que poucos

progressos terapêuticos puderam ser feitos para enfrentamento destes tumores e claramente indica que novas abordagens são necessárias no tratamento e cura destes tumores malignos.

1.1.1 - Classificação e diagnóstico

O ideal no sistema de identificação e diagnóstico dos tumores gliais é que este seja mundial, ou seja, preciso, reprodutível e utilizado por toda comunidade científica, independente da situação financeira.

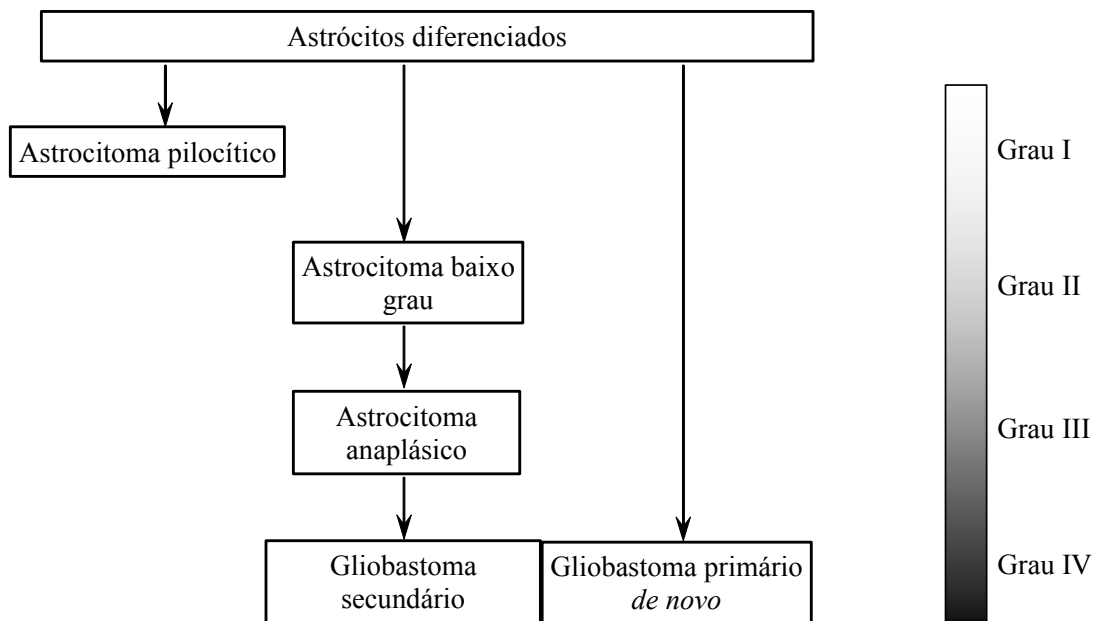
Existem dois ramos conceituais de classificação diagnóstica dos tumores gliais, incluindo astrocitomas, oligodendrogliomas e os tumores mistos (oligoastrocitomas). A primeira que descreveremos é a classificação da WHO (World Health Organization) e em seguida, a classificação Sainte-Anne/Mayo.

Em 1979, a classificação dos gliomas da WHO foi estabelecida baseando-se em dois grandes conceitos: a teoria de Bailey e Cushing, de 1926, que defende a idéia de que os tumores surgem de células embrionárias capazes de se diferenciar, e a hipótese de Kernohan, de 1949, que propõe que os tumores surgem pela desdiferenciação de células gliais adultas. Assim, a classificação da WHO herdou a definição subjetiva de diferenciação e o valor histoprogóstico baseando-se nas características histológicas intrínsecas a cada tipo celular (Figarella-Branger & Bouvier, 2005). Esta classificação gradua ainda os astrocitomas em até quatro graus de malignidade (vide Tabela 1), os oligodendrogliomas e oligoastrocitomas em até três graus de malignidade. Os glioblastomas (GBMs) se encaixariam no grau mais maligno dos astrocitomas e poderiam surgir *de novo*, ou evoluiriam a partir de gliomas de baixo grau, conforme ilustra o Esquema 1. Os critérios histopatológicos considerados incluem atipia nuclear, mitoses, proliferação endotélio/capilar e necrose, além de evidências clínicas, como progressão, idade do paciente e localização cerebral (Kleihues *et al.*, 1995; Figarella-Branger & Bouvier, 2005).

Um problema freqüente no diagnóstico de gliomas feito de acordo com os conceitos da WHO é a grave falta de reprodutibilidade entre os patologistas. Isto acontece pela dificuldade em se distinguir a natureza da célula tumoral (astrócitos ou oligodendrócitos) principalmente pela falta de um marcador exclusivo e confiável para oligodendroglioma (Sanson *et al.*, 2004). Outro fator importante é a

subjetividade na graduação tumoral, que envolve a noção pessoal de anaplasia e de densidade celular (Figarella-Branger & Bouvier, 2005). Um impasse a mais é a questão dos oligoastrocitomas. Qual a porcentagem para cada tipo celular necessária para o diagnóstico? Não pode haver precisão diagnóstica quando se abre margem à subjetividade pessoal.

A classificação da WHO incorporou, de fato, em seus critérios de diagnóstico, análises imuno-histoquímicas da expressão de proteínas de citoesqueleto vimentina e a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF). Também foram acrescentadas análises moleculares, por exemplo, a perda ou mutação do gene p53, perda do MMAC1 (*mutated in multiple advanced cancers*), amplificação do CDK4 (*cyclin dependent kinase 4*) e dos receptores dos fatores de crescimento EGF – *epidermal growth factor* e PDGF (*platelet derived growth factor alpha*) [Plate & Risau, 1995; Mentlein & Held-Feindt, 2003]. Entretanto, desde que surgiu, a classificação da WHO não mudou expressivamente, tampouco a sobrevida dos pacientes com gliomas, o que indica que é preciso que outras alternativas sejam utilizadas para que o diagnóstico do paciente e conseqüente o tratamento seja correto e eficaz.



Esquema 1. Progressão maligna de astrocitoma humano (do grau I ao grau IV) segundo classificação da WHO – *World Health Organization* (Kleihues *et al.*, 1995). A gradação dos tons de cinza no retângulo à direita representa a progressão maligna tumoral.

Tabela 1. Mudanças vasculares que acompanham a progressão maligna de astrocitomas também são incluídas no critério de classificação, segundo a WHO (Pietsch & Wiestler, 1997)¹.

	Classificação	Invasão	Idade de ocorrência	Comportamento
Grau I	Neoplasma benigno ou semi-benigno Astrocitoma pilocítico	Não invasivo	Mais comum em crianças	Bem demarcado Raramente evolui para anaplasia
Grau II	Neoplasma benigno ou semi-benigno Astrocitoma fibrilar ou gemistocístico de baixo grau	Infiltrante difuso	Adultos	Infiltração extensa do tecido cerebral adjacente; comprometimento de estruturas pré-existentes como axônios mielinizados e neurônios corticais Padrão de crescimento de difícil definição Forte potencial de progressão maligna para o grau III ou IV
Grau III	Maligno Astrocitoma anaplásico			Possível progressão para grau IV
Grau IV	Maligno Glioblastoma Multiforme			Mais frequente em adultos, ocasionalmente pode ser observado em crianças e em adultos jovens

¹Nota: A neovascularização está biologicamente correlacionada com a agressividade, grau de malignidade, e clinicamente está, inversamente correlacionada com a sobrevivência pós-operatória dos pacientes.

Tabela 1. *Continuação*

	Localização preferencial	Características histopatológicas	Tratamento/sobrevivência
Grau I	Estruturas da linha média (ex: nervo óptico, tálamo, tronco cerebral e cerebelo)	Bipolar Células fusiforme em matrix fibrilar (as vezes alternando com áreas microcísticas) Fibras de Rosenthal	Crianças podem ser curadas por remoção cirúrgica Remoção subtotal frequentemente resulta em quadro clínico estável por vários anos seguido de lenta recorrência
Grau II	Qualquer região do SNC	Atividade mitótica não elevada População de células neoplásicas com citoplasma eosinofílico, forte marcação GFAP e núcleo excêntrico	Recorrência após remoção cirúrgica
Grau III		Alta densidade celular, pleomorfismo celular e alta atividade mitótica Proliferação vascular moderada Ausência de necrose Pode conter áreas correspondentes a graus mais baixos indicando uma origem a partir de lesões menos malignas	Histórico clínico curto. Doença rapidamente progride apesar de intensos esforços terapêuticos, incluindo ressecção cirúrgica, radiação e quimioterapia
Grau IV	Predominantemente nas regiões supratemporais, porém pode também ter origem em outras regiões do SNC	Células neoplásicas pequenas e pobremente diferenciadas Possível presença de células gigantes multinucleadas Alta atividade mitótica e uma fração significativa de células tumorais em proliferação são comumente detectadas. Acentuada proliferação de células endoteliais e necrose (a vasculatura tumoral anormal frequentemente está associada a trombos e subsequente necrose das áreas tumorais adjacentes)	

A classificação feita pelo Hôpital Sainte-Anne (Paris, França) foi coordenada pela Dra. Catherine Daumas-Duport em colaboração com a clínica Mayo (EUA) e se chama classificação Sainte-Anne/Mayo. A WHO não a reconhece como um sistema de classificação, porém, ao longo dos anos a classificação Sainte-Anne/Mayo vem apontando possíveis falhas no sistema atual de identificação dos gliomas proposto pela WHO. A base de seu diagnóstico atual é através do estudo das biópsias correlacionadas à técnicas de imagem (ressonância magnética ou *scanner*). Desta forma é possível definir a estrutura espacial do glioma (tumor do tipo infiltrante, sólido ou ambos), o modo de crescimento no tecido cerebral e de redefinir o critério para o difícil diagnóstico dos oligodendrogliomas.

O tumor sólido apresentaria além das próprias células tumorais, microangiogênese e uma região que capta o contraste como visto na técnicas de imagem. Contudo, algumas células tumorais poderiam isoladamente, se infiltrar no parênquima adjacente absolutamente normal, intacto e sem neovascularização, caracterizando o tumor infiltrativo, sem captação de contraste, visto na imagem. Assim, astrocitomas pilocíticos seriam compostos unicamente por tecido tumoral, os glioblastomas seriam mistos, compostos por tecido tumoral e também por células tumorais isoladas infiltrantes, e os oligodendrogliomas e os oligoastrocitomas, no início da evolução, por células tumorais isoladas infiltrantes (Figarella-Branger & Bouvier, 2005).

Assim, segundo a classificação Sainte-Anne/Mayo, os gliomas infiltrantes se classificariam em:

- 1) Oligodendroglioma A ou B;
- 2) Oligoastrocitomas (contendo componentes astrocitários gemistocísticos misturados a oligodendroglia) grau A ou B. O grau B seria o grau mais maligno e apresentaria forte expressão de VEGF (Varlet *et al.*, 2000) e hiperplasia endotelial com captação de contraste;
- 3) Glioblastomas, e;
- 4) Tumor glioneuronal maligno (TGNM) o qual abordaremos sucintamente mais adiante.

Os gliomas astrocitários são altamente angiogênicos, ao contrário dos oligodendrogliomas ou oligoastrocitomas que podem passar anos sem captação de contraste detectada na produção de imagem. Nestes, a angiogênese seria um evento tardio caracterizando a passagem do grau A para o grau B. Os glioblastomas não seriam formados pela progressão de tumores de graus menos malignos.

A progressão da malignidade em GBMs é acompanhada de proliferação vascular (Daumas-Duport, 1988). Os GBMs são, portanto, conhecidos por sua alta vascularização e estão entre os tumores humanos mais vascularizados. Nas técnicas de imagem, há uma visível captação de contraste em anel e edema. A histologia varia de acordo com a região em que foi feita a biópsia. A amostra tecidual retirada da região de captação de contraste apresenta proliferação tumoral densa, polimorfa, com atipias nucleares, mitoses, proliferação endotélio-capilar e necrose. A diferenciação astrocitária é certa e exclusiva, há uma positividade heterogênea de GFAP no seio tumoral. A presença de uma disposição celular em palissada em volta da zona de necrose não é característica de glioblastomas, como considera a WHO. Se a amostra da biópsia for retirada fora da zona de captação de contraste, na zona de edema, esta apresentará no exame histopatológico células tumorais isoladas infiltrativas que consistem, em sua maioria, de elementos indiferenciados com núcleos hipercromáticos desprovidos de citoplasma, sem expressão de GFAP e altamente proliferativos. A correlação com as técnicas de imagem, principalmente no caso dos GBMs é fortemente defendida pela classificação de Sainte-Anne/Mayo, pois a zona infiltrativa composta de células isoladas e correspondente à zona de edema poderia ser facilmente confundida com astrocitomas graus II ou III quando na verdade trata-se de um glioblastoma heterogêneo (Figarella-Branger & Bouvier, 2005).

A classificação de Sainte-Anne/Mayo vai de encontro à classificação estabelecida pela WHO. Um exemplo claro disso é o complicado diagnóstico dos oligodendrogliomas infiltrativos (composto por células tumorais isoladas infiltrantes no parênquima sadio). Este tumor causa gliose reativa dos astrócitos que pode ser vista por imunomarcção com anti-GFAP. De acordo com a WHO, estes tumores são interpretados como astrocitomas fibrilares grau II ou mesmo como astrocitomas anaplásicos grau III devido à presença de mitose na área (Varlet *et al.*, 2000; Figarella-Branger & Bouvier, 2005).

O tumor glioneuronal maligno (TGNM) é constantemente confundido com astrocitomas grau III ou IV de acordo com a WHO, porém tem comportamento biológico distinto. Pode ser encontrado em crianças ou em adultos preferencialmente no lobo temporal e a recorrência e metástase podem ser frequentes. Apresenta mitose, necrose com padrão pseudopalisádico, edema e captação de contraste demonstrado pela técnicas de imagem. Contudo, apresenta grande variação de um tumor para outro. A presença de uma população neuronal anaplásica pode ser confirmada pela imunomarcção do

neurofilamento neuronal (NFP). Uma população GFAP positiva também é encontrada nestes tumores, e mais ainda, é comum a presença de células duplamente positivas para NFP/GFAP o que pode sugerir que seriam células pluripotentes como células-tronco (Varlet *et al.*, 2004)

As análises de imagens, histológicas, estatísticas, e de frequência de ocorrência não parecem ser ainda suficientes para um diagnóstico preciso, sem margens a enganos. O tratamento do paciente começa com o diagnóstico e é preciso conhecer a natureza da célula que dá origem ao glioma a fim de se desenvolver, eventualmente, marcadores celulares/genéticos específicos para a identificação destas células gliais tumorais. Afinal, como diagnosticar e tratar o tumor quando não se conhece a natureza celular da gliomagenese?

1.1.2 - Gliomagenese: Glia adulta *versus* célula-tronco neural

No embrião, as células-tronco são caracterizadas por sua habilidade de auto-renovação e diferenciação multipotente. Na vida adulta, vários tecidos também contêm células-tronco somáticas auto-renováveis (ou células-tronco adultas) em nichos específicos capazes de se diferenciar em vários tipos celulares com a principal função de regeneração tecidual (Lotem & Sachs, 2006). Entretanto, ao contrário do que se acreditava anteriormente, as células-tronco adultas têm uma plasticidade de diferenciação muito ampla e não somente tecido-específica. Sob as condições certas, o genoma das células-tronco adultas pode ser reprogramado epigeneticamente, resultando numa multipotencialidade de diferenciação. A plasticidade de diferenciação vai além da sua linhagem de origem, dependendo apenas da acessibilidade para transcrição dos genes que estariam livremente expressos nos outros tecidos. A reprogramação epigenética de uma célula tem o exemplo famoso da ovelha Dolly. O núcleo de uma célula somática adulta foi transferido para um oócito anucleado e assim reprogramado para formar um embrião normal (Wilmut *et al.*, 1997).

O desenvolvimento do câncer envolve tanto mudanças genéticas como epigenéticas que resultam em crescimento e diferenciação celular. Vários tumores têm em sua população células-tronco auto-renováveis e embora estas sejam capazes de originar um câncer, células normais diferenciadas também podem ser reprogramadas, expressar propriedades de células-tronco e originar a doença (Lotem & Sachs, 2006). O estímulo epigenético (modificação na metilação do DNA ou na estrutura da

cromatina, por exemplo) pode restaurar o fenótipo normal em células cancerosas, embora não se conheça toda a extensão de tal propriedade. As células-tronco **tumorais** podem dar origem a células **normais**. Por exemplo, células-tronco tumorais de leucemia, neuroblastoma, carcinoma de cólon e carcinoma hepatocelular, podem se diferenciar em tipos celulares normais encontrados no sangue, cérebro, cólon e fígado, respectivamente (Lotem & Sachs, 2006). A transferência de núcleos de células de meduloblastoma para ovócitos anucleados resulta em desenvolvimento *in vitro* normal até blastocisto, sem qualquer traço morfológico que indique a proliferação indefinida típica dos tumores. Todavia, nenhum destes blastocistos sobreviveu após o dia E8,5 de gestação quando implantados no útero de uma fêmea, apesar de apresentarem diferenciação tecidual e os estágios iniciais de organogênese (Li *et al.*, 2003). Muitas destas interpretações experimentais da geração de tumores se aproximam dos experimentos iniciais de Pierce, utilizando-se de corpos embriões e demonstrando a progressão tumoral (Pierce, 1983).

No caso dos gliomas, a grande variabilidade fenotípica causa imensa dificuldade de se estabelecer um marcador celular de diagnóstico exclusivo e preciso para cada subtipo de glioma. Vejamos o exemplo de Olig1 e Olig2, dois fatores de transcrição expressos por oligodendrócitos normais, oligodendrogliomas e astrocitomas. Apesar de não serem expressos por tumores cerebrais não gliais, não são marcadores muito discriminativos para serem usados na rotina de diagnóstico de classificação de um glioma (Sanson *et al.*, 2004).

As células-tronco também podem ser encontradas em linhagens celulares e não somente nos tumores primários. Mesmo após anos em cultura, a linhagem de glioma de rato C6 possui células que podem gerar neurônios ou glia, parecendo ter papel na multiplicação indefinida destas células e para a malignidade quando injetadas em cérebro de camundongo *nude* (Kondo *et al.*, 2004). François Berger e colegas (2004) formularam um modelo especulativo onde tumores em geral, incluindo também os gliomas, teriam origem na divisão assimétrica de células-tronco neurais. A cada divisão assimétrica da célula-tronco neural – capaz de gerar neurônio ou glia - seria gerada uma nova célula-tronco tumoral, que permaneceria nesta zona germinal assintomática e uma outra célula **progenitora** tumoral que migraria e proliferaria dando formação ao glioma.

No sistema nervoso central de mamíferos adultos podem-se encontrar células-tronco neurais na zona subventricular, na camada subgranular do giro dentado hipocampal ou na substância branca

subcortical. As células progenitoras gliais podem ser encontradas no córtex, corpo caloso, camada branca periventricular, zona subventricular e giro dentado (Berger *et al.*, 2004, Lotem & Sachs, 2006).

As células progenitoras têm quimiosensibilidade diferente das células-tronco e são ainda capazes de migrar e proliferar para sítios distantes da zona germinal. A região da massa tumoral seria constantemente povoada por novas células progenitoras tumorais vindas da região clinicamente silenciosa, a zona germinal. Parece haver uma predileção comum das células-tronco neurais, células progenitoras e células de glioma pelo mesmo substrato - a substância branca e membranas basais dos vasos sanguíneos. A presença de células-tronco neurais, elementos progenitores e glia adulta diferenciada seria o substrato perfeito para uma transformação neoplásica (Sanai *et al.*, 2005).

1.1.3 - Alterações genéticas

As alterações genéticas necessárias para a transformação das células-tronco neurais e das células progenitoras ainda não foram completamente identificadas. Sabe-se que oncogenes como *Akt* e *KRas* parecem estar envolvidos na formação de tumores cerebrais condizentes histologicamente com glioblastomas em roedores (Sanai *et al.*, 2005).

Já foram identificadas algumas vias de alterações genéticas correlacionados ao desenvolvimento de um glioma. Dentre elas existem três vias principais: 1) inativação de p53 (associadas a astrocitomas) e perda dos cromossomos 1p e 19q (mais específico para oligodendrogliomas); 2) mais freqüente em astrocitomas anaplásicos, a deleção de P16/*CDKN2A* no cromossomo 9p21, inativação do gene *RBI* (retinoblastoma 1) no cromossomo 13q e amplificação de *CDK4* resultando interrupção do ciclo celular; 3) nos glioblastomas são mais freqüentes a inativação de *PTEN* no cromossomo 10q e amplificação e/ou rearranjo do gene *EGFR* (receptor do fator de crescimento EGF (*Epidermal Growth Factor*) ou do gene *PDGFR* (receptor de PDGF - Platelet Derived Growth Factor), envolvendo a sinalização de receptores do tipo tirosina kinase (Sanson *et al.*, 2004).

1.1.4 - Invasão do glioma no parênquima cerebral

A biologia de um glioma é bem distinta de outros tumores não cerebrais, pois o tumor glial encontra-se confinado num espaço delimitado pelos ossos da caixa craniana onde cresce somente nos espaços ventriculares preenchidos por fluido cefalorraquidiano ou destruindo e se infiltrando no parênquima cerebral sadio. Sua disseminação deve-se, portanto, à sua capacidade de migração celular ativa através do tecido tortuoso cerebral, ao invés de um simples espalhamento passivo. Os gliomas são particularmente migratórios e destrutivos, apesar de sua natureza não metastática. Respostas inflamatórias estão comumente associadas ao crescimento destes gliomas. Além de se espalhar localmente destruindo o tecido nervoso sadio, as células de um GBM podem, inclusive, migrar de um hemisfério para outro (Sontheimer, 2003). A presença de células isoladas que migraram e se infiltram no tecido cerebral sadio pode ser uma das causas da reincidência tumoral pós-cirurgia (Rao, 2003).

A migração celular pode refletir-se pelo papel das metaloproteases (MMPs), que pertencem a uma família de endopeptidases zinco-dependentes com 25 membros, de amplo espectro de hidrólise de proteínas extracelulares. Sabe-se que sua ação não só aumenta a migração tumoral como também estimula a progressão tumoral. A regulação das MMPs pode ser feita por expressão gênica, ativação das pró-enzimas e através dos inibidores teciduais específicos (TIMPs). Citocinas, fatores de crescimento, estresse físico, transformação, interação célula-célula e célula-matriz induzem expressão de MMPs (Rao, 2003). A expressão de metaloproteases pelos gliomas está intimamente relacionada à sua malignidade e capacidade migratória (Nakano *et al.*, 1995).

Em gliomas, a alta secreção de uPA (serino-protease ativadora de plasminogênio tipo-uroquinase) é inversamente relacionada ao prognóstico do paciente e parece estar relacionada à capacidade invasiva (Rao, 2003). A uPA é produzida na sua forma inativa pró-uPA que se liga ao seu receptor uPAR e é ativado pela plasmina. A plasmina por sua vez é ativada pelo próprio uPA através da clivagem do plasminogênio e assim cria-se um *feedback* positivo entre uPA e plasmina. A ancoragem de uPA ao receptor traz a atividade proteolítica à membrana celular tumoral.

Menos populares que as metaloproteases e as serino-proteases, as cisteíno catépsinas também oferecem importante contribuição no desenvolvimento tumoral. Existem 11 cisteíno catépsinas

humanas descobertas até o momento e pertencem à subfamília das papaínas das cisteíno-proteases. As cisteíno-catepsinas são predominantemente endopeptidases expressas constitutivamente, localizadas nas vesículas lisossomais citoplasmáticas e relacionadas à renovação protéica (Mohamed & Sloane, 2006). As cisteíno-catepsinas também são mais expressas em tumores em comparação às células normais. Podem ser secretadas, permanecerem nas membranas celulares ou dentro das vesículas endossomais e lisossomais sugerindo que o substrato pode mudar de acordo com a localização. No meio extracelular, podem degradar proteínas como laminina, tenascina C, colágeno tipo IV, E-caderina, osteonectina, e ativar pró-enzimas como uPA (Mohamed & Sloane, 2006). Tais enzimas são reguladas por inibidores endógenos pertencentes à família das cistatinas. São eles: estefinas, cistatinas e cininogênios. Dos inibidores intracelulares, os mais abundantes são as estefinas A e B.

A catepsina B é uma cisteíno-protease lisossomal que degrada vários componentes matriciais como colágeno, laminina e fibronectina e está relacionada à invasão e neovascularização de vários tipos de câncer incluindo gliomas (Yanamandra *et al.*, 2004). Análises imunohistoquímicas de 27 gliomas benignos e 73 gliomas malignos humanos revelou que as amostras indicando forte marcação para catepsina B se correlacionavam com o menor prognóstico do paciente. Células endoteliais de GBMs também apresentavam forte marcação para catepsina B e isto também se relacionava a baixa sobrevivência dos pacientes. A marcação da estefina A, um inibidor endógeno da catepsina B foi fraca e encontrada apenas em poucos gliomas benignos e alguns malignos (Strojnik *et al.*, 1999).

A invasão tumoral envolve atividades enzimáticas simultaneamente. Gondi e colaboradores (2004a) mostraram que o uso concomitante de transcritos truncados para catepsina B e para o receptor de uPA trouxe melhores efeitos na supressão do crescimento, migração, invasão e até indução de diferenciação endotelial em células de glioblastoma humano *in vitro*. Em um outro trabalho, Gondi e colegas (2004b) demonstraram que metaloproteinases e uPA também podem ser alvos terapêuticos simultâneos na supressão da progressão maligna com o uso de RNAs de interferência para uPA, uPAR e MMP-9. Contudo, o envolvimento conjunto de MMPs ativas e a cascata de uPA-plasmina na invasividade de gliomas já tinha sido demonstrada antes.

Células de gliomas migram muito mais em presença de astrócitos. Isto porque a glia normal secreta normalmente a forma pró-MMP-2 e níveis indetectáveis de MMP-2 ativa. Porém em co-cultura com células de glioma, os astrócitos passam a ativar a pró-MMP-2. A explicação se dá pela ligação de

uPA com seu receptor (uPAR) que leva à clivagem/ativação do plasminogênio em plasmina. Esta, por sua vez, cliva a pró-MMP-2, ativando-a (Le *et al.*, 2003).

Atualmente sabe-se que além do suporte enzimático, outras moléculas também cooperam na destruição tecidual abrindo o caminho no estabelecimento da massa tumoral glial. A alta secreção de glutamato parece estar diretamente relacionada ao crescimento do glioma (Rothstein & Brem, 2001). Células de glioma secretam este neurotransmissor em grandes quantidades (Ye & Sontheimer, 1999; Sontheimer *et al.*, 2003), e com isso os gliomas induziriam uma cascata apoptótica/citotóxica nos neurônios adjacentes, liberando espaço no tecido cerebral aproveitado pelo tumor. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório secretado nas fendas pré-sinápticas excitando os receptores pós-sinápticos, como o receptor NMDA permeável a Ca^{2+} . A retirada do glutamato da fenda sináptica é feita pelos astrócitos adjacentes através de transportadores de glutamato dependentes de Na^+ . O excesso de glutamato pode causar ativação prolongada dos receptores NMDA causando morte neuronal por excitotoxicidade.

Vários trabalhos na literatura demonstram que células de glioma secretam altas concentrações de glutamato matando os neurônios vizinhos. Entretanto estes dados são contraditórios na literatura. Não podemos ignorar que no crescimento tumoral deve haver recrutamento de microglia, a qual pela produção de NO poderia também induzir a morte neuronal (Rozenfeld *et al.* 2003).

A ativação prolongada dos receptores NMDA em neurônios pelo glutamato ativa calpaínas, que são cisteíno-proteases dependentes de Ca^{2+} . As calpaínas ativadas modulam negativamente a funcionalidade e o superestímulo dos receptores NMDA através da ativação de NF- κ B, resultando num efeito neuroprotetor durante processos isquêmicos, por exemplo. Entretanto, o papel do NF- κ B não foi esclarecido (Raynaud & Marcilhac, 2006).

Um outro mecanismo associado à invasão e crescimento do glioma através da destruição tecidual é a secreção de ATP. Este nucleotídeo tem efeito citotóxico no tecido cerebral normal, porém os gliomas são incapazes de metabolizar o ATP extracelular. Além disso, expressam pouquíssima quantidade de NTPDases, enzimas que hidrolisam ATP. A co-injeção de células da linhagem de glioma de rato C6 com apirase, uma enzima que hidrolisa ATP e ADP (Wink *et al.*, 2000), inibiu significativamente o crescimento da massa tumoral (Morrone *et al.*, 2006), sugerindo um papel vital do nucleotídeo na proliferação, invasão e estabelecimento da massa tumoral.

Uma situação controversa é um caso clínico que ilustra a migração do glioma ao longo de fibras nervosas mielinizadas da substância branca usando-as como trilhos para a disseminação cancerosa e não a destruindo (Pallud *et al.*, 2005). O tumor em questão era um oligodendroglioma grau III (WHO) ou oligodendroglioma grau B (Sainte-Anne/Mayo) de uma paciente de 25 anos de idade localizado no trato corticoespinal da cápsula interna, pedúnculo cerebral, ponte até a medula oblonga. Curiosamente, carcinomas sistêmicos que metastatizam o cérebro mostram um padrão morfológico muito mais delineado, invadem distâncias pequenas e em grupos celulares que lembram glândulas e não como as células isoladas infiltrantes dos gliomas. Todavia, os carcinomas metastáticos não tendem a migrar ao longo de vasos ou de feixes nervosos (Bellail *et al.*, 2004).

Nosso grupo demonstrou que neurônios co-cultivados com células de glioblastoma são capazes de estender neuritos, embora estes prolongamentos fossem menores em comparação com a co-cultura com astrócitos normais. Todavia, este resultado indica que o tumor de origem astrocitária, embora transformado pela neoplasia, ainda é capaz de promover um certo grau de neuritogênese. Além disso, sabe-se que a laminina é um substrato preferencial dos neurônios e estes modulam o padrão morfológico de expressão de laminina na matriz extracelular dos astrócitos e das células tumorais gliais (Faria *et al.*, 2006). Neste conjunto de experimentos verificamos que outro substrato que não glial, como células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HUVEC) não são bons substratos para o crescimento neurítico, podendo mesmo levar à morte neuronal (ver **Figura 26** no Anexo 1).

1.1.5 - A matriz extracelular (MEC) tumoral: papel ativo na gliomagênese e angiogênese

No sistema nervoso central (SNC) normal em desenvolvimento a MEC tem papel fundamental na migração de células precursoras gliais e neuronais, crescimento axonal, formação de sinapses e proliferação celular. No cérebro adulto, a matriz somente é remodelada durante os reparos de lesões ou na neoplasia (Bellail *et al.*, 2004).

Na composição da matriz extracelular de gliomas encontramos ácido hialurônico e outros glicosaminoglicanos (GAGs), proteoglicanos como BEHAB e versican V2, trombospondina, tenascina C, SPARC e laminina (Bellail *et al.*, 2004). Os colágenos fibrilares, laminina e fibronectina ficam

limitados às áreas perivasculares e vasculares. Entretanto, possuem alta capacidade de induzir adesão, migração e proliferação das células tumorais e endoteliais.

Os gliomas não podem crescer sem um pronunciado remodelamento da matriz extracelular do tecido que o circunda. O remodelamento matricial acontece de duas formas principais: 1) degradação proteolítica dos componentes do tecido normal adjacente, já abordado na *seção 1.1.5* ou; 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 seu tecido correspondente não-neoplásico (Castellani *et al.*, 2002). Com a alteração da MEC pode-se esperar que a interação célula-matriz sofra também profundas modificações.

Células malignas normalmente elaboram menos matriz em relação ao tecido normal de origem, precisando assim de uma quantidade mínima de matriz para crescerem. Para os tumores, uma matriz densa ou uma perda total de matriz inibe o crescimento e a migração celular. Essa matriz tumoral **intermediária** ótima à invasão cancerosa, não causaria *anoikis* (palavra do grego que significa “sem teto, sem abrigo” e é usada para identificar a apoptose causada por perda/falta de adesão) nas células tumorais, caso estas se destacassem do substrato pouco adesivo, pois as mesmas se tornaram independentes de ancoragem e se protegem secretando, por exemplo, mais proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 (Ruoslahti, 1999). Os 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.

As interações das células endoteliais com a MEC circundante 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. Além disso, a adesão endotelial à MEC é essencial à sobrevivência e estabilização endotelial (Davis & Senger, 2005). A importância desta adesão pode ser ilustrada pelo trabalho de Re e seus colaboradores (1994) que mostrou que células endoteliais impedidas de aderir ao substrato entram em apoptose.

A maioria dos componentes da membrana basal como laminina, colágeno tipo IV e perlecan (um proteoglicano contendo heparan-sulfato), entactina, trombospondina-1, tenascina-C, sindecan-2 -

outro proteoglicano contendo heparan sulfato, fatores de crescimento e proteases foram descritos na literatura promovendo a malignidade e/ou angiogênese ao promoverem a migração ou proliferação das células tumorais ou induzindo a formação de estruturas tubulares *in vitro* (Ferrari do Outeiro-Bernstein *et al.*, 2002); Zagzag *et al.*, 2002; Fears *et al.*, 2006; Engbring & Kleinman, 2003).

A injeção de células tumorais dissociadas em presença de Matrigel[®] aumenta a angiogênese e o crescimento da massa tumoral, exemplificando a participação ativa dos componentes matriciais como sinalizadores na tumorigênese/angiogênese (Engbring & Kleinman, 2003).¹

A seguir, daremos alguns exemplos do papel das proteínas participantes da MEC tumoral glial.

Fibronectina (FN)

A FN é uma glicoproteína dimérica de alto peso molecular (400 KDa) unida por ponte dissulfeto. Cada cadeia contém módulos repetitivos (tipos I, II, III) e variáveis gerados por *splicing* alternativo (Schwarzbauer, 1992). Os módulos formam domínios de ligação a uma variedade de moléculas extracelulares ou de superfície, incluindo colágenos, glicosaminoglicanos, fibrina, integrinas e a própria FN (Wierzbicka-Patynowski & Schwarzbauer, 2003). A FN é uma das glicoproteínas matriciais mais estudadas e medeia a adesão, ancoragem e migração celular através de integrinas como $\alpha_5\beta_1$ (Ruoslahti, 1999) que reconhece a seqüência RGD (arginina-glicina-aspartato) no módulo III₉ e por proteoglicanos membranares como os sindecan-4 no módulo III₁₃ (Huang *et al.*, 2001).

A FN é secretada pelas células como um dímero solúvel globular e subsequentemente incorporada à MEC como fibrilas insolúveis na superfície celular. Etapas posteriores de polimerização da FN, que envolvem integrinas e proteoglicanos, convertem-na em uma rede densa de multifibrilas interconectadas resultando num microambiente dinâmico para a célula. Estas fibrilas não são estáticas e sim reorganizadas e recicladas pelo movimento e densidade celular e por processos degradativos (Wierzbicka-Patynowski & Schwarzbauer, 2003).

²Nota: Matrigel[®] é a matriz extracelular secretada pela linhagem de sarcoma de camundongo Engelbrecht-Holm-Swarm e contém laminina, colágeno tipo IV, entactina e proteoglicanos assemelhando-se qualitativamente a uma membrana basal.

No sistema nervoso, tem papel importante na migração de neurônios corticais durante a vida embrionária orientando a migração neuronal para as camadas corticais (Thierry *et al.*, 1984). Já na tumorigênese, a expressão de FN está relacionada à supressão da migração celular. 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). Apesar da diminuição da FN na matriz do glioma, as células tumorais gliais migram sobre a FN purificada *in vitro* através do reconhecimento da proteína pelas subunidades de integrina α_v e β_1 (Friedlander *et al.*, 1996).

Um dos constituintes da MEC tumoral é a B-FN, uma isoforma da FN contendo o domínio B extra (a repetição tipo III completa) gerada por *splicing* alternativo. Com pouquíssimas exceções (como no trato reprodutor feminino), B-FN não é detectável em tecidos adultos, porém é superexpresso em tecidos embrionários e neoplásicos. A isoforma B-FN se acumula ao redor dos vasos sanguíneos durante a angiogênese e não em vasos já estáveis e maduros. Cerca de 96% dos astrocitomas de alto grau expressam B-FN ao passo que apenas 1,6% dos astrocitomas de baixo grau apresentam em seus vasos a presença de B-FN (Castellani *et al.*, 2002).

A produção e clivagem da FN parecem ter enorme relevância na progressão do câncer. A FN plasmática aumenta conforme o avanço da idade em humanos e atinge um crescimento exponencial a partir de 50 anos (Labat-Robert, 2002). Contudo, pessoas com câncer apresentam níveis da FN plasmática muito menores do que pessoas mais velhas do que elas, porém mais saudáveis. Isto provavelmente, devido ao alto catabolismo desta proteína que gera os fragmentos encontrados na circulação. Os fragmentos de FN gerados pela plasmina são potencialmente carcinogênicos e podem gerar novas atividades proteolíticas (Labat-Robert, 2002). A FN intacta não induz expressão e secreção de MMP-1, MMP-3 e MMP-9 apenas o fragmento de 120 kDa contendo a sequência RGD (reconhecida pela integrina $\alpha_5\beta_1$). Assim, talvez haja um ciclo que começaria com o avanço da idade: aumento na produção de FN, aumento na produção de enzimas proteolíticas que degradam a FN, liberação dos fragmentos de FN que contribuem para a transformação maligna, e finalmente, nova produção de FN (Labat-Robert, 2002).

A contribuição dos fragmentos de FN para a carcinogênese começou a ser sugerida com a observação de que, com a progressão da malignidade, é possível observar fragmentos de FN

pericelulares, indetectáveis em lesões benignas (Labat-Robert, 2002). A anastelina é um fragmento de 20 KDa derivado da primeira repetição tipo III da FN e tem função anti-angiogênica e antimetastática (Akerman *et al.*, 2005). Este fragmento angiostático interage com a FN formando uma matriz polimerizada, fibrilar, enquanto a proteína intacta tem sido descrita na literatura como indutora de adesão/migração/proliferação endotelial. Então *in vivo*, a função angiostática da anastelina estaria relacionada a sua capacidade de reconhecer a FN intacta dos vasos (*homing*) [Akerman *et al.*, 2005].

Aguzzi e colaboradores (2004) demonstraram que o peptídeo RGD solúvel é endocitado pelas células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) *in vitro* ligando-se diretamente as caspases-8 e -9 e inibindo quimiotaxia induzida por FGF-2, levando à apoptose endotelial. O RGD ainda impediria a adesão de linfócitos ativados às HUVECs *in vitro* (Pozzetto *et al.*, 2005)

Laminina (LN)

A LN é uma glicoproteína matricial de alto peso molecular (800 kDa) composta por três cadeias diferentes (α , β e γ) unidas por ponte dissulfeto e dispostas em forma de cruz (Ljubimova *et al.*, 2006). Foram descobertas até o momento, cinco cadeias α , três β e três γ e que podem se associar em pelo menos 15 isoformas da LN (Ljubimova *et al.*, 2006). O sistema de identificação atual da laminina usa números arábicos (ex.: lamina-10) ou os tipos de cadeias que a compõem (ex.: $\alpha5\beta1\gamma1$). Recentemente, uma nova nomenclatura para a laminina foi posposta, onde a mesma isoforma seria chamada apenas de 511, cada número correspondendo a uma cadeia e sem a necessidade de memorizar a ordem desta composição (Aumailley *et al.*, 2005).

As LNs são glicoproteínas com alta atividade biológica e foram descritas promovendo a adesão celular, migração, proliferação, crescimento tumoral, angiogênese e metástase. Existem mais de 20 receptores membranares descritos para LN, dentre eles destacam-se as integrinas, proteína de 32/67 kDa, proteoglicanos, sulfatídeos, gangliosídeos, proteína precursora amilóide, lectinas, galactosiltransferases (Engbring & Kleinman, 2003).

A rede molecular da LN diretamente em contato com a superfície celular consiste de LN polimerizada, que se auto-organiza independente da presença de outros elementos da membrana basal (Yurchenco *et al.*, 1992). Entretanto, tem-se observado que a organização, a “arquitetura” de LN sofre

variações em função de astrócitos de regiões distintas do sistema nervoso. Alguns destes arranjos (pontual ou fibroso, por exemplo) parecem ser importantes para assegurarem certas funções da glicoproteína (Garcia *et al.*, 1995). De todo modo, no cérebro de rato em desenvolvimento, *in vivo*, a distribuição de LN com arranjos variados de seus polímeros parece ser um fato incontestável (Zhou, 1990).

Embora a LN pareça requerer uma concentração mínima de 60 nM para se organizar (Yurchenco *et al.*, 1985), é possível, *in vitro*, organizar polímeros a partir de concentrações menores, desde que se faça a agregação em condições de pH ácido (Freire & Coelho-Sampaio, 2000). De fato, pode ocorrer polimerização de laminina em condições de pH neutro ou ácido, mas os polímeros têm arranjos estruturais diferentes, e as matrizes ácidas podem melhor favorecer neuritogênese e neuroplasticidade (Freire *et al.*, 2002, 2004).

No SNC, as isoformas de LN na membrana basal dos capilares mudam de acordo com a presença de células tumorais e com o grau de malignidade da neoplasia. No cérebro normal, predomina a isoforma da LN-9 ($\alpha4\beta2\gamma1$) e pouquíssima quantidade de LN-8 ($\alpha4\beta1\gamma1$). Em astrocitomas grau II (WHO), já há maior quantidade de LN-8 e ainda de LN-9. Em glioblastomas, a predominância é de LN-8, que parece estar envolvida na angiogênese, na migração celular durante o desenvolvimento e no reparo de lesões. (Ljubimova *et al.*, 2006).

Vale ressaltar que as células endoteliais somente apresentam alta expressão de LN-8 em suas membranas basais durante o desenvolvimento embrionário e substituem-na no tecido adulto pela LN 10 - $\alpha5\beta1\gamma1$ (Davis & Senger, 2005). A adesão à LN, fibronectina, vitronectina e colágeno tipo IV é bastante variável entre as linhagens de glioma. Contudo a LN parece ser o substrato mais favorável à adesão e migração celular (Giese *et al.*, 1994).

Células tumorais capazes de aderir à LN são mais tumorigênicas em relação àquelas que aderem à fibronectina (Engbring & Kleinman, 2003). O aumento do fenótipo maligno pela LN está em sua capacidade de induzir a secreção de proteases permitindo que as células tumorais se aproximem dos vasos sanguíneos. Contudo, as células tumorais nem sempre atravessam a parede endotelial perdendo-se na corrente sanguínea. As células dos gliomas, por exemplo, migram ao longo da parede externa dos vasos sanguíneos. A cadeia $\beta2$ da LN é encontrada na interface das células tumorais e células endoteliais sugerindo seu envolvimento neste processo migratório (Engbring & Kleinman, 2003).

Glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos

Os GAGs são polímeros formados de repetições dissacarídicas e dentre eles, o componente mais abundante da MEC cerebral é o ácido hialurônico. Pode se ligar a vários proteoglicanos (GAGs ligados a um *core* protéico), como condroitin sulfatos, heparano sulfatos, queratino sulfatos e dermatano sulfatos (Bellail *et al.*, 2004). Nos gliomas, o ácido hialurônico está cerca de quatro vezes aumentado comparável a níveis encontrados durante o desenvolvimento. Através de seus receptores CD44 e RHAMM parece facilitar a invasão tumoral *in vivo* e a migração tumoral *in vitro*. Entretanto, como não está presente na membrana basal dos vasos sanguíneos não deve ser o responsável pela migração do glioma ao longo dos mesmos (Bellail *et al.*, 2004).

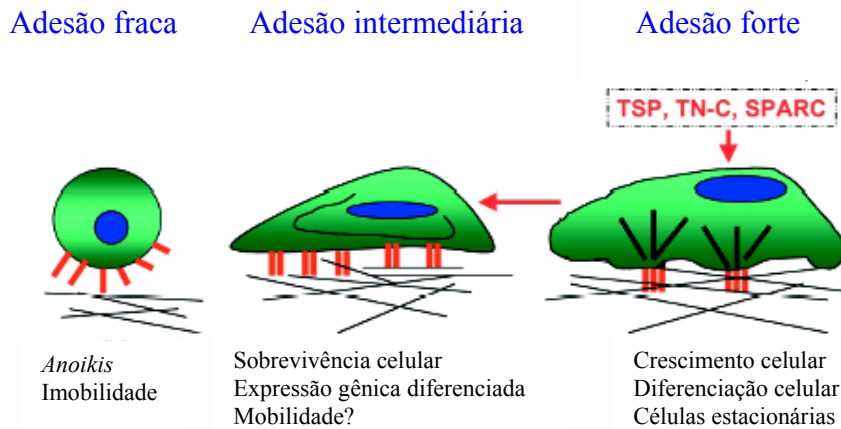
Os proteoglicanos podem regular a ação de fatores de crescimento ligando-se a eles, como é o caso dos queratino-sulfatos que ligam bFGF (fator básico de crescimento de fibroblasto) (Trentin *et al.*, 2001) ou o proteoglicano decorina que se liga ao TGF β (fator de crescimento transformante β). Vários proteoglicanos possuem domínios de repetições tipo-EGF, como versican, BEHAB, agrecan, neurocan (como também as glicoproteínas LN, tenascina C e trombospondina) e tais domínios parecem colaborar com a migração tumoral (Bellail *et al.*, 2004).

BEHAB é um proteoglicano condroitin sulfato da família dos lecticanos e só é expresso no SNC durante o desenvolvimento cerebral ou nas neoplasias nervosas, como na progressão de um glioma. Evidências sugerem sua contribuição na migração tumoral, embora pouco se saiba sobre essa molécula (Bellail *et al.*, 2004).

Os sindecans são proteoglicanos heparano sulfatos e agem como co-receptores de glicoproteínas de MEC em gliomas. O sindecan-1 é expresso em gliomas e foi descrito como provável receptor para a trombospondina-1 (TSP-1) em gliomas malignos (Naganuma *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2006). O sindecan-2 é expresso nos vasos de gliomas *in vivo* e parece estar envolvido na modulação da angiogênese *in vitro* (Fears *et al.*, 2006). O sindecan-4 age como co-receptor para FN em gliomas, ajudando a formação e estabelecimento de contatos focais. Entretanto, a tenascina (TN) pode competir com a FN pelo sindecan-4 desestabilizando os contatos focais (Huang *et al.*, 2001).

Proteínas Matricelulares

Recentemente, foi sugerido que as trombospondina-1 e -2, SPARC (osteonectina; BM40) e a tenascina, formem um grupo de proteínas denominadas matricelulares, caracterizadas por serem capazes de induzir nas células um estado de adesão intermediário, no qual elas estariam mais aptas a migrar e proliferar e se diferenciarem (Murphy-Ullrich, 2001) – Esquema 2.



Esquema 2. Estágios de adesão e indução do *estado de adesão intermediário* por proteínas matricelulares (modificado de Murphy-Ullrich, 2001). Glicoproteínas como a trombospondina-1 (TSP-1), a tenascina-C (TN-C) e SPARC levam à desorganização das fibras de estresse a adesões focais que medeiam adesões fortes. O significado de cada tipo de adesão no comportamento celular está indicado abaixo das células. A adesão fraca é consistente com células em apoptose durante o remodelamento ou em citocinese; a adesão intermediária incluiria células envolvidas no reparo de lesões ou no remodelamento tecidual da morfogênese; a adesão forte seria característica de células quiescentes e diferenciadas.

Trombospondina-1 (TSP-1):

A TSP-1 é uma glicoproteína que se incorpora à matriz extracelular de muitas células de mamíferos e que modula a adesão, migração, proliferação e diferenciação endotelial (revisto por Lawler, 2002). Possui aproximadamente 450 KDa, é composta por 3 cadeias polipeptídicas idênticas, unidas entre si por pontes dissulfeto. Cada uma dessas cadeias possui um domínio globular N-terminal, seqüências repetitivas tipo I, II e III e um domínio globular C-terminal. Estes domínios são reconhecidos por múltiplos receptores. A TSP-1 é na verdade um dos membros da família das trombospondinas, composta atualmente por cinco membros (Lawler, 2000 e 2002).

No SNC, neurônios, astrócitos, microglia e astrocitomas expressam a TSP-1 e incorporam-na à MEC. Seu papel na tumorigênese ainda é bastante controverso na literatura (Qian & Tuszynski, 1997). Serve de substrato adesivo para células endoteliais e células de astrocitomas, entretanto, é conhecida por não permitir espalhamento de células normais (Bellail *et al.*, 2004).

A TSP-1 vem sendo descrita como um modulador da angiogênese, com reconhecida habilidade em inibir a proliferação endotelial (revisto por Lawler, 2002 e por Armstrong & Bornstein, 2003). As regiões consideradas responsáveis por esse efeito são o domínio de homologia ao procolágeno e as repetições do tipo I (Tolsma *et al.*, 1993). De acordo com os trabalhos de Guo *et al.* (1997) e Jimenez *et al.* (2000), a inibição da angiogênese pela TSP-1 ocorreria devido à inibição da migração endotelial e indução da apoptose dos vasos. A sequência de aminoácidos CSVTCG contida neste domínio se ligaria ao receptor endotelial CD36 nos capilares, levando à ativação em sequência da tirosina-quinase p59^{lck}, proteases tipo-caspases 3, MAP quinase p38 (proteína ativada por mitógenos) e, conseqüentemente, à apoptose endotelial (revisto por De Fraipont, *et al.*, 2001). Contudo, o efeito angiostático da TSP-1 é bastante controverso na literatura. Macrófagos ativados e potencialmente indutores de angiogênese em modelos de córnea de rato secretam cerca de seis vezes mais TSP-1 em comparação aos macrófagos não-ativados e não-angiogênicos (DiPietro & Polverini, 1993). Efeitos indutores da angiogênese também já foram atribuídos à TSP-1 em outros trabalhos (Qian *et al.*, 1997; Chandrasekaran *et al.*, 2000; Taraboletti *et al.*, 2000; Ferrari do Outeiro-Bernstein *et al.*, 2002).

No caso dos gliomas, existem dados que sugerem que a expressão de TSP-1 regule tanto o crescimento das próprias células tumorais quanto o grau de vascularização desses tumores (Bogdanov *et al.*, 1999). Hsu e colaboradores (1996) demonstraram que genes supressores de tumores presentes no cromossoma 10 aumentam a expressão de TSP-1 nas linhagens de glioblastomas humanos LG11, U87 e U251 e diminuem a angiogênese induzida por eles. No entanto, a relação entre a expressão de TSP-1 e atividades endoteliais (adesão celular, migração, expressão de proteases, manutenção da viabilidade) relevante para o desenvolvimento do fenótipo angiogênico não se encontra suficientemente explorada, no contexto dos gliomas.

Embora a trombospondina-1 (TSP-1) intacta seja considerada por alguns autores (Tolsma *et al.*, 1993; Guo *et al.*, 1997; Jimenez *et al.*, 2000; Lawler, 2002; Armstrong & Bornstein, 2003) como uma glicoproteína de matriz inibidora da angiogênese, conforme já comentado acima, Taraboletti e colegas

(2000) descreveram o efeito pró-angiogênico de um fragmento de 25 KDa gerado a partir da extremidade N-terminal da TSP-1 e o conseqüente aumento de MMP-2 latente e ativada. Chandrasekaran e colegas (2000) demonstraram outro efeito pró-angiogênico para a seqüência de aminoácidos 190-201 da porção N-terminal da TSP-1 envolvendo a integrina $\alpha_3\beta_1$. A porção N-terminal também já foi caracterizada pelo nosso grupo como potencialmente angiogênica, através do seu reconhecimento pelo proteoglicano de superfície sindecan-4 (Ferrari do Outeiro-Bernestein *et al.*, 2002). Esta região da TSP-1 é a única liberada naturalmente por inúmeras proteases de relevância fisiológica (plasmina, trombina, tripsina, elastase, quimotripsina, etc).

Logo no início da angiogênese a membrana basal é degradada a fim de liberar espaço para a proliferação/migração/diferenciação endotelial (Davis & Senger, 2005). A clivagem enzimática da membrana basal não tem apenas um papel físico, mas libera moléculas ativas e fragmentos de proteínas matriciais capazes de agir diretamente sobre as células tumorais e células endoteliais, induzindo tanto crescimento e espalhamento tumoral quanto angiogênese. Fragmentos gerados por proteólise são encontrados constantemente na matriz extracelular e podem inibir ou induzir a angiogênese e o crescimento tumoral (Davis & Senger, 2005).

SPARC-Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine:

SPARC tem seus níveis aumentados em astrocitomas, o que parece retardar o crescimento tumoral, porém aumenta a migração/invasão. A SPARC bloqueia a ação proliferativa de VEGF e bFGF nas células endoteliais (Bellail *et al.*, 2004). Poderia ser melhor estudada a fim de saber as chances de ser usada como uma futura ferramenta anti-câncer.

Tenascina (TN):

Existem quatro tipos de TN: TN-R, TN-X, TN-W e TN-C. 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 tipo-fibrinogênio (Hsia & Schwarzbauer, 2005).

A TN-R possui de duas a três cadeias polipeptídicas com 160-180 KDa cada e possui alta homologia com a TN-C que é exclusiva do sistema nervoso central, entretanto, aparece em etapas mais tardias do desenvolvimento (Hsia & Schwarzbauer, 2005). Foi sugerido um papel na comunicação neuronal (extra-sináptica) e também entre células gliais, embora não se saiba ainda o mecanismo como isso aconteceria.

A TN-X é o maior membro da família apresentando mais de 400 KDa, capaz de formar apenas trímeros. É a única isoforma cuja deficiência foi associada à patologia, a Síndrome de Ehler-Danlos (doença associada a anomalias estruturais de colágenos ou deficiência de colagenases) e hiperplasia adrenal (Hsia & Schwarzbauer, 2005).

A TN-W é o membro da família menos caracterizado até hoje. A maior parte da descrição na literatura foi feita em *zebrafish*, entretanto foram identificados possíveis ortólogos em mamíferos. É expressa durante o desenvolvimento esquelético e da crista neural (Hsia & Schwarzbauer, 2005).

A TN-C é regulada positivamente em gliomas malignos, sendo expressa predominantemente ao redor dos vasos recém formados (revisto por Wang et al, 2005). Consiste em seis subunidades associadas covalentemente pelas suas porções amino-terminais ligadas por pontes dissulfeto (Esquema 3). Cada hexâmero tem cerca de 200 KDa, aproximadamente, dependendo da quantidade de glicosilações. Diversas 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 e componentes matriciais como FN, heparina e colágeno são exemplos de ligantes para a TN-C. Podem existir variações desta isoforma graças ao *splicing* alternativo da região de domínios tipo III da fibronectina em até 27 variantes de RNAs mensageiros (RNAm) (Hsia & Schwarzbauer, 2005, Orend & Chiquet-Ehrismann, 2006). Esta glicoproteína é expressa durante o desenvolvimento dos sistemas nervoso, ósseo e vascular. No tecido adulto desaparece restringindo-se somente a tecidos associados a tendões. Entretanto, volta a ser expressa nos tecidos em remodelamento como nos reparos de injúria, neovascularização ou em processos patológicos como inflamação e tumorigênese (Hsia & Schwarzbauer, 2005).

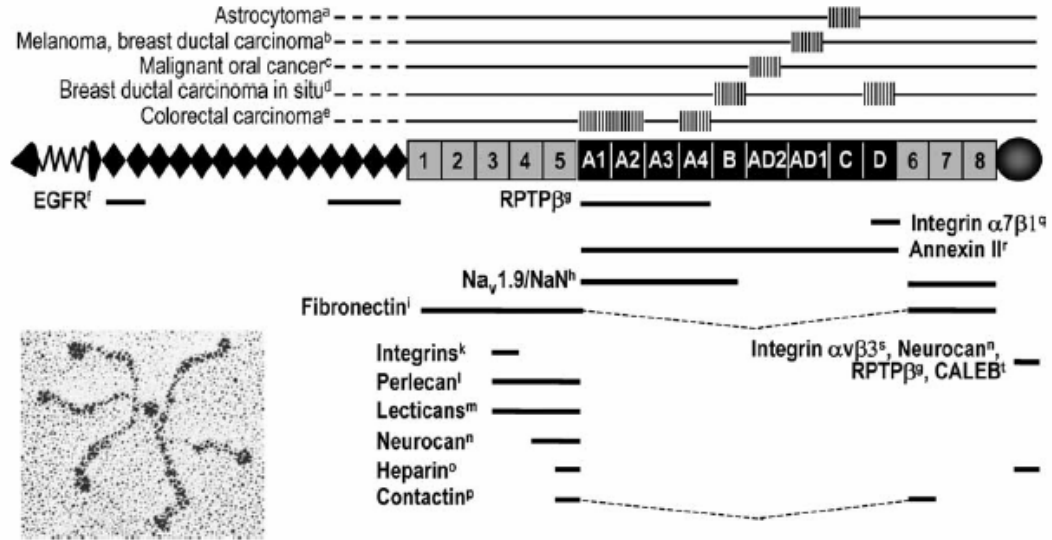
A TN-C é conhecida como uma proteína matricelular com propriedades anti-adesivas (juntamente com trombospondinas -1 e -2 e SPARC), conforme revisto por Murphy-Ullrich (2001). As proteínas matricelulares estimulam a reorganização das fibras de estresse de actina e desaparecimento dos complexos de contatos focais, sem alteração do formato celular. A interação celular com a matriz

regula não somente a morfologia das células, mas também a sua habilidade em proliferar, migrar e de se diferenciar. Como a TN-C promove a adesão e sabe-se que uma forte adesão celular inibe a migração, sugere-se que a TN-C tenha um forte papel na indução de angiogênese bem como na migração das células tumorais no processo invasivo dos gliomas malignos.

É importante salientar que a TN-C não é muito expressa no tecido nervoso adulto normal, é ausente em células endoteliais quiescentes, mas tem baixos níveis em astrocitomas de baixo grau e alta expressão em gliomas malignos (Wang *et al.*, 2005). Sua expressão aumenta proporcionalmente ao grau de malignidade tumoral (Zagzag *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2000; Bellail *et al.*, 2004). Sua localização preferencial é ao redor dos vasos sanguíneos em proliferação. Nos gliomas sua expressão normalmente está inversa à fibronectina (Bellail *et al.*, 2004). Parece haver uma correlação direta entre expressão de TN-C e a malignidade, agressividade, invasão, crescimento, vascularização tumoral e conseqüentemente, baixo prognóstico para o paciente (Leins *et al.*, 2003).

Apesar da literatura sugerir que a expressão de TN-C esteja fortemente relacionada à malignidade e neovascularização em gliomas, análises imunohistológicas revelam grande heterogeneidade na sua expressão em amostras de GBM de diferentes pacientes. Apesar da variação na expressão de TN-C, esta era sempre maior em astrocitomas de graus maiores (Kim *et al.*, 2000). Rascher e colaboradores (2002) em uma análise imunohistoquímica de 9 GBMs humanos mostraram que apenas três apresentaram forte marcação para TN-C, dois apresentaram marcação média e cinco GBMs não apresentaram detecção. Entretanto, de cinco vasos de GBMs analisados, três deles apresentaram marcação (Rascher *et al.*, 2002). O interessante nesta análise foi que a expressão de TN-C nos vasos era contrária à do proteoglicano contendo heparan sulfatos, agrina. A agrina estaria por sua vez relacionada à indução de diferenciação e maturação das barreiras vasculares (Kroger & Schroder, 2002). Assim, como na neoplasia, no desenvolvimento embrionário, a TN-C é expressa nos primeiros momentos do desenvolvimento e posteriormente, aparece a agrina (Kroger & Schroder, 2002).

A expressão perivascular de TN-C em vasos de gliomas também foi demonstrado por outros trabalhos. De 62 GBMs humanos diferentes, 56 apresentaram expressão de TN-C perivascular de moderada a forte, ao passo que apenas 6 apresentaram expressão fraca. A expressão de TN-C ainda se correlacionava a um aumento diretamente proporcional de VEGF (Behrem *et al.*, 2005).



Esquema 3. Domínios estruturais da TN-C e sua expressão em diferentes tipos de tumores. As seis cadeias se unem pela região N-terminal por pontes dissulfeto formando um hexâmero (triângulo); 14,5 repetições da região EGF-like (losângulo); 8 repetições tipo III da fibronectina constantes e mais de 9 originadas por *splicing* (A1-D); região fibrinogênio-like (círculo). À esquerda, vemos uma imagem de microscopia eletrônica do hexâmero. As repetições detectadas em tipos específicos de câncer estão indicadas acima do modelo esquemático. (retirado de Orend & Chiquet-Ehrismann, 2006).

A adesão celular à fibronectina (FN) leva ao agrupamento (*cluster*) de integrinas e sindecan-4 na membrana e à formação de um estado de adesão forte (adesões focais) inibindo a migração e por isso, suprimindo a tumorigênese (Ruoslahti, 1999). A TN-C foi descrita antagonizando este efeito adesivo da FN, inibindo o sindecan-4 na superfície membranar o que resulta na desestabilização de contatos focais e desarranjo das fibras de estresse, *in vitro* (Huang *et al.*, 2001), em células humanas de carcinoma de mama e de glioma humano. A interferência da TN-C induziu a proliferação celular e isso indica um papel na tumorigênese. Ademais, a TN-C não só compromete a adesão celular à FN mas também impede a sua polimerização (Orend, 2005).

A atividade supressora de tumor da FN seria ancorar a célula ao substrato prendendo-a na fase G0/G1 do ciclo celular dando tempo à célula de reparar possíveis danos ao DNA ou de executar a apoptose. Contrariamente, diversas moléculas associadas à estabilidade genética estão diminuídas na

presença da TN-C. A TN-C teria um efeito negativo na integridade genômica. Este efeito da TN-C na tumorigênese é observado uma vez que o tumor está estabelecido. Não se conhece o papel da TN-C nos estágios bem iniciais da doença. Teria a TN-C uma função oncogênica? (Orend, 2005).

1.2 - As células endoteliais

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

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

1.2.1 - Origem embrionária da célula endotelial

Durante o desenvolvimento embrionário de mamíferos, o aparecimento simultâneo e co-localizado das células endoteliais e células sanguíneas sugere que tais células tenham um progenitor em comum: o hemangioblasto, de origem mesodérmica. Células endoteliais e células hematopoiéticas em desenvolvimento são identificadas em ilhotas de sangue no saco vitelínico extraembrionário (Choi K., 1998). As ilhotas sanguíneas consistem em células eritrocíticas circundadas por células endoteliais. O sangue “jovem” e as células precursoras endoteliais compartilham um mesmo padrão de expressão gênica: CD34 (marcador endotelial e hematopoiético), e os fatores transcricionais GATA-1 e -2, LMO-2, SCL (Mead *et al.*, 2001; Wang, 2006) e os receptores tipo tirosina-quinase: VEGFR-2 (Flk-1), Tie-1, Tie-2 (Yano *et al.*, 1997; Arai *et al.*, 2005).

Os hemangioblastos podem dar origem aos angioblastos que são as células precursoras endoteliais do embrião. Os angioblastos são conhecidos por serem potencialmente capazes de se diferenciar em células endoteliais, apesar de não terem adquirido todos os marcadores endoteliais (Tabela 2). A ativação do receptor tipo tirosina-quinase Flk-1 nos angioblastos parece determinar o comprometimento para a diferenciação endotelial (Bertolini *et al.*, 2006).

Outros fatores do microambiente local tais como secreção de fatores solúveis, adesão célula-célula, e síntese e organização da MEC podem também servir como determinantes na diferenciação do angioblasto em célula endotelial (Asahara & Kawamoto, 2004).

A formação do plexo vascular a partir dos angioblastos que originará os primeiros vasos sanguíneos do embrião em desenvolvimento chama-se *vasculogênese*.

1.2.2 - O Endotélio cerebral

As células endoteliais constituem, num mesmo organismo, uma população muito heterogênea. A morfologia dos vasos (pequenos e de grandes calibres) varia de acordo com a função do órgão. Assim, temos vasos contínuos, fenestrados e descontínuos (Risau, 1995).

Endotélios contínuos são característicos do cérebro e retina onde as células estão conectadas por junções oclusivas e possuem papel de barreira. Os vasos descontínuos/sinusóides como na medula óssea atuam na hematopoiese e liberação de células sanguíneas. Os intestinos, rins e glândulas possuem vasos fenestrados que facilitam a permeabilidade seletiva e absorção, secreção e filtração de moléculas (Risau, 1995).

A diferença das células endoteliais não está apenas na morfologia dos vasos sanguíneos. As células expressam diferentes marcadores de superfície, transportadores e sistema enzimático de acordo com o tecido em que se localizam (Abbot, 2002). No SNC, os microcapilares cerebrais são ~50 a 100 vezes mais compactos em relação aos microvasos periféricos, resultado da presença de complexas junções oclusivas (*tight junctions*) entre as células endoteliais. Pequenas moléculas lipofílicas como oxigênio, CO₂ e etanol atravessam livremente a bicamada lipídica. Pequenos solutos polares necessários à função cerebral são transportados por carreadores específicos (ex: GLUT-1 para a glicose, sistema carreador L1 para aminoácidos grandes e neutros como a leucina) e outros carreadores

irão mediar o efluxo de metabólitos potencialmente tóxicos (ex: glutamato) do SNC. A glicoproteína-P, produto do gene de multiresistência a droga *mdr-1*, é um carreador de efluxo dependente de energia com um largo espectro de especificidade para moléculas hidrofóbicas. Sistemas específicos para endocitose mediada por receptor ou endocitose adsortiva para transportar certos peptídeos e lipoproteínas para o cérebro, sistemas enzimáticos protetores e desintoxicantes também fazem parte da barreira hematoencefálica (Abbot, 2002).

Em contato com a parede externa dos vasos cerebrais estão os astrócitos que estendem prolongamentos conhecidos como **pés vasculares** (Esquema 4) formando uma fina camada em rede que envolve o microcapilar cerebral (revisto por Abbot, 2002). Os astrócitos estão localizados no SNC, entre os neurônios e os vasos sanguíneos mediando a comunicação neuro-vascular.

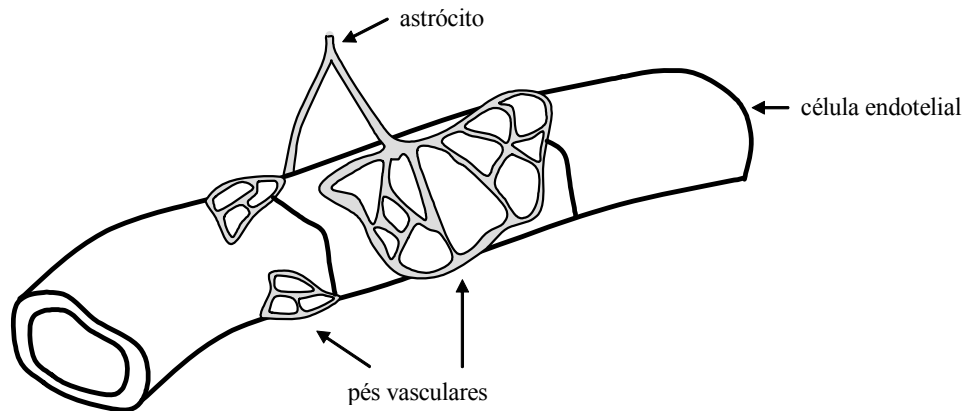
A barreira hematoencefálica é formada por células endoteliais, astrócitos, pericitos (células estromais e perivasculares envolvidas na maturação e estabilização dos vasos sanguíneos), microglia perivascular e membrana basal (Bart *et al.*, 2000; Mercier, 2004), e tem como importante papel a regulação homeostática do microambiente cerebral. Sua ruptura em patologias vem frequentemente acompanhada de extensa neovascularização e talvez injúria glial, indicada por proliferação e excessiva expressão de GFAP (Behzadian *et al.*, 1995). Entretanto, não está ainda muito claro se a perda da permeabilidade e excesso de neovascularização são as causas ou as conseqüências da disfunção glial.

O endotélio cerebral é formado a partir da migração de células endoteliais precursoras externas ao cérebro. Assim, o microambiente cerebral seria o responsável por induzir a diferenciação das células endoteliais invasivas em células com características de barreira hematoencefálica (Risau, 1995). O contato íntimo entre os astrócitos e o endotélio levou à hipótese de que seria a glia a responsável pelo desenvolvimento deste fenótipo especializado do endotélio cerebral.

Células endoteliais de cérebro são conhecidas por perderem suas especializações, como junções oclusivas e impermeabilidade macromolecular, quando em cultura. O contato físico (e não o meio condicionado) de astrócitos e células endoteliais não-nervosas (HUVECs: células endoteliais de veia umbilical humana) em co-cultura parece induzir a expressão de

Tabela 2. Marcadores endoteliais (atualizado por Bertolini *et al.*, 2006). * sub-

Marcadores de superfície	Célula endotelial progenitora	Célula endotelial madura
VEGFR-2 (flk-1)	+++	+++
VEGFR-3 (flt-4) Subunidade α_v	+++*	+++*
VEGFR-1 (flt-1)	-	+++
Tie-1	+++	+++
Tie-2	+++	+++
VE-caderina (CD144)	+++	+++
CD34	+++	+
Captação Ac LDL	+++	+++
PECAM (CD31)	+++	+++
CD133	+++	-
FvW	+++	+++
CD105	+++	+++
CD 36	?	+
PIH12 (CD 146)	+++	+++
Trombomodulina	?	+++
E-selectina	?	?
Corpos Weidel-Palade	+++	+++
Thy-1	+++	+++



Esquema 4. Desenho esquemático mostrando as características do contato astrócito-endotélio, os pés vasculares (adaptado de Abbott, 2002).

marcadores específicos de barreira hematoencefálica (Hayashi *et al.*, 1997). As HUVECs exibiram alta atividade de γ -GTP, presença das junções oclusivas, aumento do número de mitocôndrias e impermeabilidade. A revisão feita por Abbott (2002) afirma que ainda, células astrocíticas e células de gliomas também podem induzir o mesmo efeito de barreira hematoencefálica em células endoteliais. Outros autores entretanto, observaram efeito indutor de especialização em barreira hematoencefálica com meio condicionado de astrócitos no número de junções oclusivas, na função de barreira, resistência elétrica transendotelial e decréscimo na permeabilidade a macromoléculas (Wolburg *et al.*, 1994).

Dados contraditórios obtidos por Ramsauer e colegas (2002) demonstraram que somente o contato com astrócitos não seria suficiente para a diferenciação endotelial em barreira hematoencefálica e que a presença de pericitos seria indispensável. Em uma cultura tripla de astrócitos, células endoteliais e pericitos há indução de formação de estruturas tipo-capilares pelas células endoteliais e ainda, características de barreira hematoencefálica. A apoptose endotelial observada na co-cultura com astrócitos foi significativamente diminuída quando eram adicionados pericitos. Meios condicionados

provenientes de cultura homólogas de astrócitos ou de co-culturas endotélio-astrócito não tiveram sucesso na indução de qualquer alteração morfológica e/ou funcional nas células endoteliais.

Mi e colaboradores (2001) sugeriram interações astrócito-endotélio que progressivamente geram a barreira hematoencefálica madura. No nervo óptico, células precursoras de astrócitos (APCs) são o tipo celular primário e isto naturalmente sugere que sejam elas as indutoras do desenvolvimento endotelial, talvez através da secreção de VEGF, fortemente envolvido na vasculogênese. Assim, as APCs expressariam VEGF, que por sua vez, guiaria o processo de vasculogênese e proliferação endotelial. As células endoteliais guiariam, neste momento, a diferenciação das APCs em astrócitos diferenciados. Finalmente, estes últimos induziriam o desenvolvimento da barreira hematoencefálica e incorporação de pericitos.

Em relação à manutenção da barreira hematoencefálica, Willis e colaboradores (2004) propuseram um modelo *in vivo* em que a perda primária focal de astrócitos é seguida de dano microvascular. Porém, o reparo acontece seis dias depois, sugerindo que a microvasculatura pode sofrer um auto-reparo mesmo numa aparente ausência de contato entre astrócitos e células endoteliais. Contudo, a relação dos astrócitos com a integridade da barreira hematoencefálica ainda precisa de esclarecimentos.

Aparentemente a diferenciação/manutenção da barreira hematoencefálica depende de uma contínua troca entre glia e endotélio, e algum distúrbio nesse equilíbrio poderia resultar em comprometimento importante na função da barreira hematoencefálica. No entanto, há ainda muita controvérsia nos resultados descritos em relação à indução astrocitária na diferenciação endotelial. Modelos de co-cultura com células vindas de espécies diferentes, ou o uso de astrócitos de diferentes regiões do cérebro (córtex, subcórtex, cerebelo), e de idades gestacionais diferentes podem talvez explicar os resultados controversos na literatura.

Em tumores cerebrais primários ou metastáticos, a barreira hematoencefálica está muito alterada genotípica e fenotipicamente, o que compromete a sua função. Charalambous e colaboradores (2006) fizeram uma revisão apontando as diferenças entre o endotélio cerebral normal e o endotélio do glioblastoma multiforme. O cultivo *in vitro* de células endoteliais derivadas de tumor permite distingui-las morfológicamente de células endoteliais normais: células grandes com aparência plana, núcleo grande, múltiplos nucléolos. Contudo, a diferença do endotélio tumoral em gliomas para o endotélio

cerebral normal não é somente morfológica. Células endoteliais tumorais expressam os mesmos marcadores endoteliais que as células endoteliais normais como Fator von Willebrand, CD105, CD31 e VE-caderina. Embora, a expressão de VE-caderina seja menor nas células endoteliais tumorais. Como a VE-caderina está envolvida na formação de junções homotípicas célula-célula, é provável que a sua diminuição explique parte da falta de “vedação” dos vasos tumorais. O bloqueio de VE-caderina parece acarretar em estruturas tubulares aberrantes *in vitro*. As proteínas citoplasmáticas claudina-1, claudina-5 e eventualmente, ocludina, estão envolvidas na formação das junções oclusivas e estão descritas como desaparecidas nos vasos de glioblastomas (Rascher, *et al.*, 2002) podendo também contribuir para o aumento da permeabilidade vascular tumoral.

As células endoteliais tumorais podem expressar ainda a proteína de citoesqueleto α -SMA (*alfa-smooth muscle actin*), envolvida na migração celular pericitos e células de músculo liso. Aparentemente, células endoteliais tumorais têm alta capacidade migratória e proliferativa em comparação às células normais. Além disso, são mais resistentes à apoptose induzida pela ausência de soro fetal bovino em cultura, são altamente angiogênicas *in vitro* e secretam altas quantidades de fatores de crescimento, como VEGF (e dos receptores flt-1 e flk-1) e IL-8 (Charalambous *et al.*, 2006; Bian *et al.*, 2006).

1.3 - Mecanismos de formação de vasos sanguíneos:

1.3.1 - Angiogênese

Dá-se o nome de angiogênese à formação de novos vasos (neovascularização) a partir de outros que já existem no tecido. Processos angiogênicos intensos e persistentes estão frequentemente associados ao crescimento tumoral. Este fato foi sugerido pela primeira vez por Judah Folkman e colaboradores (1971), que previu que o bloqueio do fornecimento de sangue a tumores sólidos poderia causar a destruição dos mesmos. A veracidade desta hipótese foi confirmada mais tarde por Folkman, à frente de seu grupo no *Children's Hospital*, Boston (O'Reilly *et al.*, 1994 e 1997; Parangi *et al.*, 1997).

Os tumores malignos em geral secretam fatores angiogênicos, como fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento de

endotélio vascular (VEGF, também conhecido por fator de permeabilidade vascular, VPF) (revisto por Plate e Risau, 1995; Miyagami & Katayama, 2005). O VEGF é uma glicoproteína dimérica com homologia estrutural ao PDGF. Estudos recentes indicaram que o VEGF tem um papel crítico na proliferação endotelial em gliomas malignos, apesar de ser encontrado em níveis detectáveis em gliomas astrocíticos de todos os graus histopatológicos (I-IV) (Miyagami & Katayama, 2005). Dentre os componentes da família dos VEGF, o VEGF-A é o maior regulador da angiogênese e se liga e ativa dois receptores tipo tirosina-quinase: VEGFR1 (flt-1) e VEGFR2 (flk-1).

O VEGFR2 tem alta atividade de tirosina-quinásica e transduz a maior parte da sinalização angiogênica fisiológica ou tumoral. Porém, o VEGFR1 tem efeitos contrários: inibe a angiogênese no embrião ao fixar o VEGF-A, ligando-se a ele em sua forma solúvel e efeito positivo no adulto no crescimento tumoral, metástase e inflamação. Apesar do seu mecanismo de ação não ser ainda bem compreendido, estudos com animais *knock out* para VEGFR1 mostram que este receptor é importante para a correta formação dos vasos, visto que nesses animais formam-se estruturas anômalas com excesso de células endoteliais na luz dos vasos. Assim, o VEGFR-1 parece ser um “decoy receptor”, de baixíssima capacidade de transdução, que captaria o excesso de VEGF-A livre, para o qual tem mais afinidade do que o VEGFR-2. Esta ação limitaria o processo angiogênico e favoreceria a maturação da angioarquitetura e, portanto, a geração de vasos funcionais. O VEGFR2 em baixos níveis, pode ser visto em neurônios, osteoblastos, células do ducto pancreático, células progenitoras da retina e megacariócitos, mas não se sabe ainda qual papel biológico deste receptor nestas células não-endoteliais. O VEGFR2 é cerca de 3-5 vezes mais expresso no endotélio tumoral em comparação ao do tecido normal. Células tumorais e células do estroma secretariam VEGF-A e as células endoteliais, aumentariam a expressão de VEGFR2 resultando no estímulo da angiogênese tumoral (Shibuya, 2006).

Além das alterações genéticas (tais como perda ou mutação do gene p53 e amplificação do gene para o receptor de EGF) e epigenéticas (aumento de expressão de VEGF pelas células de glioma e dos seus receptores VEGFR1 e VEGFR2 pelas células endoteliais) necessárias para a transformação maligna, um outro passo discreto também é necessário para permitir a progressão tumoral, a indução da vascularização tumoral ou o que chamamos *angiogenic switch* (revisto por Plate e Risau, 1995 e Bergers e Benjamin, 2003). Como acontece em tecidos normais, tumores requerem um suprimento adequado de oxigênio e um modo efetivo de eliminar produtos de excreção. O crescimento tumoral é

dependente de um crescimento vascular prévio. Assim, a angiogênese é orquestrada por uma variedade de ativadores e inibidores que ditarão se a célula endotelial permanecerá quiescente ou em estado angiogênico. Acredita-se, portanto que o *angiogenic switch* é simplesmente mediado por um balanço molecular entre agentes inibidores (trombospondina-1 na forma intacta e de maneira dose-dependente, a angiostatina e a endostatina) e ativadores (VEGF, FGFs, PDGFB, EGF), conforme revisto por Bergers e Benjamin, 2003.

Normalmente, de acordo com a classificação pela WHO ou por Sainte-Anne/Mayo, a aquisição do fenótipo angiogênico é um pré-requisito para a progressão maligna. Contudo, o que se pensava anos atrás era que a angiogênese precedia o crescimento tumoral e isso seria válido para todos os tumores sólidos. Este seria o modelo clássico do *switch angiogênico*, no qual o endotélio dormente seria ativado pela secreção de fatores de crescimento como o VEGF pelas células tumorais em crescimento exponencial. A seguir o endotélio sofreria dilatação e aumento considerado da permeabilidade vascular em resposta ao VEGF. Isso permitiria extravasamento intersticial do plasma sanguíneo conferindo uma matriz extracelular provisória, rica em fibrina, na qual as células endoteliais ativadas migrariam. O processo de vasodilatação é acompanhado de desprendimento dos pericitos extravasculares, pela angiopoietina-2 (Ang-2, que se liga ao receptor Tie-2, seletivamente expresso em células endoteliais). A angiopoietina-2 (Ang-2), um antagonista do fator de sobrevivência e quiescência endotelial angiopoietina-1, é expressa somente pelos vasos circundados pelo tumor e parece ter relação com a indução de apoptose e regressão vascular (Zagzag *et al.*, 2000). A MEC local e a membrana basal vascular são degradadas permitindo a migração quimiotática endotelial em direção ao estímulo angiogênico (as células do tumor). As células endoteliais migram, proliferam, estabelecem polaridade e se alinham em coluna. O lúmen é formado por fusão de vesículas internas e o fluxo sanguíneo estabelecido (Davis & Camarillo, 1996; Kamei *et al.*, 1996). Por fim, células perivasculares são atraídas e uma membrana basal é novamente formada em volta destes novos vasos (Bergers & Benjamin, 2003; Engbring & Kleinman, 2003). A quiescência é um evento tão importante para a formação de vasos funcionais quanto as etapas iniciais da angiogênese, tendo sido descrito que a restauração da integridade da lâmina basal é parte fundamental dos mecanismos que impedem a regressão vascular (Sanger e Davis, 2005).

O “switch” angiogênico dividiria a progressão tumoral em duas fases: avascular e vascular. Assim, a fase avascular permitiria ao tumor ter um diâmetro de até 1-3 mm recebendo nutrientes por difusão (Folkman, 1971). O tumor poderia permanecer dormente durante a fase avascular. A fase vascular seria desencadeada a partir da proliferação exponencial do tumor.

Células endoteliais circulantes: vasculogênese pós-natal

Em humanos adultos normais, é possível encontrar uma população de células endoteliais circulantes (EPCs), no sangue periférico, na proporção de uma EPC para mil célula sanguíneas. Estes níveis são bastante estáveis normalmente, com exceção do período menstrual feminino (associado ao remodelamento vascular uterino) e em algumas patologias como câncer e inflamação, doenças auto-imune e infecções, onde o número de EPCs aumenta (Bertolini *et al.*, 2006). Ensaaios de hibridização *in situ* envolvendo transplante de medula mostraram que dentre todas as células endoteliais encontradas no sangue periférico, cerca de 95% são as EPCs e os 5% restantes, uma sub-população de células progenitoras hematopoiéticas/endoteliais (CPHE) vindas da medula óssea (Bertolini *et al.*, 2006).

As EPCs exibem um fenótipo endotelial maduro, e são derivadas provavelmente do *turnover* da parede dos vasos sanguíneos e têm potencial replicativo limitado (cerca de 20 vezes *in vitro*). As CPHE derivadas da medula óssea exibem um fenótipo tipo-progenitor e têm alto poder replicativo (cerca de mil vezes *in vitro*) e tem capacidade de se incorporarem nos vasos da massa tumoral. Não há diferenças fenotípicas entre EPCs e CPHE e é muito difícil separá-las devido à promiscuidade antigênica acentuada entre células tronco hematopoiéticas, plaquetas, EPCs e CPHE. Por exemplo, o CD146 era considerado um marcador específico endotelial, mas recentemente foi descoberto que células mesenquimais e uma sub-população de linfócitos ativados (geralmente aumentados em pacientes com câncer) também o expressam. O mesmo aconteceu com VE-Caderina, considerado um marcador endotelial específico. Contudo, descobriu-se que células tronco hematopoiéticas em fetos também expressam a VE-caderina (Bertolini *et al.*, 2006). Células tronco hematopoiéticas expressam CD34 (com exceção das células hematopoiéticas maduras) e por isso esse marcador é usado amplamente para identificar células com capacidade de gerar clones ou células-filhas. Entretanto, como EPCs e CPHE, é impossível separá-las. O único antígeno que parece ser expresso somente nas CPHE e não em EPCs é o CD133, entretanto em humanos ele também é expresso em células tronco hematopoiéticas.

Assim, as CPHE estão presentes no sangue numa porcentagem menor em relação às EPCs, porém, têm o potencial clonogênico que as células endoteliais maduras perderam. Estas células endoteliais descobertas recentemente podem fazer parte da parede vascular nos sítios angiogênicos. A formação de vaso sanguíneo no adulto feita com a participação de células precursoras chama-se vasculogênese pós-natal.

Em modelos de isquemia cerebral, vê-se que há intensa neovascularização local com a participação de CPHE nos vasos recém-formados (Hess *et al.*, 2002). É bem provável que a hipóxia gerada seja a responsável pelo recrutamento destas células circulantes (Annabi *et al.*, 2003). Em isquemia ou na massa tumoral necrótica, a hipóxia aumenta a transcrição do RNAm e secreção de VEGF, e este por sua vez, seria usado como alvo pelas CPHE para chegar até o sítio de neovascularização. O uso de anticorpos bloqueadores dos receptores VEGFR1 e VEGFR2 impediu o recrutamento das CPHE medulares e ainda impediu a angiogênese e o crescimento de linfoma em camundongos (Lyden *et al.*, 2001). Em gliomas, também já foi descrito o recrutamento de CPHE no sítio vascular em desenvolvimento (Santarelli *et al.*, 2006).

Há, entretanto, controvérsias na literatura com relação à frequência na participação das CPHE na angiogênese tumoral. Participação de 12 a 50% das CPHE nos vasos tumorais já foram descritas (Santarelli, *et al.*, 2006; Bertolini *et al.*, 2006). O estágio da angiogênese em que elas são necessárias também não está claro. Alguns trabalhos afirmam a necessidade destas células no início da angiogênese tumoral (Lyden *et al.*, 2001) e outros trabalhos afirmam ser nos estágios finais, a necessidade de incorporação destas células nos vasos (Bertolini *et al.*, 2006).

Mimetismo vascular

Um conceito abordado em 1965 e somente revisto nos dias de hoje é o do mimetismo vascular, onde a própria célula tumoral assume o papel de células endoteliais (Munn, 2003). A descoberta de que células tumorais poderiam fazer parte da arquitetura da parede do vaso sanguíneo em contato com o lado luminal abriu novas perspectivas sobre metástases, liberação de drogas e terapia anti-angiogênica. Em modelo de injeção em camundongo de carcinoma de cólon GFP+ (green fluorescent protein) cerca de 15% dos vasos apresentavam áreas de mosaico: a célula tumoral GFP+ no lado luminal ao lado das células tumorais e nenhuma marcação para célula endoteliais (CD31/CD105) no local do mosaico

(Chang *et al.*, 2000). Provavelmente, este mimetismo vascular pode trazer severas conseqüências para as células endoteliais, como perda de adesão e apoptose. Em comentário a esse trabalho, Folkman (2003) argumenta o possível papel de metaloproteases que degradariam a membrana basal, deslocando as células endoteliais e deixando espaço para a ocupação das células tumorais no lúmen. E mais, a presença de células tumorais na neovascularização poderia explicar o porquê de algumas drogas anti-câncer terem efeito anti-vascular. Ainda, se as células tumorais podem se instalar no lado luminal dos vasos, seria razoável se pensar que poderiam também se desprender e cair na circulação sanguínea. Seria possível determinar por análise de sangue do paciente a presença do tumor antes mesmo do seu aparecimento nas técnicas de imagem. Ou, se células endoteliais ou seus corpos apoptóticos são liberados na circulação, seria possível também determinar que há um sítio angiogênico no corpo.

O mimetismo vascular também pode ser demonstrado *in vitro*. Linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon, câncer gástrico, câncer de cérvix, fibrosarcoma e melanoma foram semeadas sobre Matrigel[®] e são capazes de formar estruturas tipo-tubulares, aparentemente idênticas às formadas por células endoteliais microvasculares. Análise ao microscópio confocal confirmaram a formação de lúmen e o bloqueio de laminina impediu a formação de estruturas tubulares pelas células tumorais e endoteliais (Sanz *et al.*, 2003).

1.2.3.1 - Características do Endotélio e da Vascularização em Gliomas

Os gliomas são tumores de incidência local, incapazes de causar metástases em sítios distantes de seus locais de origem (Hochberg e Pruitt, 1980). Entretanto, a massa celular progride localmente de forma rápida na maioria dos gliomas, graças à elevada capacidade migratória apresentada por grande parte das células tumorais, aliada a uma importante proporção de áreas ricamente vascularizadas, responsáveis pela nutrição do tumor (Guérin e Laterra, 1997). A terapia anti-angiogênica poderia ser um método eficaz nestes casos, visto que consiste em atingir e destruir as células endoteliais dos vasos que alimentam a massa tumoral causando a diminuição desta última por necrose (Folkman, 1971) e ainda não induziria resistência às drogas por seletividade (O'Reilly *et al.*, 1996).

A vasculatura do tumor é descrita como aberrante, malformada e anormal. O endotélio que supre o glioma (passaremos a chamá-lo de endotélio/vaso tumoral) é muito diferente do endotélio que

supre o tecido normal (que chamaremos de endotélio normal) –ver Tabela 5. Os gliomas estão entre os tumores mais potencialmente angiogênicos e altamente vascularizados dos tumores humanos e, entretanto, estudos de microcirculação revelaram que apesar da alta vascularização a funcionalidade de seus vasos é baixa (Vajkoczy & Menger, 2004; Munn, 2003).

As variações no endotélio tumoral vão de uma alteração sutil nas junções oclusivas com aumento do espaço intercelular e leve inchaço da lâmina basal até uma aparência muito irregular do endotélio, apresentando muitas fenestrações e aumento no número e tamanho de vacúolos pinocíticos ou lâmina basal completamente irregular (Bart *et al.*, 2000; Munn, 2003). Morfologicamente, os vasos tumorais não são “vedantes” devido a grande *gaps* (de 200 a 2000 μm) entre as células endoteliais adjacentes, o que compromete tragicamente a função de barreira neste endotélio tumoral. A ausência de astrócitos nos tumores cerebrais (gliomas ou metástases cerebrais) seria uma das especulações para explicar a disfunção da barreira hematoencefálica. A concentração de quimioterápicos em tumores primários cerebrais ou metastáticos removidos cirurgicamente é mais alta que no restante do tecido cerebral, porém menor que no tecido muscular, mostrando que a permeabilidade dos vasos tumorais é maior em relação à dos vasos cerebrais normais (Bart *et al.*, 2000). Por outro lado, outros trabalhos dizem que a pressão intersticial na massa tumoral é tão alta quanto à pressão intravascular o que dificultaria a saída das drogas terapêuticas para a massa tumoral, apesar da permeabilidade endotelial ser maior (Munn, 2003).

A distribuição dos vasos pela massa tumoral não é homogênea resultando em áreas ricamente vascularizadas e outras inacessíveis ao endotélio tumoral. Para comprometer ainda mais as tentativas de difusão dos quimioterápicos, o fluxo sanguíneo dentro dos vasos é completamente variável: rápido ou lento, revertido, ausente, e fundo cego em alguns segmentos (Raza *et al.*, 2002; Munn, 2003). A rede vascular tumoral é tortuosa, dilatada e não segue os padrões hierárquicos dos tecidos normais (tornando-se cada vez mais delgados até chegarem a microcapilares). De maneira geral, as células endoteliais, a membrana basal, e o suporte das células murais (pericitos) é anormal.

O ponto crucial que difere a angiogênese “normal” da patológica seria, portanto, a estreita regulação do balanço dos sinais pro- e anti-angiogênicos. Durante a angiogênese fisiológica normal, os novos vasos amadurecem e se tornam estáveis. Tumores, ao contrário, conhecidos por “feridas que nunca cicatrizam”, perderam o balanço apropriado do controle positivo e negativo da angiogênese

(Dvorak, 1986). Os vasos tumorais não se tornam quiescentes, permitindo o constante crescimento e brotamento de novos vasos na massa tumoral. De fato, GBMs são parcialmente definidos e distinguidos de astrocitomas de graus menores, pelo aparecimento de células endoteliais proliferativas e pela alta densidade vascular. A apresentação de regiões edematosas e hemorrágicas seria parcialmente explicada pela super produção de VEGF e pelo baixo recrutamento de pericitos, envolvidos na correta estabilização dos vasos recém formados (Bergers & Benjamin, 2003).

A rede vascular tumoral caótica pode também conter as próprias células tumorais fazendo parte da angioarquitetura, no lado luminal do vaso, num processo chamado de “mimetismo vascular”, pois seriam as células tumorais tomando a função das células endoteliais (veja seção 2.2.3) Este processo descrito recentemente aumenta ainda mais, a heterogeneidade já bastante acentuada dos vasos tumorais. Especula-se que a célula tumoral possa se diferenciar em célula endotelial tumoral, pois compartilhariam as mesmas aberrações genéticas, entretanto pouco se sabe sobre a vascularização tumoral e acredita-se que ela possa surgir a partir de múltiplos processos (Charalambous *et al.*, 2006).

Ainda não sabemos o bastante sobre a relação das células endoteliais com as células de glioblastoma ou com o microambiente tumoral que criam. Contudo, evidências muito interessantes têm aparecido apontando mudanças na expressão gênica de células endoteliais normais em contato com o microambiente cerebral. Injeções intracranianas (IC) e subcutâneas (SC) de células de glioma demonstraram que os marcadores de barreira hematoencefálica GLUT-1 (transportador de glicose tipo-1) e EBA (antígeno de barreira endotelial) são preservados em até 60% quando os tumores crescem intracranialmente. E quase não são detectados (no máximo 4%) quando crescidos subcutaneamente (Arosarena *et al.*, 1994). Uma vez que a atividade mitótica e a densidade vascular, índices histológicos de malignidade, eram similares nos gliomas IC e SC, as diferenças de marcadores de barreira não poderiam ser explicadas por diferenças entre os tumores crescidos em sítios distintos. Assim, este experimento sugere que o microambiente peritumoral cerebral permite que as células endoteliais se diferenciem dentro da massa do glioma. Sugere ainda, que os gliomas mantêm sim a diferenciação em barreira hematoencefálica nas células endoteliais (IC) porém, não são capazes de induzirem a diferenciação das células endoteliais não nervosas em barreira (SC) [Arosarena *et al.*, 1994]. Mais uma vez a importância dos astrócitos no parênquima cerebral peritumoral pode ser considerada na interpretação destes resultados como importante na indução/manutenção da barreira hematoencefálica.

Khodarev e colegas (2003) e Brown e colegas (2004) mostraram que células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) em co-cultura com células de linhagem de glioblastoma U87 são ativadas e aumentam acentuadamente a migração, proliferação e formação tubular. Aumentam também a transcrição gênica de moléculas de adesão, fatores de crescimento e do ciclo celular, conferindo às HUVECs maior resistência à apoptose induzida por radiação ionizante. A proteína citoplasmática tipo tirosina-quinase chamada quinase de adesão focal (FAK) é expressa apenas no endotélio do glioma *in vivo* e estudos *in vitro*, mostraram que promove a formação de estruturas tubulares por células endoteliais cerebrais normais (Haskell *et al.*, 2003).

A aquisição de um fenótipo “angiogênico” está dentre as principais transformações que diferem gliomas de baixo e alto grau (revisto por Plate e Risau, 1995), sendo que a progressão dos astrocitomas de baixo grau e anaplástico para glioblastoma é, por definição, associada às evidências histológicas de proliferação vascular (Daumas-Duport et al, 1988). No entanto, no caso dos gliomas, alguns trabalhos descreveram que sua vascularização não seguiria exatamente o modelo clássico do *switch* angiogênico. Parece que em tumores gliais a angiogênese não decorreria exclusivamente de uma necessidade de expansão da massa tumoral, mas parece estar mais relacionada ao estágio do ciclo de vida tumoral e de seu microambiente. Os astrocitomas adquiririam seu suprimento sanguíneo aderindo ao longo das paredes vasculares existentes, tornando-os curiosamente tumores não-angiogênicos. Portanto, o crescimento e progressão maligna do glioblastoma teria duas fases: uma avascular e outra vascular.

Zagzag e colegas (2000) mostraram que uma semana após injeção de células de glioma em cérebros de camundongo, as células tumorais isoladas tinham preferência pelos vasos sanguíneos nativos, “parasitando-os” perivascularmente. A partir da segunda semana observou-se que as células tumorais proliferavam ao longo dos vasos – Esquema 5. Esse angiotropismo foi bem demonstrado por Lugassy e colaboradores (2002). Em modelos *in vivo* viu-se que as células de gliomas ocupavam uma posição perivascular tipo-pericítica, sem evidências morfológicas de extravasamento para o lado abluminal. Esse padrão angiotrópico não era feito ao acaso, mas via-se que as células isoladas ficavam ao redor dos vasos que estavam na borda invasiva da massa tumoral, ou no máximo a 1-2mm de distância e próximo ao plexo coróide. Isso indica um método de migração extravascular ao

Tabela 3. Exemplos de algumas aberrações do endotélio em gliomas.

	Vaso tumoral cerebral	Vaso cerebral normal
espessura	~ 0,5 µm	0,26 µm
Barreira hematoencefálica	<ul style="list-style-type: none"> • Transporte transendotelial não-seletivo <ul style="list-style-type: none"> • Fenestrado • Perda das junções oclusivas (alta permeabilidade) 	<ul style="list-style-type: none"> • Transporte endotelial seletivo <ul style="list-style-type: none"> • Não-fenestrado • Junções oclusivas
Membrana basal	Delgada, irregular	Contínua
Diâmetro	Tortuoso, sinusoidal 3-40 µm (8-16 µm em áreas de grande angiogênese)	~ 3-5 µm
Angio arquitetura	Arranjo caótico; ramificação irregular, espaço intervacular variável e grandes áreas vasculares *	Ramos delicados em fina rede
Microcirculação e perfusão **	50-70% células sanguíneas vermelhas perfundidas ***	> 95% células sanguíneas vermelhas perfundidas
Interação leucócito-endotélio	Quase ausente	Presente

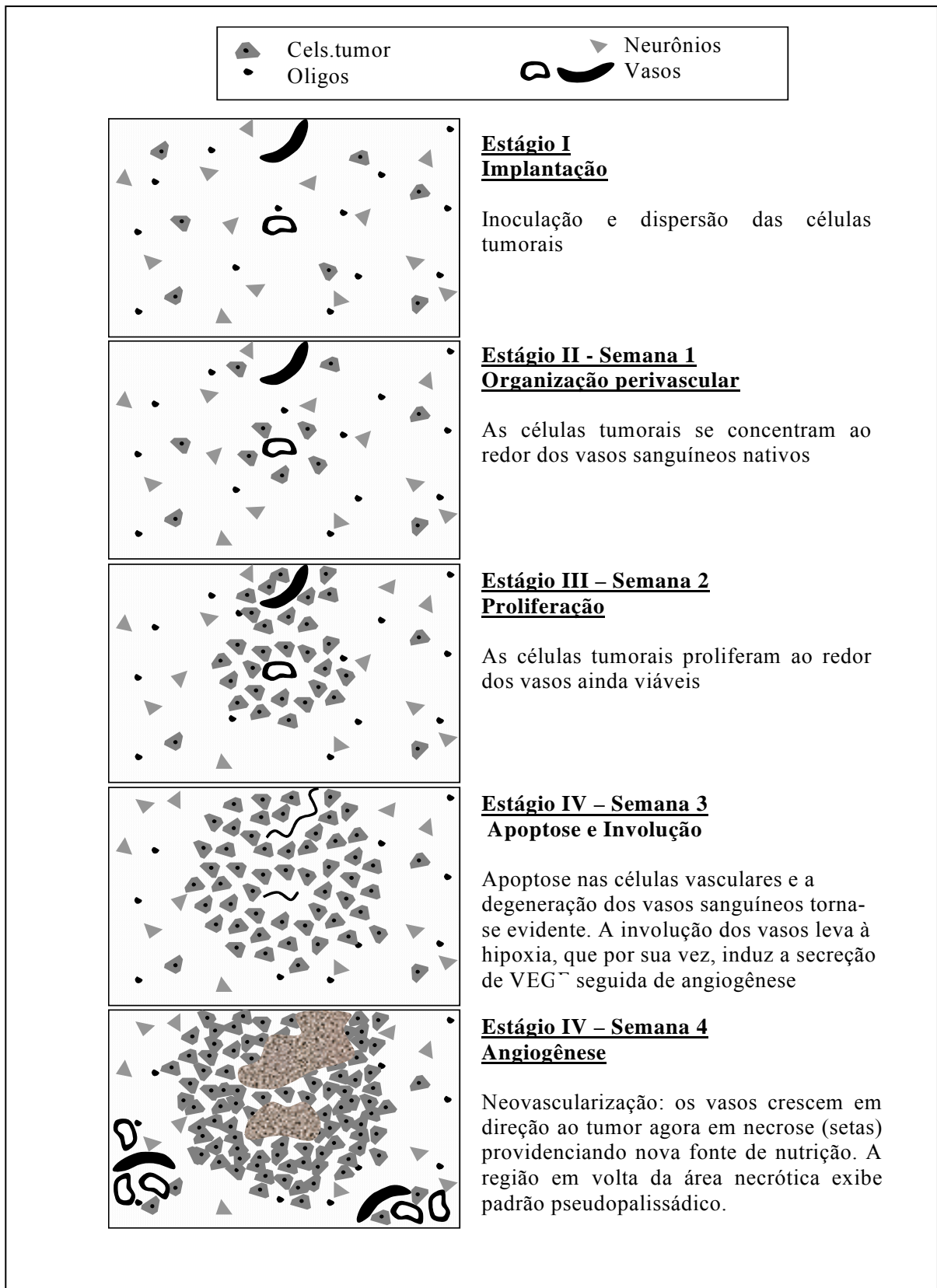
* Entretanto, a atividade angiogênica dentro da massa tumoral decresce em direção ao centro do tumor; ** Funcionalidade para suprimento nutricional do tecido; *** Velocidade baixa e heterogênea, hematócrito microvascular alto, grande quantidade de microvasos com fluxo ausente ou lento (adaptado a partir de Vajkoczy & Menger, 2000).

longo do plexo coróide. A videomicroscopia em tempo real permitiu comprovar que as células de glioma semeadas sobre estruturas tipo capilares endoteliais em Matrigel[®] migravam, aderiam e se espalhavam no lado externo das estruturas tipo-capilares.

Parece um tanto quanto paradoxal que os vasos sanguíneos nativos em gliomas regredem à medida que o tumor progride. Porém, o glioma não encapsulado, característica típica de seu caráter invasivo, migra ao longo dos vasos sanguíneos e pode se tornar tão grande quanto um tumor dito angiogênico. Entretanto quando um astrocitoma grau III (WHO) progride para um glioblastoma grau IV (WHO) eles se tornam hipóxicos e necróticos (Zagzag *et al.*, 2000; Bergers & Benjamin, 2003) graças a uma redução da vasculatura nativa. Durante este processo, cujos eventos iniciais são ainda desconhecidos, aumenta a expressão angiopoietina-2 e acentuada proliferação tumoral. A expressão de VEGF é regulada pelos níveis de oxigenação dos tecidos (revisto por Brown *et al.*, 1997) e a hipóxia é um forte indutor de angiogênese, levando a um aumento de expressão de VEGF e VEGFR2, que atuando juntamente com a angiopoietina-2 promovem remodelamento e brotamento vascular (Zagzag *et al.*, 2000; Bergers & Benjamin, 2003). Entretanto, pouco se sabe ainda sobre as mudanças genéticas e epigenéticas que acompanham a regressão vascular que acontece antes da fase angiogênica da progressão dos gliomas (Bergers & Benjamin, 2003).

A regressão vascular poderia ser causada por mecanismos pró-coagulação causando trombose nos vasos sanguíneos. A área necrótica exibiria ao centro vasos trombóticos mortos e ao seu redor um padrão pseudopalissádico, cujo fenômeno se explica pela quantidade de células tumorais ativamente migratórias saindo da zona de hipóxia. A migração induzida por hipóxia aconteceria em regiões proximais e distais da área de vaso-oclusão e trombose pela conseqüente insuficiência de fluxo sanguíneo (Brat & van Meir, 2004). Seriam tais células pseudopalissádicas hipóxicas as responsáveis pela angiogênese do glioma, causando hiperplasia vascular. Uma interessante revisão sobre a necrose em GBM feita por Raza e colaboradores (2002) mostra que talvez a necrose seja mais complexa do que simplesmente uma conseqüência de um desenvolvimento da massa tumoral além da capacidade de seu suprimento vascular. A proliferação celular tumoral e a angiogênese tumoral podem ser controlados independentemente, e tanto glioblastomas grandes quanto pequenos contêm áreas necróticas. Este grupo sugeriu a seguinte hipótese: através da secreção do TNF (*tumor necrosis factor*) pelas células tumorais, ocorreria ativação de mecanismos pró-coagulação (causando trombose nos vasos)

Esquema 5. Modelo *in vivo* em camundongo mostrando cinco estágios do crescimento do glioma (Zagzag et al, 2000).



que promoveriam a necrose como modo final de morte celular por hipóxia. A falta de oxigênio inibiria a cadeia respiratória e sem glicose, a glicólise seria revertida, o que resultaria em falta de ATP suficiente para a célula entrar em apoptose. Assim, a hipóxia selecionaria as células com menor potencial apoptótico dentre as células da população original. Células que sobrevivem à hipóxia tendem mais a proliferar do que a entrar em apoptose. Então restaria o quadro final característico de um GBM: células altamente resistentes à apoptose e não responsivas ao tratamento quimio e radio-terápico (Raza *et al.*, 2002).

Como se depreende destes comentários, a neovascularização que se instala com o tumor glial, glioblastoma, embora fascinante como tema de estudo, é ainda cheio de controvérsias, hipóteses e poucas conclusões. Foi neste fascínio pelo problema da interação do endotélio com o glioblastoma que embarquei nesta tese de doutorado.

2 - Foco do Estudo e Objetivos

Além do remodelamento da MEC peritumoral por degradação proteolítica, a composição deste microambiente pode ser afetado pela síntese de novas moléculas 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 seu tecido correspondente não-neoplásico (Castellani *et al.*, 2002). Com a alteração da MEC, pode-se esperar que a interação célula-matriz sofra também profundas modificações. As células endoteliais tumorais estabelecem fracas conexões intercelulares entre si e exibem uma série de defeitos morfológicos e funcionais (Munn, 2003) possivelmente induzidos por esse microambiente tumoral (Vajkoczy & Menger, 2004; Bergers & Benjamin, 2003). A adesão celular à MEC é imprescindível para a viabilidade endotelial (Re *et al.*, 1994) e sabemos que a MEC tumoral é diferente da matriz do tecido original. Por exemplo, a quantidade de FN numa MEC tumoral normalmente é muito pequena permitindo às células transformadas mobilidade suficiente à migração/invasão/proliferação.

Vários trabalhos na literatura mostraram a presença de apoptose endotelial durante o curso normal da angiogênese em gliomas (Chang *et al.*, 2000; Ramsauer *et al.*, 2002; Segura *et al.*, 2002; Tertemiz *et al.*, 2005), inclusive durante a progressão maligna *in vivo*, onde a apoptose precedia a fase angiogênica do crescimento da massa tumoral (Zagzag *et al.*, 2000).

Assim, a apoptose, que é imprescindível para a correta formação, organização e arquitetura dos tecidos, órgãos e sistemas durante o desenvolvimento embrionário (Twomey & McCarthy, 2005), parece ser também fundamental para a instalação do leito endotelial durante o crescimento tumoral glial. Ao reunir esse conjunto de informações, nos propusemos a investigar o papel da matriz extracelular de vários gliomas humanos, como parte do microambiente tumoral, na interação tumor-endotélio e na morte endotelial. Utilizamos para tanto um modelo consagrado, de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) e tentamos estabelecer importância/correlação com a angiogênese tumoral, haja visto que apoptose e angiogênese, à primeira vista paradoxais, podem ser imprescindíveis para o crescimento e evolução do GBM.

2.1 - Objetivos específicos

- 1) Observar e quantificar a desaderência da população de células endoteliais em contato com a MEC do glioma, durante as primeiras 24h de co-cultura;

- 2) Identificar o tipo de morte das células endoteliais causada pelo desaderência da MEC do glioma durante as primeiras 24h de co-cultura: *anoikis*?;
- 3) Observar se o efeito de desaderência endotelial se repete em sistemas de co-cultivo com gliomas;
- 4) Identificar os principais componentes da MEC do glioma;
- 5) Identificar o provável agente/fator constituinte da MEC de glioma responsável pela desaderência e morte das células endoteliais, em particular, verificar o possível papel da glicoproteína matricelular desadesiva, a TN.
- 6) Analisar se a morte das células endoteliais possui correlação com a fase do ciclo celular em que se encontram;
- 7) Averiguar se as células endoteliais que resistem à morte após 24 horas de interação com a MEC de glioma foram selecionadas positivamente à proliferação e à tubulogênese *in vitro*;
- 8) Analisar o papel da TN-C (o domínio EGF-like) nas células endoteliais que resistem à morte após 24 horas de interação com a MEC de glioma.

3 - Materiais e Métodos

3.1 - Animais

Ratos da linhagem Wistar foram utilizados neste trabalho para as culturas primárias de astrócitos corticais. Os animais foram criados no biotério do Departamento de Anatomia, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), no centro de ciências da Saúde (CCS), UFRJ. Foram utilizados ratos recém nascidos (P0 = dia do nascimento) para os experimentos *in vitro*. Os procedimentos com os animais seguiram as regras mínimas de comportamento ético na manipulação de animais, segundo normas da COBEA (1991).

3.2 - Cultura de células endoteliais humanas.

Células endoteliais primárias (HUVECs) foram obtidas através do tratamento de veias umbilicais humanas com uma solução estéril de colagenase IV 0,1% (Sigma) em PBS rico em glicose (Merck), conforme método descrito originalmente por Jaffe *et al* (1973). Com exceção do soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, BR) e do M199/HEPES (M199, Sigma), todos os suplementos da cultura de células são da Life Technologies do Brasil. As células primárias foram cultivadas em M199/HEPES suplementadas com 20% de SFB 2 mM de L-glutamina, 100 µg/ml de penicilina, 2,5 µg/ml anfotericina e 100 µg/ml gentamicina. As HUVECs foram mantidas a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até atingirem a confluência, e então repicadas com tripsina-EDTA 0,025% e imediatamente usadas nos experimentos descritos neste capítulo.

3.3 - Cultivo de linhagens celulares

Foram utilizadas células de linhagens de glioma humano U373, A172 e U87 (ATCC, USA), células de glioma de rato C6 (doadas por Dra. Mary Sogaia, USP), células de neurosarcoma de rato 9L (cedidas gentilmente pelo Dr. Crépin, INSERM U353, Paris, França), células de carcinoma mamário humano MCF7 e carcinoma de útero U79 (adquiridas do BCRJ-Banco de Células do Rio de Janeiro, UFRJ). Células de glioblastoma humanos obtidas de neurocirurgia de pacientes do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF, UFRJ) e denominadas GBM95 e GBM0202. Eventualmente, também foram utilizados explantes de glioblastomas e

oligodendrogliomas para sistemas de co-cultura *in vitro*. Este trabalho faz parte do projeto de pesquisa registrado no CONEP número 2340 do Ministério da Saúde que autoriza o uso destas linhagens humanas.

As células tumorais foram cultivadas em DMEM-F12 (Gibco, Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12) e suplementadas com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina e 500 µg/ml de penicilina/estreptomicina e 2,5 µg/ml de fungizona. As culturas foram mantidas em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até atingirem a confluência, e quando preciso para culturas secundárias, repicadas com tripsina-EDTA 0,025%. O meio de cultura foi renovado a cada 2-3 dias.

A linhagem de fibroblastos de gengiva humana FGH (BCRJ, UFRJ) foi utilizada como controle de matriz adesiva e cultivada em meio DMEM-F12, suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 500 µg/ml de penicilina/estreptomicina, 2,5 µg/ml de fungizona e mantida em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até atingir a confluência, para depois ser então repicada com tripsina-EDTA 0,025%. O meio de cultura foi renovado a cada 2-3 dias.

3.4 - Cultura primária de astrócitos de córtex de ratos neonatos (P0)

Culturas primárias de astrócitos foram preparadas a partir do córtex cerebral de ratos P0. Os procedimentos foram realizados conforme descrito por Moura-Neto (1983) e modificadas por Gomes e colaboradores (1999). O córtex cerebral foi isolado, a meninge removida, e as estruturas mantidas em PBS contendo 0,6% de glicose. Após a dissecação das estruturas, as células foram dissociadas mecanicamente com pipeta Pasteur em um tubo de 15 ml. Os fragmentos foram decantados naturalmente por alguns minutos e a seguir, as células livres em suspensão foram coletadas e centrifugadas a 1500 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento recuperado e ressuspensão em 3ml de DMEM-F12 acrescido de 3 mM de glicose, 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 500 µg/ml de penicilina/estreptomicina, 2,5 µg/ml de fungizona. As células foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm² (TPP, Alemanha) previamente tratadas com poli-orntina (1,5 µg/ml, PM 41000, Sigma), e as culturas foram mantidas em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até atingirem a confluência (cerca de 8 a 10 dias), e então repicadas com tripsina-EDTA 0,025%. O meio de cultura foi renovado a cada 2-3 dias. Os astrócitos foram utilizados somente após um repique, culturas secundárias.

3.5 - Obtenção das matrizes extracelulares (MECs) imobilizadas livres de células

As células foram cultivadas em confluência por 48 horas, em condições normais de cultura e então lavadas em DMEM-F12 sem soro e lisadas com tampão contendo 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 protéica restante, invisível ao microscópio óptico, é o que chamaremos de *matriz imobilizada livre de células*, na qual foi possível detectar elementos da matriz extracelular por técnicas imunocitoquímicas.

As células das quais isolamos MEC imobilizada, como indicado acima, foram cultivadas em placas de 6, 24 ou 96 poços ou garrafas de cultura 25 cm², de acordo com a conveniência do experimento. Em ensaios de cultura de células sobre as MEC imobilizadas nos quais foi necessário efetuar marcações com imunofluorescência ou outros corantes celulares, as matrizes foram feitas sobre lamínulas de vidro estéreis e sobre as mesmas plaqueamos as células endoteliais. Os controles considerados *ausência de matriz* foram o plástico puro ou a lamínula pura sobre os quais semeávamos células para experimentos controle.

A fim de avaliarmos o papel da TN em alguns experimentos, incubamos as MECs com anticorpo anti-TN monoclonal (Sigma, 1:800); um isotipo-controle IgG1 (30 μg/ml) ou 0,1% BSA em meio 199 durante duas horas e lavadas para interagirem com as células endoteliais. O anti-TN foi produzido contra um epítipo situado no domínio EGF-like (ou de repetições EGF-L) na região N-terminal da TN-C, segundo dados do fabricante.

3.6 - Quantificação da adesão das células endoteliais cultivadas sobre MECs imobilizadas pelo método do MTT

As HUVECs foram descoladas de seu substrato de cultura com tripsina-EDTA 0,025% e plaqueadas sobre as matrizes na proporção 3 x 10⁴ células/0,2 cm² em meio de cultura M199 contendo BSA 0,1%, a fim de evitar completa privação protéica no meio. Células endoteliais para confecção de uma curva-padrão (5.000 a 50.000 células/poço) foram plaqueadas paralelamente ao experimento e mantidas em M199 contendo 20% de SFB. As células sobre as matrizes e a curva-padrão foram mantidas por 2h a 37⁰ C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A seguir, os poços

foram lavados em M199 fresco sem SFB para a retirada das células não aderentes e M199 contendo 0,1% BSA + 1mg/ml MTT (3-(4,5dimetiliazol-2-yl)-2,5difênil tetrazólio brometo) foi adicionado para o cultivo por mais 4 horas. A curva-padrão não foi lavada e o sobrenadante foi aspirado e 100 µl/poço de isopropanol absoluto foi adicionado para lise das células e solubilização dos cristais de MTT, em todas as condições. A absorbância do extrato foi lida a 595 nm em leitor de placas de ELISA.

3.7 – Análise de adesões/contatos focais e formação de fibras de estresse durante a adesão inicial das células endoteliais sobre MECs imobilizadas

Cerca de 10^5 células/cm² de HUVECs foram plaqueadas em placas de 24 poços sobre as matrizes feitas previamente sobre lamínulas estéreis de vidro, utilizando-se meio de cultura M199 contendo BSA 0,1%. As células endoteliais, assim cultivadas, permaneceram 2 horas a 37⁰ C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A seguir os poços foram lavados em PBS, as células fixadas em etanol 70%, a -20⁰C por 30 minutos. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com BSA 5% por 30 minutos e a seguir a incubação com o anticorpo monoclonal (Sigma, diluído 1: 1.000) anti-vinculina por 45 minutos a temperatura ambiente. Após lavagens com PBS, o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo Cy3 (1: 20.000) e faloidina-FITC em PBS contendo BSA 1% foi incubado e por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, as células foram lavadas e incubadas com DAPI por cerca de 3 minutos e as lâminas foram montadas em meio aquoso N-propil-galato.

3.8 - Quantificação da *anoikis* endotelial induzida por MECs imobilizadas

As HUVECs foram descoladas de seu substrato de cultura com tripsina-EDTA 0,025% e plaqueadas sobre as matrizes na proporção 10^6 células/25cm² em meio M199 contendo BSA 0,1% a fim de evitar completa privação protéica no meio. Após 4 horas a 37⁰ C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂, os poços foram lavados em M199 fresco sem SFB para retirar as células senescentes e eventualmente mortas pela tripsinização/manipulação e novo M199 contendo 0,1% BSA foi repostado. As HUVECs permaneceram sobre as matrizes por 24h.

Para a quantificação da adesão, as células endoteliais que restaram aderidas foram descoladas por tripsinização após duas lavagens suaves com meio 199 sem soro. A solução de

células foi submetida à análise citométrica (FACScalibur, Becton & Dickinson) com análise a partir de 10.000 eventos. Fragmentos celulares foram excluídos da contagem.

Em alguns experimentos, a quantificação das células que ainda permaneceram aderidas após 24h em contato com as MECs foi feita através da contagem do número de HUVECs encontradas em 10 imagens capturadas aleatórias pela câmera digital CCD CoolSnap-Procf Color acoplada ao microscópio Nikon TE 3000.

As células aderidas (e não as células em suspensão) foram escolhidas para a quantificação de *anoikis* endotelial porque as células em suspensão tendem a se fragmentar e os fragmentos são excluídos da contagem, fato que poderia subestimar os valores encontrados nas condições com maior *anoikis*.

3.9 - Quantificação em tempo real por vídeo-microscopia do descolamento endotelial das MECs imobilizadas.

Cerca de 10^6 HUVECs foram plaqueadas sobre cada uma das matrizes previamente preparadas como descrito acima, sobre pequenas placas de Petri de plástico, em meio de cultura M199 contendo BSA 0,1%. As células endoteliais permaneceram incubadas por 4h a 37^0 C, em atmosfera úmida com 5% de CO_2 para que pudessem aderir adequadamente. A seguir os poços foram lavados em M199 fresco sem SFB e novo M199 contendo 0,1% BSA foi repostado, e então retiradas as células mortas.

As imagens (*frames*) da monocamada foram capturadas pela câmera digital CCD (Hamamatsu C2400) acoplada ao microscópio Nikon TE 3000. Durante 11 horas consecutivas capturamos 1 imagem a cada minuto, totalizando 660 frames. O filme foi montado com ajuda do ImageJ (NIH, freeware). As células foram mantidas todo o tempo a 37^0 C, em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , nas condições estabelecidas pelo laboratório de Pinça Óptica da COPEA-UFRJ, sob supervisão do Dr. Nathan Bessa (IF-UFRJ).

Para a quantificação, a cada célula de morfologia achatada que se arredondava, marcava-se o número do *frame* que correspondia ao minuto em que ela se descolou do substrato possibilitando a construção de um *perfil de desaderência versus tempo* no programa Kaleidagraph (Synergy Software).

3.10 - Análise das alterações morfológicas indicativas de apoptose endotelial no cultivo sobre MECs imobilizadas

Cerca de 10^5 células/cm² de HUVECs foram plaqueadas em placas de 24 poços sobre as matrizes previamente preparadas como acima, sobre lamínulas estéreis de vidro, com meio de cultura M199 contendo BSA 0,1%. As células endoteliais permaneceram 4h a 37⁰ C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ para que pudessem aderir adequadamente. A seguir os poços foram lavados em M199 fresco sem SFB e novo M199 contendo 0,1% BSA foi repostado, e então retiradas as células mortas.

Após 24h de cultivo das HUVECs sobre as matrizes, as células foram rapidamente lavadas com M199 sem SFB e fixadas e coradas segundo as instruções do sistema de coloração hematológica Panótico (0.1% (v/v) triaril-metano/ 0.1% (v/v) xantenos/ 0.1% (v/v) tiazinas, Laborclin, Curitiba). Em suma, as lamínulas foram mergulhadas nas soluções 1, 2 e 3 por um minuto cada e depois lavadas com água. Após desidratação do material (secagem ao ar) as lamínulas foram montadas com Entellan® (Merck).

As imagens das células apoptóticas foram capturadas pela câmera digital CCD CoolSnap-Procf Color acoplada ao microscópio Nikon TE 3000.

3.11 - Quantificação dos núcleos apoptóticos das células endoteliais cultivadas por 24h sobre MECs imobilizadas.

Cerca de 10^5 células/cm² de HUVECs foram plaqueadas sobre as matrizes feitas previamente sobre lamínulas estéreis de vidro em placas de 24 poços, em M199 contendo BSA 0,1%. As células endoteliais permaneceram 4h a 37⁰ C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ para que pudessem aderir adequadamente. A seguir os poços foram lavados em M199 fresco sem SFB e novo M199 contendo 0,1% BSA foi repostado, para retirar as células mortas.

Após 24h de cultivo, as células foram rapidamente lavadas com M199 sem SFB e fixadas com paraformaldeído (PF) 4% recém-preparado, por 20 minutos e impermeabilizadas com Triton X-100 0,2% em PBS por 5 minutos. As células fixadas foram incubadas com DAPI por mais 5 minutos e lavadas (3 vezes) em PBS nos intervalos de cada etapa.

Para a quantificação dos núcleos fragmentados e núcleos picnóticos, dez campos aleatórios para cada condição foram capturados pela câmera digital CCD CoolSnap-Procf Color acoplada ao

microscópio de fluorescência Nikon TE 3000 e todos os núcleos de cada condição foram contados. Estabelecemos assim uma razão dos núcleos apoptóticos sobre os intactos.

3.12 - Análise da apoptose endotelial através de marcações com anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo (PI) por citometria de fluxo.

Cerca de 10^6 HUVECs/25 cm² foram plaqueadas sobre as matrizes previamente preparadas conforme já descrito, em M199 contendo BSA 0,1%. As células endoteliais permaneceram 4h a 37^o C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ para que pudessem aderir adequadamente. A seguir os poços foram lavados (para retirada de células inviáveis) em meio de cultura M199 fresco sem SFB e novo M199 contendo 0,1% BSA foi repostado.

Em alguns experimentos, conforme indicado na seção de Resultados, as células endoteliais foram semeadas sobre MECs de glioma e de astrócitos com seus respectivos meios condicionados (MC).

Após 18 ou 24 horas de cultivo as HUVECs em suspensão e aderidas foram recolhidas para análise da população apoptótica. As células aderidas foram descoladas do substrato com tripsina 0,025% contendo EDTA e colocadas em M199 contendo 20% SFB. A seguir, as HUVECs foram centrifugadas por 10 minutos a 1.100 rpm e lavadas em PBS-Ca²⁺ gelado. Após nova centrifugação as células foram ressuspensas em 100 µl de tampão de ligação à anexina V (Hepes 100mM pH 7,4, NaCl 1,5 M, KCl 50 mM, Mg Cl₂ 10mM e CaCl₂ 18 mM), contendo 5 µl de Anexina V- FITC (AV) [BD Pharmingen] e iodeto de propídeo (PI) 1 µg/ml. As células foram incubadas neste meio por 15 minutos a temperatura ambiente, no escuro.

As células foram submetidas ao FACScalibur (Becton & Dikison) em menos de uma hora após a incubação com AV/PI. Controles internos foram feitos: (i) células não marcadas; (ii) células marcadas apenas com AV-FITC, (iii) células marcadas apenas com PI e (iv) células duplamente marcadas (AV/PI). O sinal emitido pela AV-FITC foi lido pelo filtro FL1 e o sinal emitido pelo PI, pelo filtro FL2.

3.13 - Quantificação da apoptose endotelial por TUNEL em sistemas de co-cultura HUVEC x glioblastoma

Cerca de 10^5 células/cm² de HUVECs foram plaqueadas sobre matrizes ou células vivas em lamínulas estéreis de vidro em placas de 24 poços, mantidas em meio de cultura M199 contendo BSA 0,1%. As células endoteliais permaneceram 4h a 37⁰ C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ para que pudessem aderir adequadamente. A seguir os poços foram lavados com M199 fresco sem SFB e novo M199 contendo 0,1% BSA foi repostado, e então as células mortas foram retiradas.

A marcação dos fragmentos apoptóticos de DNA foi feita de acordo com as instruções do fabricante de APO-BrdU. TUNEL Assay Kit (Terminal Deoxynucleotide Transferase dUTP Nick End Labeling) [A-23210, Molecular Probes] e adaptado à imunofluorescência. Brevemente, as culturas em lamínulas foram lavadas com PBS e fixadas PF 1% por 15 minutos, a 4⁰C. Após duas lavagens com PBS, as células foram mantidas em etanol 70% a -20⁰C por cerca de 3 dias, em sistema hermeticamente vedado. Esta etapa permite estocar as células por vários dias antes de prosseguir. As HUVECs foram saturadas com 5% de BSA por 30 minutos e a seguir, incubadas com anticorpo policlonal anti fator von Willebrand (fvW) humano (Dako) na diluição 1:600 em PBS contendo 1% BSA por 1 hora a temperatura ambiente. O anti-fvW foi usado a fim de distinguir as células endoteliais na co-cultura. A seguir, as células foram lavadas duas vezes em PBS e incubadas com 30 µl de solução de marcação de DNA por 90 minutos a 37⁰C, sem que as lamínulas secassem. As células foram então lavadas com tampão de rinsagem, duas vezes e incubadas com os anticorpos monoclonal anti-BrdU Alexa Fluor 488 (diluição 1:20) e o anticorpo anti-IgG de coelho Cy3 (1:2.000) em tampão de rinsagem por 30 minutos. O DAPI também foi utilizado a fim de confirmar a marcação nuclear com o emprego da técnica do TUNEL.

Para a quantificação das HUVECs apoptóticas, dez campos aleatórios para cada condição foram capturados pela câmera digital CCD CoolSnap-Procf Color acoplada ao microscópio de fluorescência Nikon TE 3000 e no mínimo 300 células para cada condição foram contadas.

3.14 - Dosagem qualitativa e semi-quantitativa das proteínas matriciais secretadas por ELISA indireto (ELISA-enzyme linked immnuoabsorbant assay).

Os anticorpos foram cedidos pela Dra. Chantal Legrand (Unidade 353 INSERM, Hôpital Saint Louis. Paris, França): anticorpo policlonal de coelho anti-LM humana (1:5.000), anticorpo policlonal de coelho anti-colágeno VI (1:4.500), anticorpo policlonal de coelho anti-TSP1 humana (R1, 5µg/ml), anticorpo policlonal de coelho anti-FN (5µg/ml), anticorpo policlonal de coelho anti-colágeno I humano 1:35 e anticorpo policlonal de cabra anti- colágeno IV (1:500). Os anticorpos secundários foram anti IgG de coelho (1:5.000) e anti IgG de cabra (1:10.000). O anti-TN (Sigma) foi usado a 1:8.000.

As matrizes receberam os anticorpos primários nas suas diluições apropriadas em PBS + Tween 20 0,05% (PBS+T), por uma hora a temperatura ambiente. Após 3 lavagens com PBS+T os anticorpos secundários foram adicionados por mais uma hora a temperatura ambiente. A revelação foi feita em tampão citrato pH 4,5 contendo H₂O₂ e OPD a 1mg/ml. A paralisação da reação de cor foi feita com H₂SO₄ 3M. A leitura foi feita em leitor de ELISA (BioRad) a 490 nm.

Nas dosagens semi-quantitativas para FN e TN (Sigma) usamos curvas-padrão de 0,01 a 10 µg/ml com as proteínas purificadas incubadas nos poços de microplacas *overnight* a 4^oC. Contudo, não sabemos a quantidade exata de FN ou TN purificada que adere ao plástico da placa de ELISA. Por isso, não podemos quantificar precisamente a quantidade de cada proteína adsorvida nas matrizes secretadas, mas pudemos estabelecer uma correlação direta entre os valores de absorvância encontrados na curva-padrão (usados para a confecção de uma escala de unidades arbitrárias – ver adiante) e os valores de absorvância encontrados nas MECs imobilizadas. A absorvância 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. O valor de absorvância relativo à menor concentração da proteína ainda detectável pelo método de ELISA, dentro da faixa linear, foi considerado como 1 unidade arbitrária (U.A.) da referida proteína na matriz imobilizada, sendo as diluições ascendentes consideradas como o número de UA proporcionais ao do ponto imediatamente inferior. Os valores de absorvância obtidos para as matrizes nativas imobilizadas foram então convertidos em unidades arbitrárias, para ambas as proteínas (FN e TN), de forma que uma análise comparativa de teores pudesse ser estabelecida para cada matriz estudada.

3.15 - Co-cultivo e análise da apoptose endotelial em sistemas de co-cultura de HUVECs com explantes de GBMs humanos

Explantes de glioblastomas foram obtidos por ressecção cirúrgica de pacientes do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF, UFRJ). Após sua dissecação e retirada das porções necróticas e de vasos sanguíneos, os explantes foram repousados sobre monocamada confluyente de HUVECs sem nenhum dano físico à mesma e mantidos por 24 horas em meio 199 contendo 1% de SFB.

3.16 - Dosagem de proliferação celular por incorporação de timidina tritiada (^3H)

Após o contato com as diferentes matrizes, as HUVECs (sincronizadas na fase G0/G1 ou não, e cultivadas sobre matrizes bloqueadas pelo anti-TN, pelo isotipo-controle IgG1 ou apenas 0,1% de BSA, conforme indicaremos na seção resultados) foram tripsinizadas e plaqueadas (10^4 células/ $0,2\text{ cm}^2$) e mantidas em meio 199 contendo 20% de SFB, por 24 horas em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , a 37° C .

A incorporação de timidina acontece durante a fase S do ciclo celular e indica portanto, as células que estão duplicando seu DNA para proliferação celular. O pulso de timidina (2 uCi/ml) foi dado por 6 h (no período de 18 horas até 24 horas do fim do tempo deste ensaio de proliferação das HUVECs). A precipitação da timidina tritiada incorporada foi feita com adição de 100 μl /poço de TCA 10%. A CPMA foi lida em cintilador e o resultado dado em valores absolutos.

3.17 - Determinação da proliferação celular por incorporação de MTT

O mesmo ensaio básico de metabolização do MTT por células viáveis pode ser utilizado como teste de proliferação celular, a partir de tempos de cultivo maiores que 20 horas, no caso das HUVECs (Cominetti et al, 2004).

Após o contato com as diferentes matrizes, as HUVECs foram tripsinizadas e plaqueadas (10^4 células/ $0,2\text{ cm}^2$) e mantidas em meio 199 contendo 20% de SFB, por 72 horas em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , a 37° C . As células da curva-padrão foram adicionadas no terceiro dia do

ensaio de proliferação e mantidas por 4h a 37 °C, em meio 199 contendo 20% de SFB + 1mg/ml MTT, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. As HUVECs que foram previamente incubadas com as diferentes MECs imobilizadas receberam o meio 199 contendo MTT ao mesmo tempo que as células da curva-padrão.

A seguir, o sobrenadante foi aspirado e 100 µl/poço de isopropanol foi adicionado para lise das células e solubilização dos cristais de MTT. A absorbância do extrato foi lida a 595 nm em leitor de placa de ELISA.

3.18 - Sincronização em Go/G1 das células endoteliais

As células endoteliais tiveram sua entrada na fase G2/M do ciclo celular bloqueada por privação de soro (meio 199 contendo 0,1% BSA) durante 24 horas (Larsson *et al.*, 1986). As células endoteliais que não sofreram a interrupção do ciclo celular serão chamadas por nós de *população heterogênea*.

As células em G0/G1 ou heterogêneas foram semeadas sobre as MECs imobilizadas em determinados experimentos conforme indicado em Resultados.

3.19 - Ensaio da tubulogênese em Matrigel[®] após o contato de células endoteliais com as MECs imobilizadas

Após o contato com as diferentes matrizes por 24 horas (sincronizadas ou não, e sobre matrizes bloqueadas com anti-TN, ou IgG1, ou em 0,1% de BSA, conforme indicado em Resultados), as HUVECs foram tripsinizadas e plaqueadas (3×10^4 células/0,2cm²) sobre 50 µl Matrigel[®]/poço (placas de 96 poços) e mantidas em meio 199 contendo 2% de SFB, por 24 horas em atmosfera úmida com 5% de CO₂, a 37° C .

Para garantir que o mesmo de número de *células viáveis* fossem plaqueados sobre o matrigel[®], retiramos 20 µl (alíquotas) de cada amostra e incubamos estas células com azul de tripan 0,4% por 10 minutos a temperatura ambiente. A contagem celular foi feita em hemocitômetro e as células plaqueadas em duplicata.

Após 24 horas sobre matrigel as células foram fixadas com glutaraldéido 1,1% em PBS por 15 minutos em temperatura ambiente (Zemani *et al.*, 2005). A retirada do fixador foi feita por três

lavagens longas de PBS. Não houve danos nas estruturas tubulares por este tipo de fixação. A contagem dos *sprouts* (brotos, prolongamentos celulares endoteliais que indicam ramificação, brotamento que resulta no aspecto em rede da diferenciação angiogênica) foi feita por duas pessoas diferentes. Todo o campo foi contado (0,2 cm²). Contamos todos os *sprouts* encontrados nos poços e em duplicata.

3.20 - Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas com médias de 3 experimentos independentes e analisadas pelo teste ANOVA, Tukey's Multiple comparison.

4 - Resultados

4.1 - A matriz extracelular de gliomas mantém a adesão e viabilidade das células endoteliais nas primeiras horas de cultura.

A fim de investigarmos o comportamento de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) sobre proteínas matriciais secretadas por gliomas humanos, realizamos ensaios de adesão sobre diferentes tipos de suportes e matrizes nativas. A **Figura 1A** representa a quantificação da adesão das HUVECs através da metabolização de MTT (3-(4,5dimetiliazol-2-yl)-2,5difênil tetrazólio brometo) após 2 horas de sua adição sobre diferentes substratos: matriz extracelular (MEC) da linhagem de glioma humano U373 e MEC da linhagem de fibroblasto de gengiva humana FGH. Além destes suportes, foram utilizados como controles o próprio plástico e fibronectina purificada (FN). Não foram observadas diferenças significativas de adesão endotelial. O ensaio do MTT indica ainda que células endoteliais aderidas em todas as condições estão igualmente viáveis.

Em nosso estudo, dois suportes nativos foram considerados ótimos para a adesão das HUVECs: as matrizes autólogas (das próprias HUVECs) e a matriz secretada pela linhagem de fibroblastos humanos FGH, originários da gengiva. Nesta última, as HUVECs estabelecem contatos/adesões focais e exibem fibras de estresse em duas horas de cultura (**Figura 1B**). Um padrão comparável é obtido quando as HUVECs são semeadas em matrizes nativas secretadas pela linhagem de glioma U373. Este padrão imunopositivo para vinculina e actina polimerizada foi também visto em MECs de A172, U87, GBM95 e GBM0202 e MECs autólogas (dados não mostrados)

4.2 - As células endoteliais desaderem da MEC de glioma U373 ao longo de 24 horas de cultivo.

Após 24 horas de cultura sobre os diferentes suportes matriciais, as HUVECs descolam mais acentuadamente das MECs de glioma U373, em comparação com as

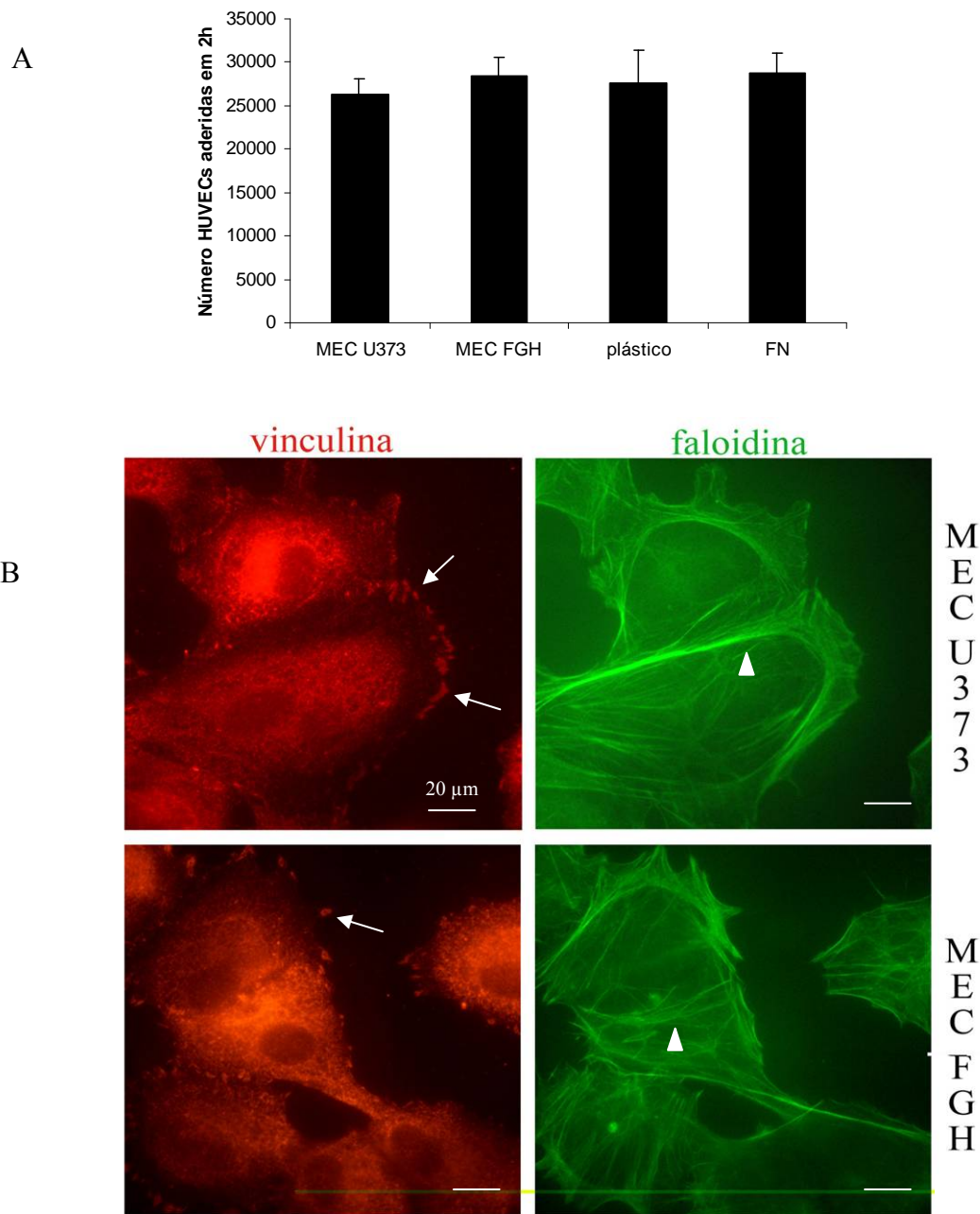


Figura 1. HUVECs aderem sobre diferentes tipos de MEC nas 2 primeiras horas de cultivo. (A) Adesão e viabilidade de células endoteliais semeadas sobre diferentes suportes, segundo o método do MTT. $3,0 \times 10^4/0,2 \text{ cm}^2$ células foram semeadas sobre matrizes imobilizadas obtidas por dissolução de monocamadas celulares com amoníaco/Triton X-100, em PBS contendo inibidores de proteases (ver Métodos). A FN ($5\mu\text{g/ml}$) foi imobilizada após incubação (16-18 horas) com os poços de cultura; (B) Imunocitoquímica com anticorpo primário anti-vinculina, mostrando que HUVECs estabelecem contatos/adesões focais (setas brancas) nas matrizes imobilizadas e a formação de **fibras de estresse** (cabeça de seta). MEC = matriz extracelular; FN= fibronectina. Análise estatística feita pelo ANOVA, Tukey's Multiple comparison; $p>0,05$.

matrizes consideradas ótimas. De acordo com a quantificação feita por citometria de fluxo, uma média de 28% ($\pm 4,67$) HUVECs ainda estavam aderidas à MEC de U373 após este período, em comparação aos 50% ($\pm 2,73$) ainda aderidos à MEC de FGH ou à FN (**Figura 2**). Houve grande variação encontrada na adesão das HUVECs sobre plástico e MEC de astrócito P0 (astrócitos primários de ratos neonatos), não houve diferença estatística quando comparadas à MEC de U373, embora em cada experimento individual, o número de HUVECs aderidas à MEC de glioma tenha sido sempre o menor valor. Uma quantificação paralela foi feita contando-se todas as células aderidas em 10 campos aleatórios para cada condição e os resultados foram muito similares aos obtidos pela análise citométrica. Por uma questão de maior precisão, optamos por representar aqui a quantificação de eventos representativos da população aderida após 24 horas, obtida pela citometria de fluxo (análises de 10.000 eventos por amostra em cada experimento excluindo-se os *debris* celulares, n=3).

A análise do processo de desaderência por videomicroscopia permitiu observar em tempo real o padrão de descolamento das HUVECs sobre a matriz de glioma humano U373. O descolamento das células endoteliais até 8 horas de cultura sobre as MECs de glioma U373 e de astrócitos primários tem um padrão muito similar, conforme mostra a **Figura 3**. Entretanto, nas matrizes de astrócitos primários, a taxa de descolamento parece atingir um ápice e estabelecer um patamar, até o final do período de aquisição de imagens (cerca de 15 horas após o início do cultivo das HUVECs nas matrizes), o que não acontece nas matrizes de glioma humano U373. Nestas matrizes, as HUVECs parecem se descolar indefinidamente, ao menos, até o tempo em que estabelecemos o limite das filmagens (11 horas consecutivas). A MEC de astrócitos primários portanto, mostrou-se mais adesiva que a matriz de glioma humano U373. A MEC de fibroblasto FGH foi a mais permissiva à adesão endotelial, com menor número de eventos de desaderência ao longo das 11 horas de filmagem, seguindo-se ao plástico, onde aderiram mais células endoteliais ao longo das 11 horas de filmagem do que em outras matrizes gliais (glioma e de astrócitos).

A desaderência endotelial em matriz de glioma é maior do que a observada em ausência de matriz (plástico). Este dado, juntamente com os resultados mostrados na Figura 1, nos quais fica evidente a ocorrência de um processo de adesão consistente nas primeiras 2 horas de incubação das HUVECs com matrizes de glioma, sugerem que existam proteínas

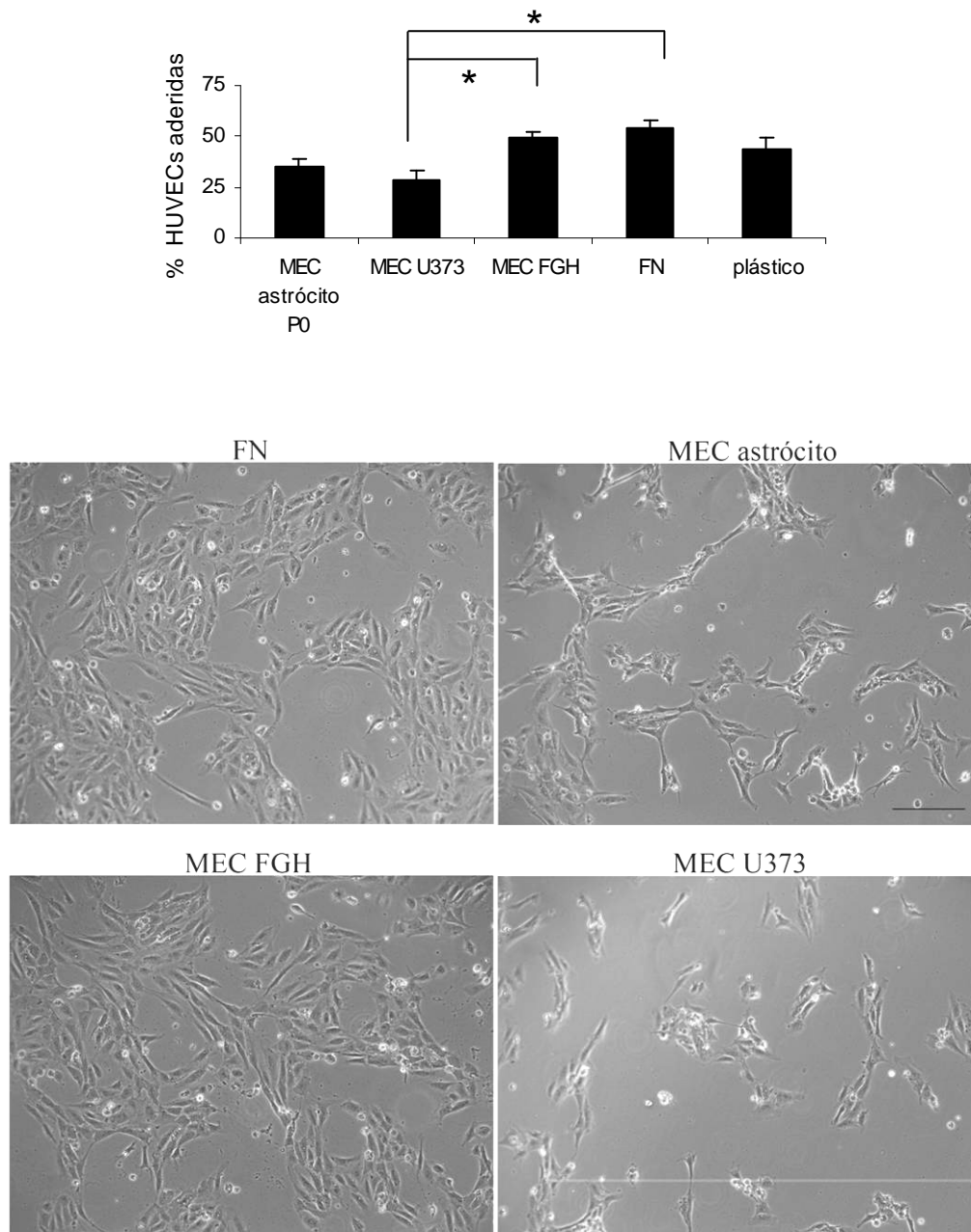


Figura 2. HUVECs descolam mais acentuadamente da MEC de glioma U373 em 24 horas de cultura. $10^4/\text{cm}^2$ células endoteliais células foram semeadas sobre matrizes. A FN ($5\mu\text{g}/\text{ml}$) foi imobilizada após incubação 16-18 horas com os poços de cultura; (A) Quantificação das células que permaneceram aderidas após 24 h adesão endotelial por FACs. (B) Aspecto da monocamada endotelial após 24 horas sobre diferentes MECs. Análise estatística feita pelo ANOVA, Tukey's Multiple comparison; * $\rho < 0,05$. Média de três experimentos independentes. MEC = matriz extracelular; FN= fibronectina.

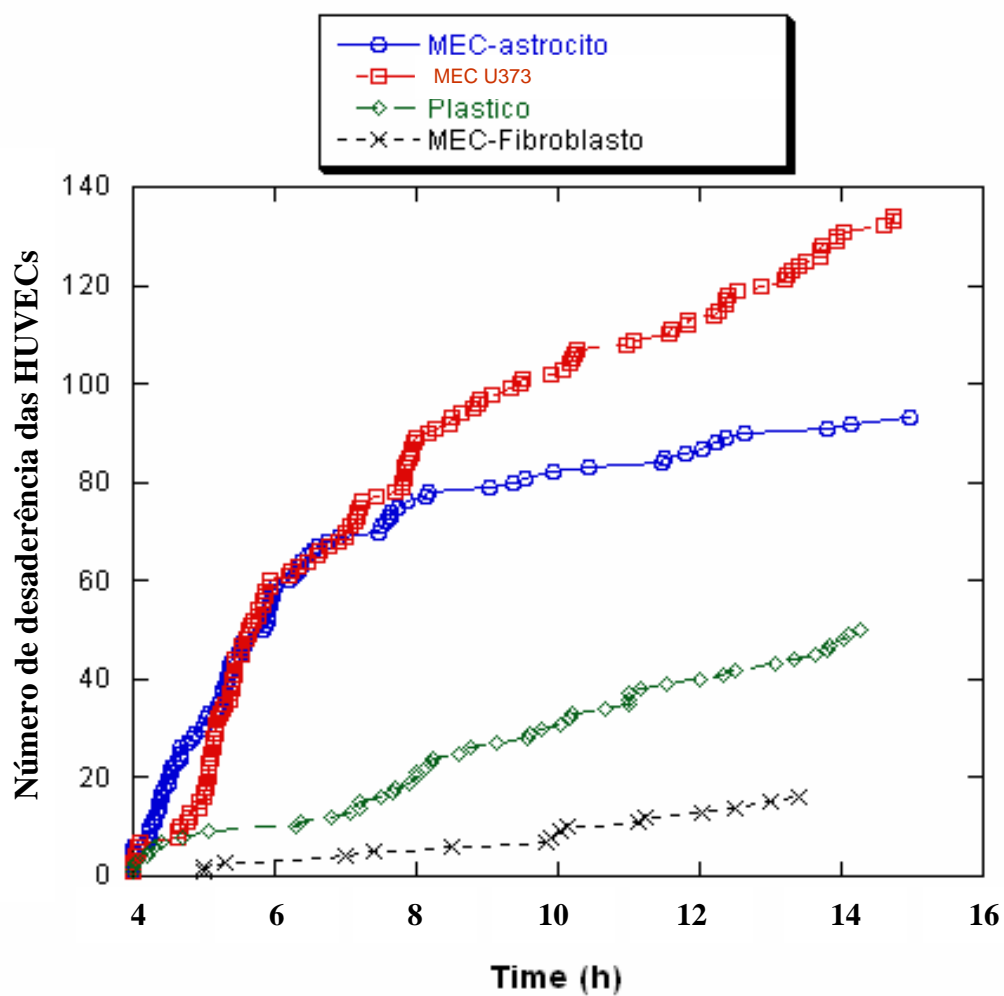


Figura 3. Quantificação em tempo real (videomicroscopia) da desaderência das células endoteliais sobre diferentes matrizes. As células foram mantidas a 37 °C e em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 11 horas e foi capturada uma imagem/minuto.

responsáveis por este evento, que de fato, causem *ativamente* a desaderência das HUVECs, em um processo que parece não decorrer unicamente de uma deficiência em componentes da matriz extracelular. A dinâmica de desaderência das HUVECs semeadas sobre matriz nativa de glioma U373 também pode ser observada na animação das imagens capturadas, registradas no CD-ROM em anexo a esta Tese.

4.3 - Células endoteliais cultivadas sobre a matriz extracelular (MEC) de glioma morrem por apoptose.

Através da coloração citoquímica (método do Panótico), pudemos também avaliar se as características morfológicas celulares consideradas clássicas na apoptose eram observadas em nosso modelo de adesão endotelial sobre matriz tumoral (**Figura 4A**). Observamos diminuição do volume celular, fragmentação nuclear e corpos apoptóticos (núcleos fragmentados envoltos por membrana que formam pequenas vesículas liberadas e eventualmente fagocitadas por células vizinhas). Estas alterações correspondem ao padrão apoptótico clássico e foi observado sobretudo nas HUVECs cultivadas sobre a MEC da linhagem de glioma U373.

A fim de quantificar a apoptose, marcamos com DAPI os núcleos das HUVECs que ainda estavam aderidas após 24h sobre as diferentes matrizes. Conforme mostram as **Figura 4A e C**, os núcleos picnóticos (ou apoptóticos) das células endoteliais são muito distintos dos núcleos intactos, sendo os primeiros mais condensados, menores, brilhantes (**Figura 4C**) e muitas vezes fragmentados (corpos apoptóticos). A quantificação foi feita por captura de 10 imagens aleatórias para cada condição e nos mostra que a apoptose endotelial é similar nas MECs de glioma e de astrócitos normais, conforme mostra o gráfico na **Figura 4B**. Entretanto, a apoptose foi significativamente menor nas HUVECs cultivadas sobre MEC de fibroblastos FGH. A apoptose endotelial foi significativamente maior nas HUVECs cultivadas em ausência de matriz (lamínula de vidro pura – ou seja, não coberta por fatores de adesão).

No intuito de concentrar evidências para confirmar a apoptose endotelial por desaderência, causada pela matriz de glioma U373 ao longo de 24h de cultivo, incubamos as HUVECs com Anexina V-FITC (AV) e iodeto de propídeo (PI) após 24 horas de contato

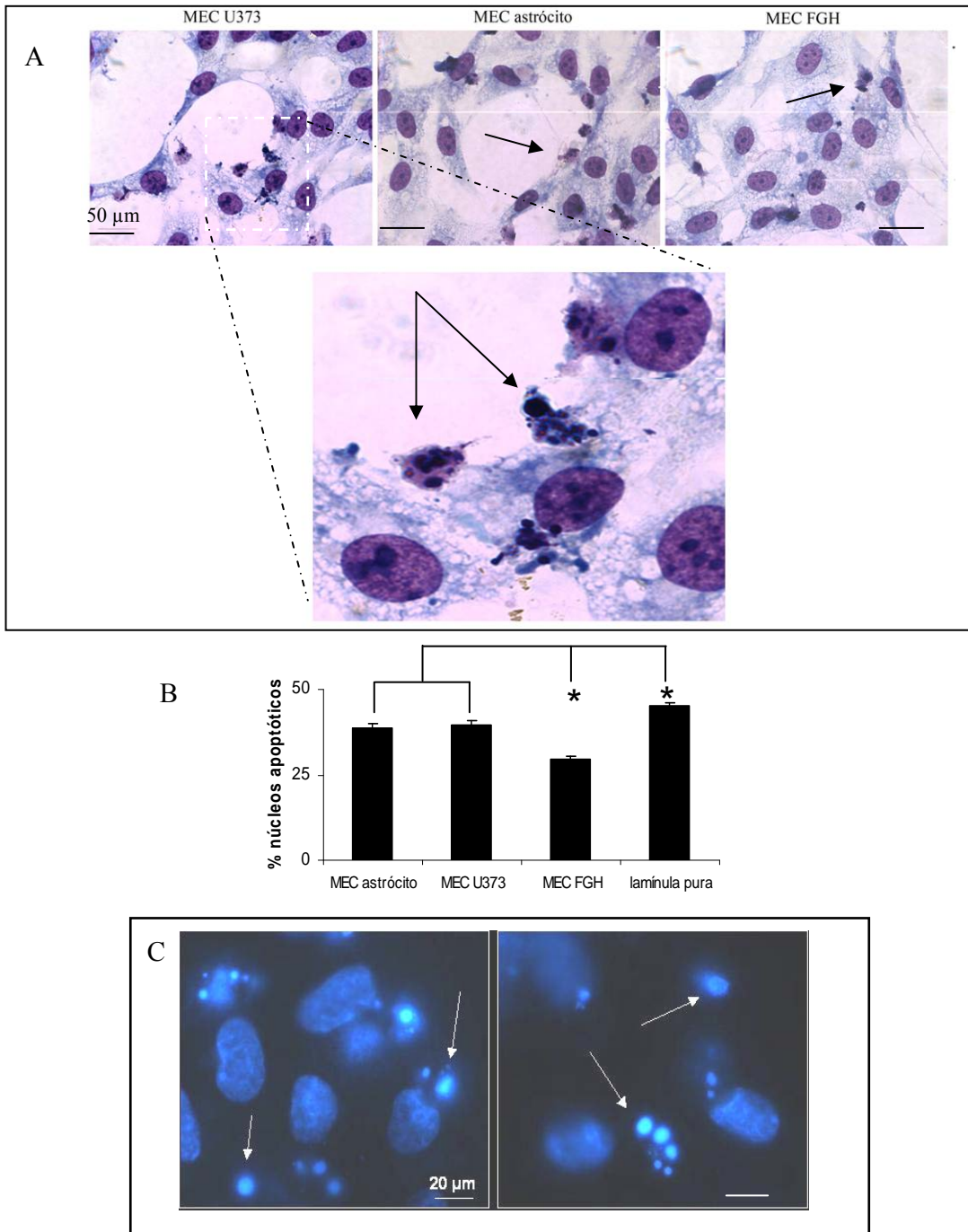


Figura 4. Quantificação das células endoteliais em apoptose sobre as diferentes matrizes. HUVECs ($10^4/\text{cm}^2$) foram semeadas sobre matrizes imobilizadas e mantidas por 24 horas. As células aderidas e suas características morfológicas/nucleares foram observadas e quantificadas por diferentes métodos. (A) Morfologia clássica apoptótica das HUVECs por coloração pelo método Panótico, evidenciando a condensação/fragmentação de cromatina, citoplasma reduzido e corpos apoptóticos (setas). (B) quantificação de núcleos picnóticos visualizados pela marcação com DAPI, segundo descrito em Métodos. (C) núcleos endoteliais picnóticos, visualizados por microscopia de fluorescência. A análise estatística do gráfico feita pelo ANOVA, Tukey's Multiple comparison; * indica $p < 0,05$. Média de três experimentos independentes. MEC = *matriz extracelular*.

com as matrizes e submetemos as amostras à citometria de fluxo (FACs), conforme mostra a **Figura 5**.

A AV é uma proteína que tem alta afinidade por fosfatidil-serina, um fosfolípido normalmente encontrado no folheto citoplasmático da bicamada de lipídios da membrana plasmática (van Genderen *et al.*, 2006). Nas etapas precoces da apoptose, ocorre a inversão desta distribuição, passando a fosfatidil-serina a ser detectada também no folheto externo da bicamada. A ligação da AV com a fosfatidil-serina é reversível e dependente de cálcio. O PI é um intercalante de DNA e marca as células que estão com a seletividade/integridade da bicamada lipídica já comprometida.

A dupla marcação para anexina V-FITC e PI pode nos dizer qual a população que está viável (AV-/PI-, quadrante esquerdo inferior), em apoptose inicial (AV+/PI-, quadrante direito inferior) e em apoptose tardia ou necrose (AV+/PI+, quadrante direito superior). Os eixos X mostram as leituras nos canais FL1 (AV-FITC) e os eixos Y as leituras nos canais FL2 (PI).

Em três experimentos independentes (a **Figura 5A** representa um experimento) a porcentagem de células apoptóticas (AV+/PI- e AV+/PI+) foi sempre maior na população das HUVECs sobre a MEC de glioma U373. Neste experimento representado na **Figura 5A**, mais de 80% da população endotelial entrou em apoptose quando em contato com a MEC de U373; cerca de 50% em ausência de matriz (plástico); cerca de 40%, sobre MEC de astrócitos; e cerca de 30% sobre MEC de FGH. Utilizamos células endoteliais em presença de peróxido de hidrogênio (50 mM H₂O₂) como um controle positivo de apoptose endotelial e interno do experimento.

O método de marcação com AV/PI não distingue apoptose tardia de necrose. Neste último tipo de morte, as células também perdem a seletividade de membrana e a AV pode entrar nas células necróticas, dando um resultado de apoptose falso. Assim, a fim de confirmarmos que as HUVECs sobre as MECs morriam por apoptose e não necrose, diminuimos o tempo de incubação de 24 horas para 18 horas para ver se a maioria da população se encontrava no quadrante AV+/PI- (o PI negativo indica que a membrana da célula endotelial ainda está intacta e a marcação positiva para AV, que a fosfatidilserina está exposta).

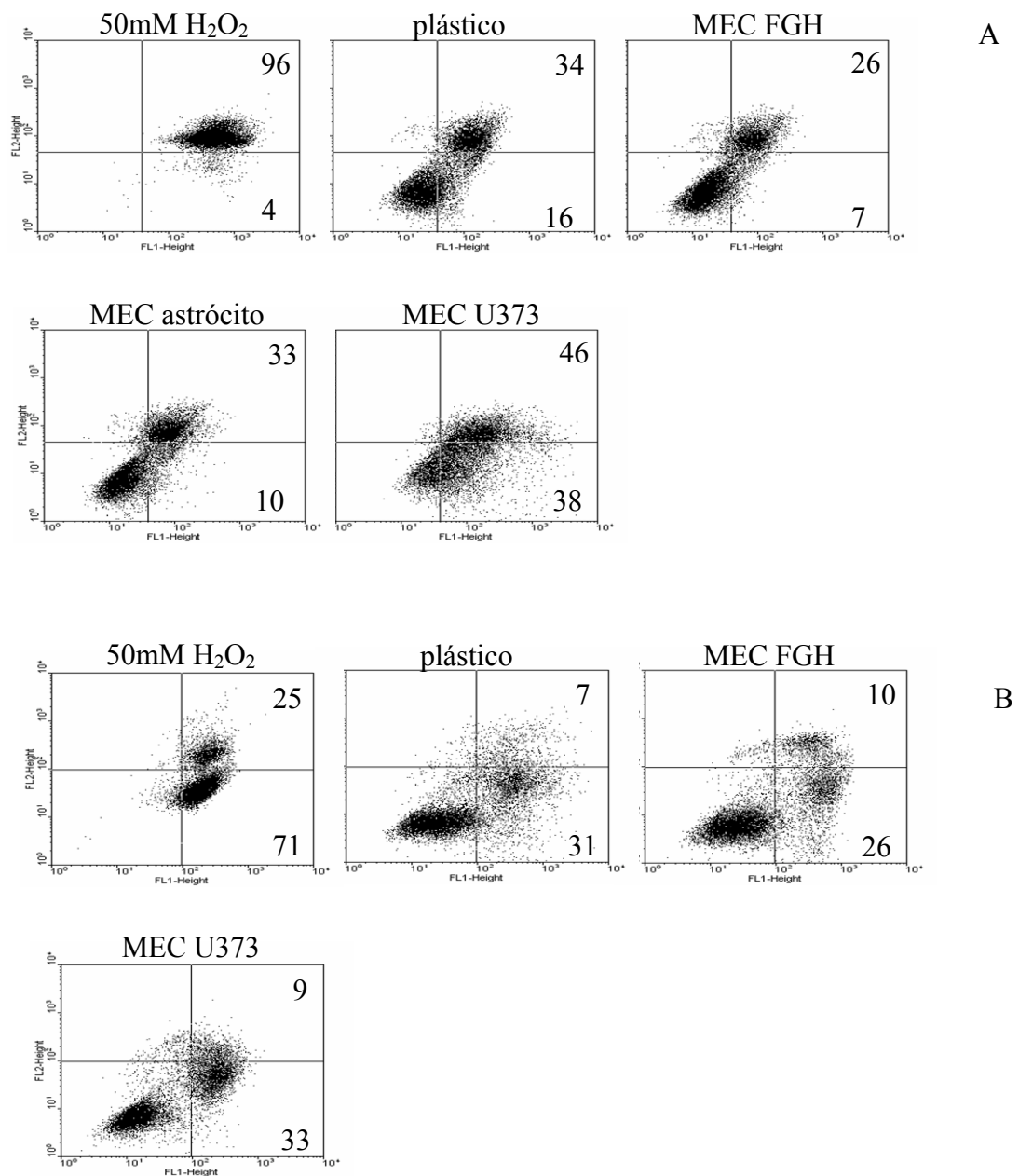


Figura 5. HUVECs morrem por apoptose mais acentuadamente por desaderência de matrizes de glioma. Marcação de anexina V-FITC e PI em HUVECs após 24 h (A) e 18 h (B) de cultivo sobre diferentes MECs. HUVECs ($10^6/25 \text{ cm}^2$) foram semeadas sobre MECs immobilizadas. As células em suspensão e aderidas foram recolhidas e incubadas com anexina V-FITC (eixo X) e iodeto de propídeo (eixo Y) por 15 minutos a temperatura ambiente. Análises de 10.000 eventos por amostra foram feitos por citometria de fluxo. Os números nos quadrantes representam a porcentagem de células em apoptose inicial, AV+/PI- (inferior) e apoptose tardia, A+/PI+ (superior).

Conforme mostra a **Figura 5B**, a maioria da população está positiva apenas para AV e ainda não perdeu a seletividade de membrana. Pode-se notar um padrão gradual de incorporação de PI, onde a população “transita” aos poucos para o quadrante da dupla marcação AV+/PI+.

O meio condicionado (MC) de 24 h de gliomas ou de astrócitos não reverte o efeito desaderente e apoptótico induzido pela MEC de glioma visto que as células endoteliais ainda morrem quando cultivadas sobre tais MECs e em presença dos respectivos MCs (**Figura 6**).

A apoptose endotelial poderia ser um evento particular à MEC da linhagem de glioma humano U373 e não de matrizes de gliomas em geral. Assim, cultivamos as HUVECs sobre matrizes imobilizadas de outras linhagens de glioma humano disponíveis em nosso laboratório, e também sobre matrizes de glioma de rato (C6) e de gliosarcoma de rato (9L). A desaderência após 24 horas foi sempre maior nas células endoteliais cultivadas sobre os substratos matriciais das linhagens de glioma (**Figura 7**). A marcação de AV/PI também confirmou apoptose das HUVECs cultivadas sobre estas matrizes tumorais (**Figura 8A**). Cerca de 40% a 50% da população endotelial morre por apoptose sobre MEC de GBM0202 e de GBM95, respectivamente. O glioma de rato induziu descolamento/apoptose muito semelhante aos gliomas humanos. Na Figura 8A, representamos um experimento, mas o mesmo foi repetido três vezes, com resultados comparáveis. E em todos eles, a morte endotelial sobre a MEC de glioma foi muito mais pronunciada.

Ao cultivarmos as células endoteliais sobre matrizes imobilizadas de outros tumores não-gliais, como linhagens de carcinoma mamário (MCF7) e carcinoma uterino (U79), vimos que as HUVECs entram em apoptose, pela marcação de AV/PI em análise por FACs, numa proporção muito semelhante às MECs de gliomas (Tabela da **Figura 8B**). Este resultado nos mostra que a apoptose endotelial não é um evento induzido exclusivamente por matrizes de gliomas e sim provavelmente mais amplo a outras matrizes tumorais.

4.4 - A apoptose endotelial também é induzida por contato célula-célula

4.4.1 - Células de glioma em cultura causam apoptose endotelial, em sistema de co-cultura

Realizamos ensaio de co-cultura entre as células endoteliais e as células de glioma, fibroblastos ou astrócitos, a fim de saber se o rompimento (lise) das células tumorais para obtenção

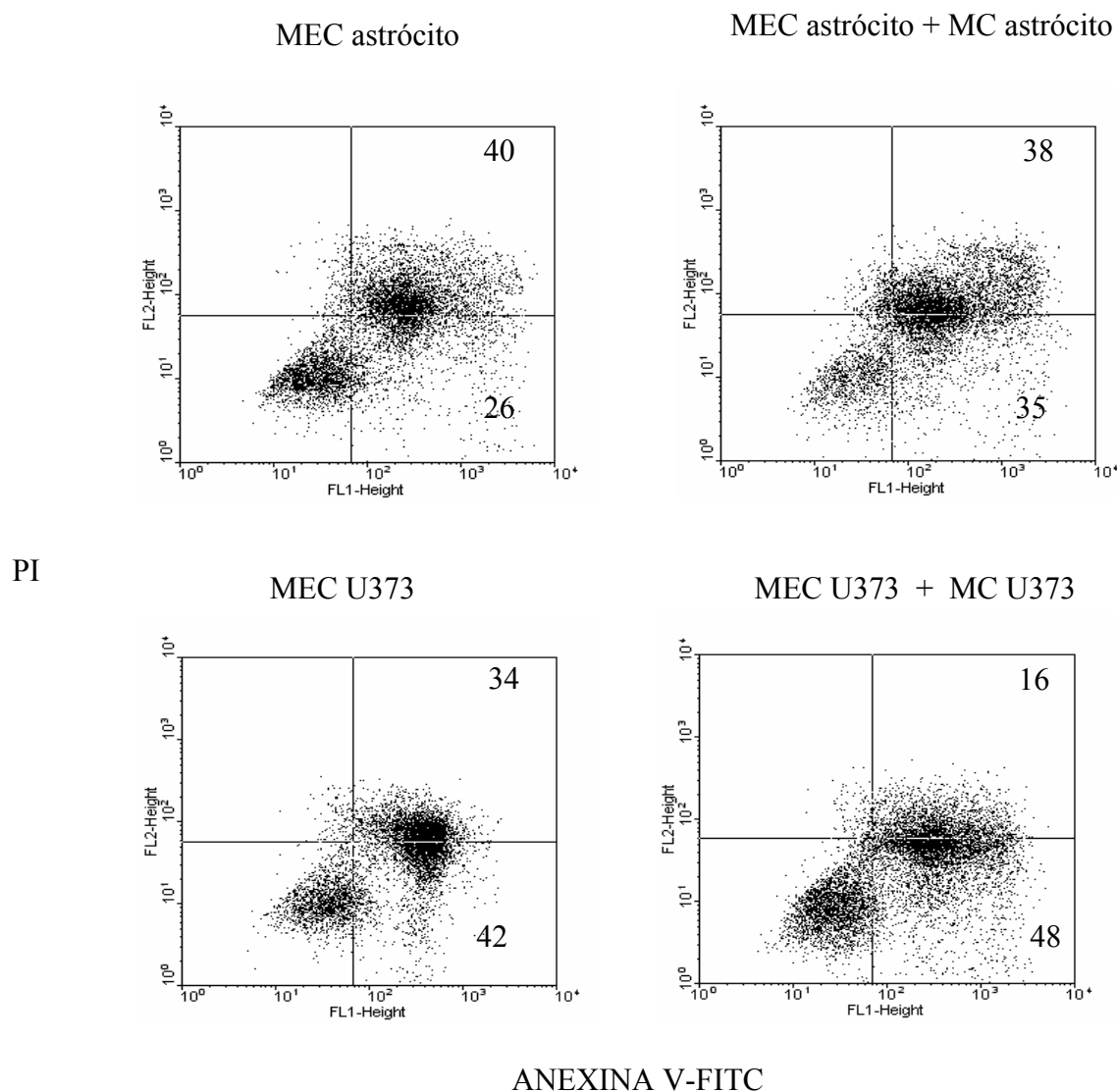


Figura 6. Meio condicionado (MC) de glioma ou de astrócitos normais não revertem o efeito de indução de apoptose causados pelas matrizes secretadas por estas células gliais. Marcação de anexina V-FITC e PI em HUVECs cultivadas 24 h sobre MEC de astrócito e de glioma e com seus respectivos MCs. HUVECs ($10^6/25 \text{ cm}^2$). As células em suspensão e aderidas foram recolhidas e incubadas com anexina V-FITC e iodeto de propídeo por 15 minutos a temperatura ambiente. Análises de 10.000 eventos por amostra foram analisados na citometria de fluxo. Os números nos quadrantes representam a porcentagem de células em apoptose inicial, A+/PI- (inferior) e tardia, A+/PI+ (superior). $n=3$, representação de um experimento.

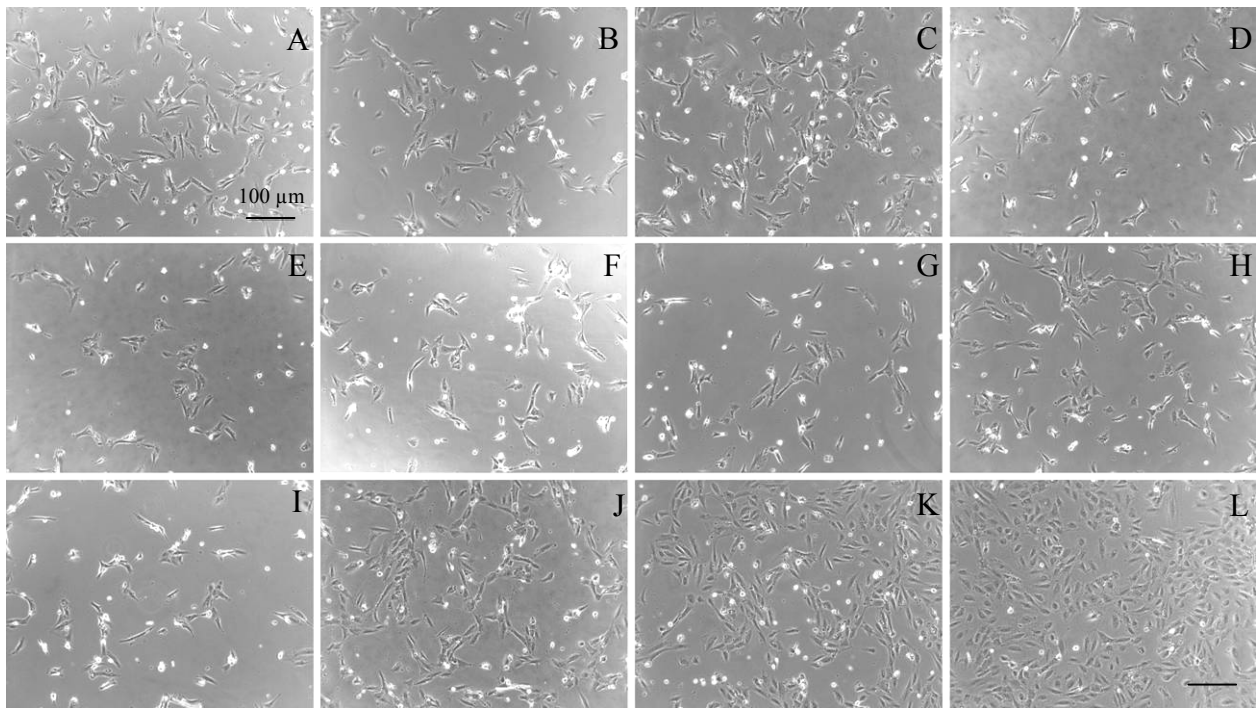
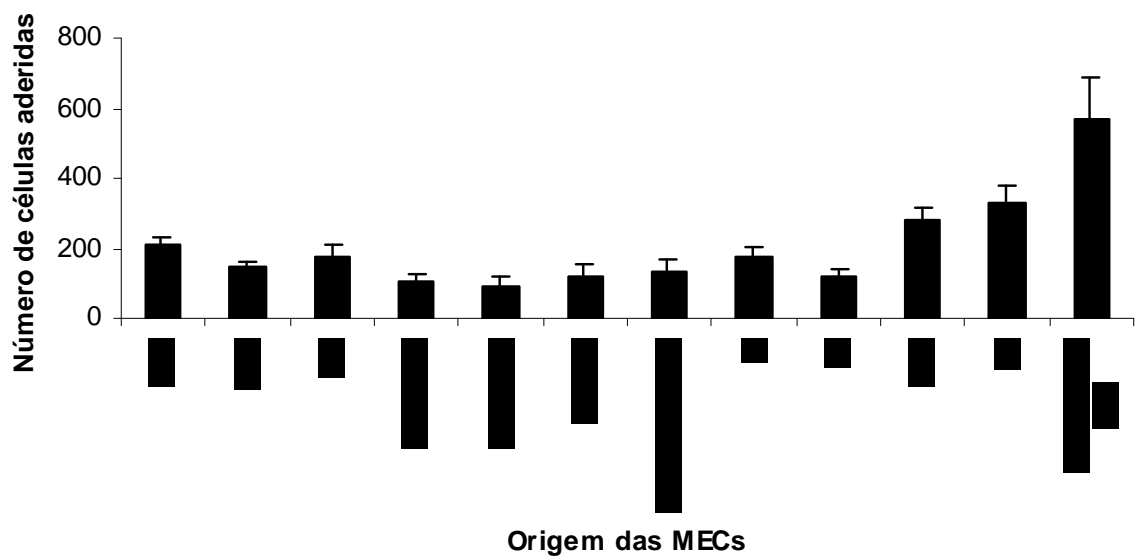


Figura 7. Desaderência das HUVECs das MECs de gliomas humanos em 24 h de cultura. HUVECs $10^4/\text{cm}^2$ células endoteliais células foram semeadas sobre MECs imobilizadas A FN ($5\mu\text{g}/\text{ml}$) foi imobilizada por 16-18 horas nos poços de cultura; Quantificação feita por contagem de células aderidas em dez imagens capturadas aleatoriamente para cada condição. As fotos representam o aspecto da monocamada endotelial após 24 h de cultivo sobre (A) MEC A172; (B) MEC U373; (C) MEC U87; (D) MEC GBM0302; (E) MEC GBM0202; (F) MEC GBM95; (G) MEC astrocitoma 0201; (H) MEC 9L; (I) MEC C6; (J) MEC FGH; (K) FN e (L) gelatina + 10% SFB.

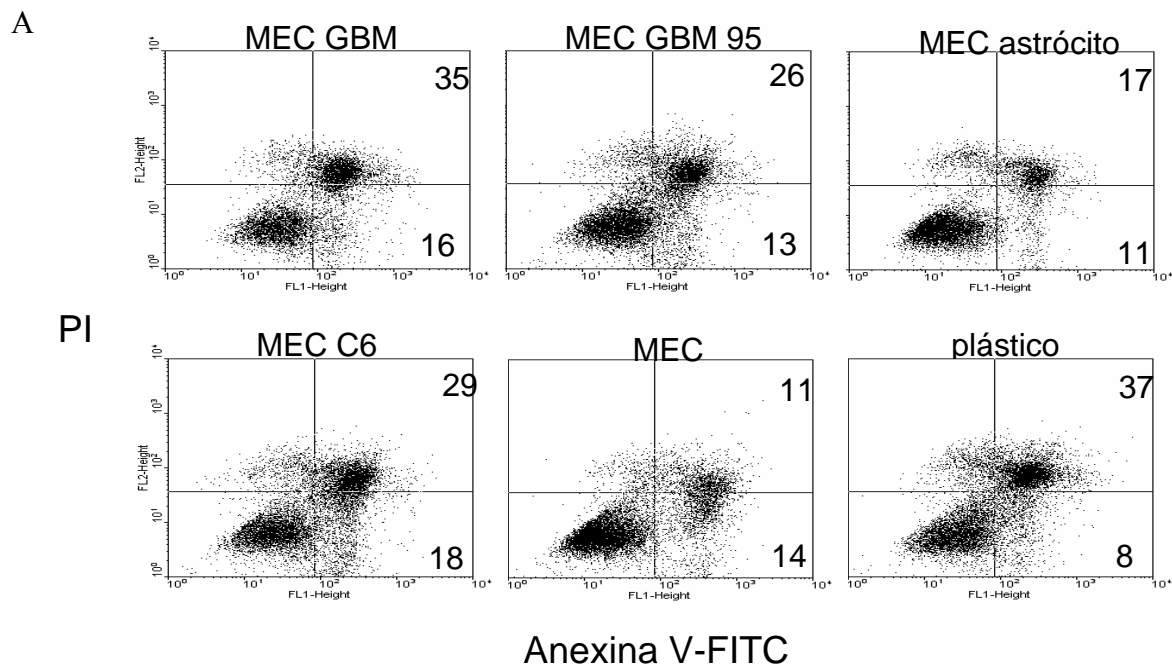
de matrizes nativas estaria comprometendo o arranjo/composição da matriz extracelular tumoral resultante e, por isso, acarretando na morte das HUVECs. Para essa averiguação, optamos pelo método TUNEL. Este ensaio foi realizado com as HUVECs cultivadas 24h sobre as MECs imobilizadas, comparando-se com HUVECs cultivadas sobre células vivas (astrócitos normais de rato, fibroblasto FGH e gliomas: U373, A172, U87, GBM95 e GBM0202). A **Figura 9** mostra que praticamente não há diferenças pelo método TUNEL na morte das HUVECs se o tapete sob o endotélio é apenas a matriz ou a célula viva e indica que o modelo de obtenção de matriz por nós adotado não altera a arquitetura/composição matricial. Este experimento foi feito duas vezes e está aqui representado um deles.

4.4.2 - Explantes de gliomas em co-cultura causam desaderência de células endoteliais

Um outro tipo de co-cultura adotado foi o uso de explantes de gliomas humanos de diferentes tipos, sobre monocamada confluenta de HUVECs (**Figuras 10 a 15**). A desaderência das células endoteliais peritumorais indica de que o contato direto com o tumor leva à *anoikis*.

A **Figura 11** mostra a diferenciação tubulogênica de células endoteliais em gel de fibrina contendo explante de GBM humano. Mais uma vez vê-se que após 24 horas de cultivo, as células endoteliais próximas ao tumor desaparecem. O explante pode conter milhões/bilhões de células tumorais, entretanto a sua colocação sobre a cultura endotelial não causa nenhum dano mecânico às monocamada, como mostra a **Figura 12**.

Outros tipos de gliomas, como o oligodendroglioma, também induziram morte endotelial e diferenciação angiogênica nas células mais distantes ao tumor (**Figura 13**). Este resultado poderia indicar que seria o contato direto da matriz tumoral que induziria *anoikis* nas HUVECs. Contudo, fatores solúveis secretados pelo explante poderiam agir nas células endoteliais mais distantes do explante, induzindo diferenciação angiogênica. Este ensaio foi mantido por até 48 horas e vimos que somente uma parte da população endotelial desadere (**Figura 14**). A desaderência endotelial causada pelo explante de oligodendroglioma pode sugerir que outros tipos de tumores gliais também utilizam os mesmos mecanismos na interação com o endotélio. O explante não causou qualquer alteração visível na monocamada de fibroblastos humanos sugerindo uma especificidade celular nesta desaderência/morte das HUVECs em até 72 horas (**Figura 15**).



B

	MEC GBM0202	MEC GBM95	MEC U87	MEC MCF7	MEC U79
% apoptose endotelial (A+PI) + (A+PI+)	43,02	46,23	39,47	41,69	43,56

Figura 8. Marcação de anexina V-FITC e iodeto de propídeo em HUVECs após 24 h de cultivo sobre MECs de outros tipos de glioma e de outros tumores não gliais. HUVECs ($10^6/25 \text{ cm}^2$) foram semeadas sobre MECs imobilizadas. As células em suspensão e aderidas foram recolhidas e incubadas com anexina V-FITC e iodeto de propídeo por 15 minutos a temperatura ambiente. Análises de 10.000 eventos por amostra foram analisados na citometria de fluxo. (A) Os números nos quadrantes representam a porcentagem de células em apoptose inicial, A+/PI- (inferior) e tardia, A+/PI+ (superior). A MEC de gliomas induz mais apoptose endotelial; (B) A tabela representa a soma das porcentagens de HUVECs A+/PI- e A+/PI+ em relação a outras MECs de tumores não gliais (vermelho): MCF7: carcinoma mamário humano; U79: carcinoma uterino humano; C6: glioma de rato; GBM0202 e GBM95, U87: linhagens de glioblastoma. A e B representam experimentos separados.

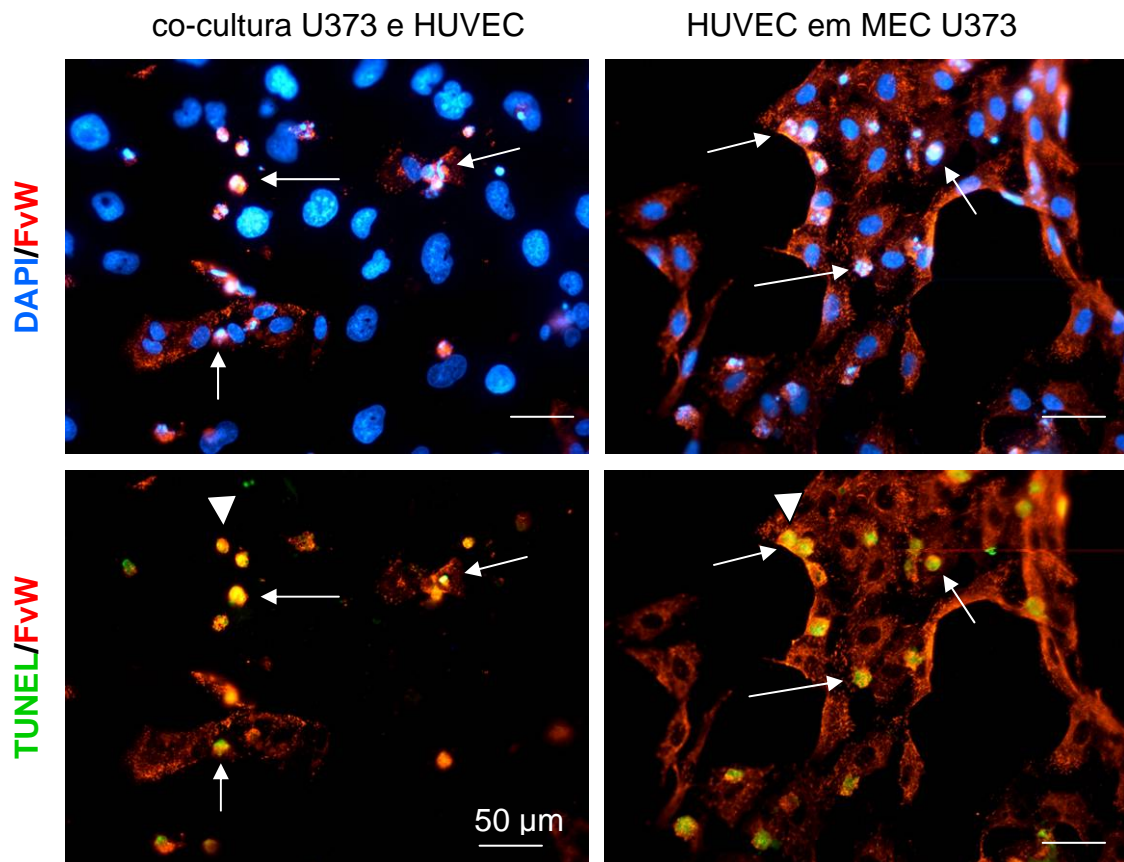


Figura 9. As HUVECs entram em apoptose em contato direto com MECs imobilizadas livre de células ou em contato direto com células de glioma (co-cultura). $10^5/\text{cm}^2$ células endoteliais foram plaqueadas sobre MEC imobilizada ou sobre monocamada semi-confluyente de gliomas por 24 horas. Os núcleos apoptóticos foram vistos pela marcação por DAPI e pela técnica TUNEL e alguns exemplos deles estão indicados por setas. Em paralelo usamos o anticorpo contra o marcador endotelial fator von Willebrand (fvW) a fim de identificar as células endoteliais (células marcados em vermelho). As cabeças de setas exemplificam alguns dos núcleos em amarelo que são as células endoteliais apoptóticas duplamente marcadas para fvW (vermelho) e TUNEL (verde).

4.5 - Investigação dos componentes matriciais das células envolvidas no modelo de interação com as HUVECs por ELISA indireto.

A fim de conhecermos melhor a composição qualitativa da MEC dos gliomas, fizemos ELISAs indiretos sobre as matrizes secretadas pelas células em estudo. Inicialmente, trabalhamos com o fibroblasto FGH, U373 e as HUVECs, investigando se as suas matrizes continham colágeno tipo IV, colágeno tipo I, colágeno tipo VI, laminina (LN), trombospondina-1 (TSP-1), fibronectina (FN) e tenascina (TN) incorporados (**Figura 16**). A MEC de U373 tem baixa incorporação de colágenos tipo I, IV e VI. E contém laminina incorporada de maneira muito similar às MECs adesivas porém possui, comparativamente às matrizes do fibroblasto e das próprias HUVECs, pouquíssima quantidade de FN e alta quantidade de TN. A linhagem de fibroblasto incorpora grandes quantidades de colágenos tipo I, IV e VI, LN, FN, TSP-1 e TN. A MEC de HUVECs apresentou alta incorporação de LN, TSP-1, FN e colágeno tipo IV, baixa incorporação de colágeno I e VI e nenhuma incorporação de TN.

Além da TN, a TSP-1 também é classificada como uma proteína matricelular (portanto, de caráter desadesivo), porém parece que a sua incorporação é alta e bastante comparável à da matriz de fibroblastos e HUVECs. Contudo, a TN não foi vista em matrizes de HUVECs, o que nos sugeriu ser esta a glicoproteína matricelular que se contrabalança à FN causando o efeito de *anoikis* nas HUVECs (abordaremos esta questão na seção Discussão).

Considerando que a FN é um fator importantíssimo para a adesão endotelial e que a matriz de HUVECs é totalmente desprovida de TN, a qual está presente em quantidades consideráveis na matriz da linhagem U373, decidimos estabelecer um método que permitisse uma análise semi-quantitativa destes dois componentes matriciais nas matrizes nativas estudadas. Os valores de absorbância obtidos para as matrizes nativas imobilizadas foram convertidos em unidades arbitrárias, conforme descrito na seção de Métodos, para ambas as proteínas (FN e TN), de forma que uma análise comparativa de teores pudesse ser estabelecida para cada matriz estudada. Apenas os pontos pertencentes à porção linear da curva [*proteína para imobilização*] X *absorbância* foram utilizados para construção da curva-padrão. Para a FN, o ponto mínimo desta porção linear foi obtido após sensibilização dos poços com a concentração de 0,052 µg/ml (considerado com 1 unidade arbitrária de FN imobilizada), enquanto o máximo foi observado com 0,826 µg/ml (ou 16 unidades arbitrárias) (**Figura 17**). Para a TN, os valores considerados foram de 1,25 µg/ml (gerando

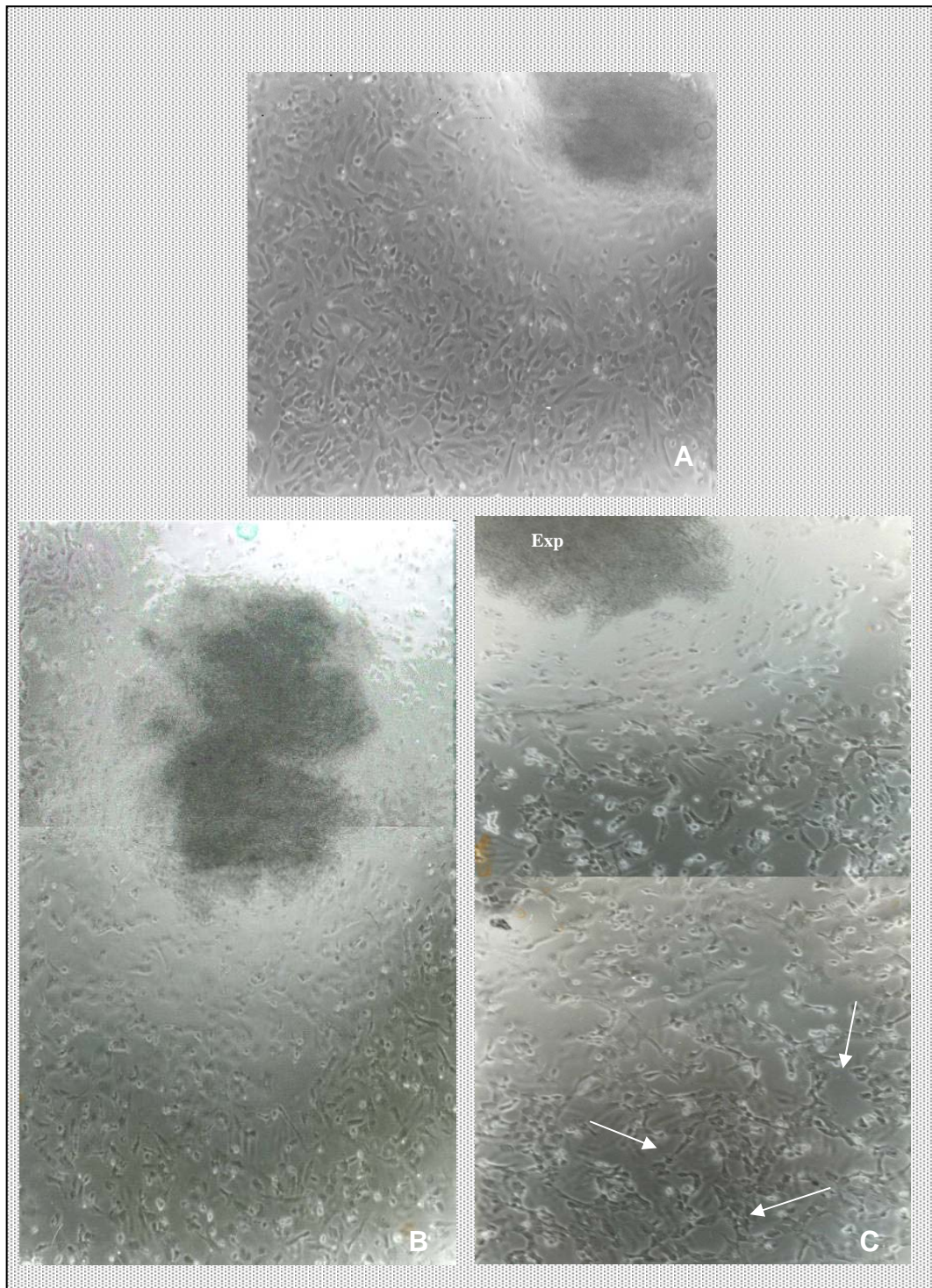


Figura 10. Explantes de GBM humano induzem *anoikis* das células endoteliais próximas e diferenciação indicativa de tubulogênese nas células mais distantes ao tumor. O fragmento tumoral foi repousado sobre monocamada endotelial confluyente por 24 horas. (A) 0h; (B) 6h e (C) 24h. Exp: explante de GBM. As setas indicam a área de diferenciação da monocamada das HUVECs distantes ao tumor.

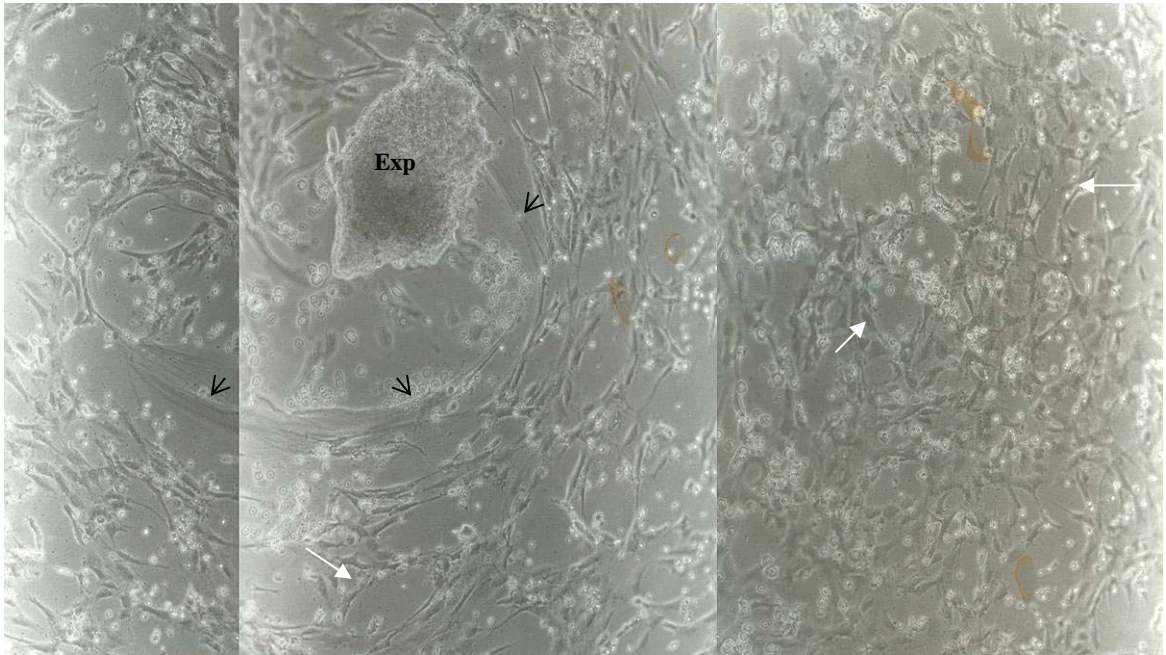
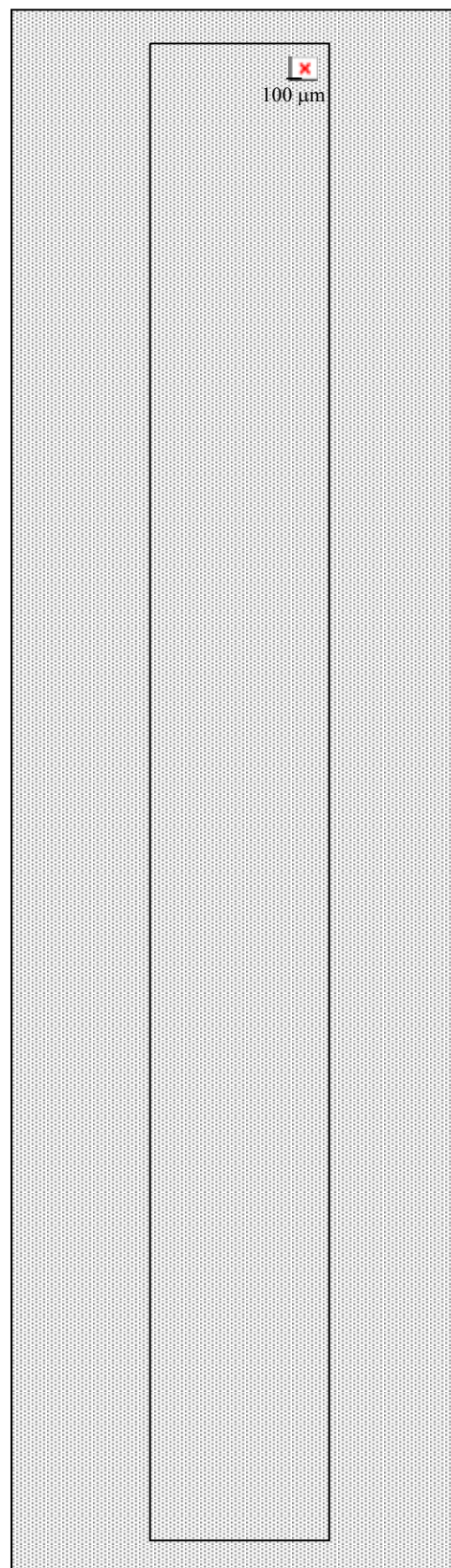


Figura 11. Explante embebido em gel de fibrina induz diferenciação tubulogênica das HUVECs mais distais ao fragmento e parece induzir anoikis das células endoteliais proximais. 20×10^4 células foram semeadas sobre gel de fibrina contendo um explante de GBM humano e mantidas por 24 horas. As setas pretas indicam a área próxima ao tumor que não contém células endoteliais por possível indução de anoikis, e as setas brancas, as áreas de diferenciação angiogênica. Exp: explante de GBM

Figura 12. O repouso do explante de oligodendrogloma não danifica o tapete celular endotelial. Explantes dissecados foram repousados sobre monocamada endotelial confluyente. Imagens capturadas após 1 hora da co-cultura. Montagem das fotos feita no programa Adobe Photoshop (ferramenta Photomerge).



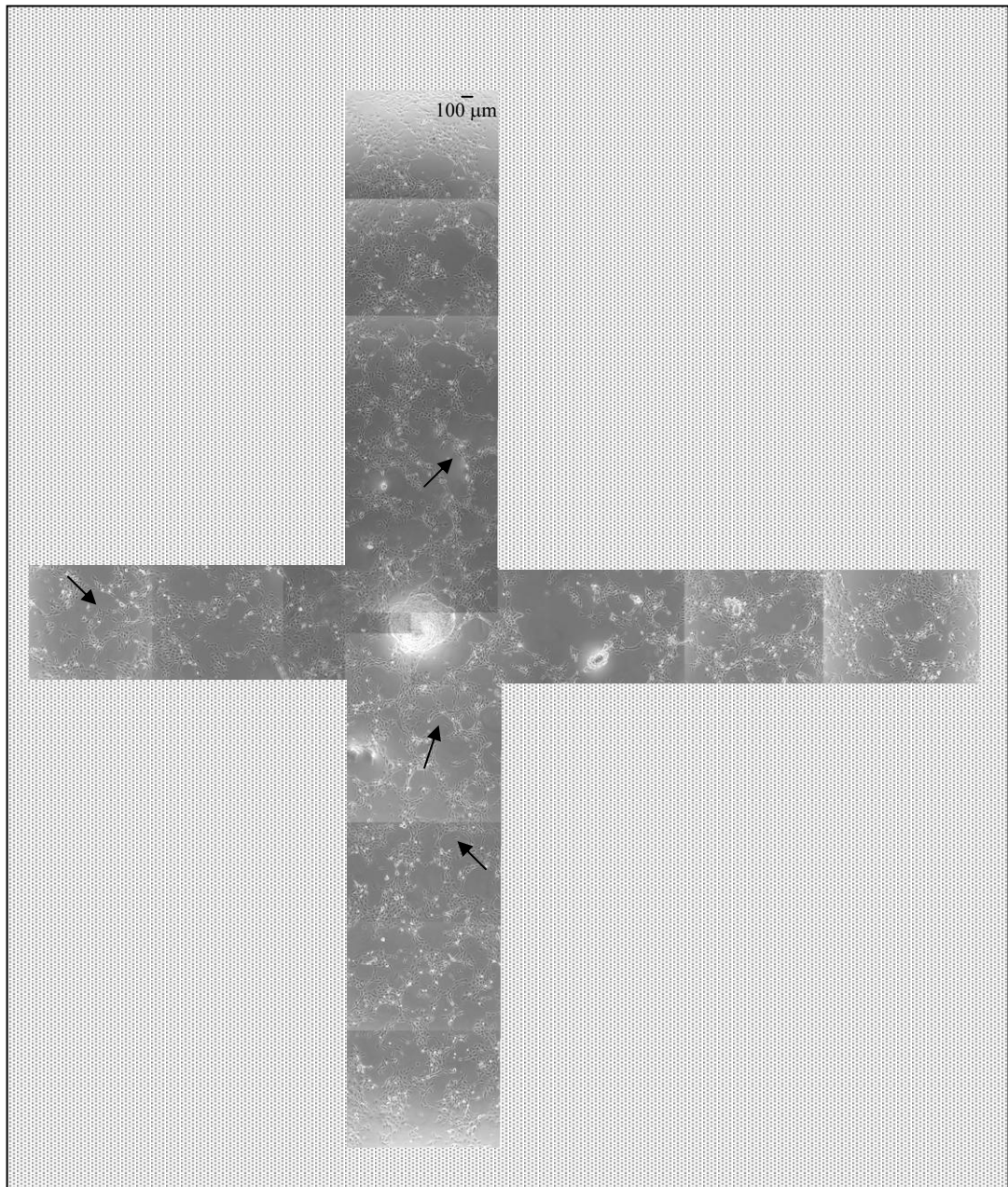


Figura 13. Explante de oligodendroglioma induz anoikis endotelial de HUVECS próximas e diferenciação angiogênica das HUVECS distais ao explante tumoral. Explantes dissecados foram repousados sobre monocamada endotelial confluyente e mantidos. Imagens capturadas após 24 horas da co-cultura. As setas indicam a área de diferenciação da monocamada endotelial. Montagem das fotos feita no programa Adobe Photoshop (ferramenta Photomerge).

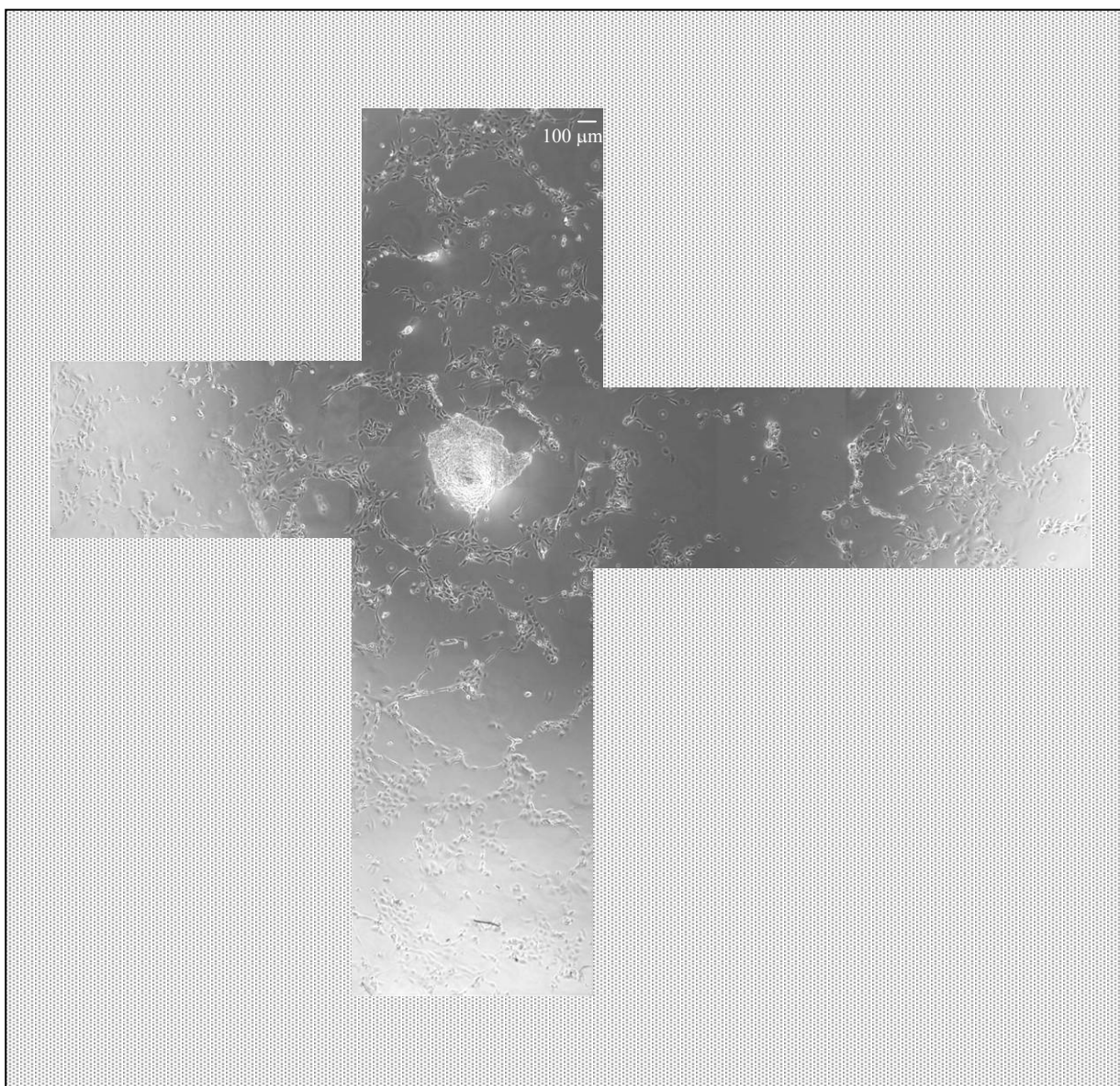


Figura 14. Explante de oligodendrogloma acentua a *anoikis* de HUVECS próximas ao tumor após 48 horas de cultivo. Explantes dissecados foram repousados sobre monocamada endotelial confluyente e mantidos. Imagens capturadas após 48 horas da co-cultura. Montagem das fotos feita no programa Adobe Photoshop (ferramenta Photomerge).

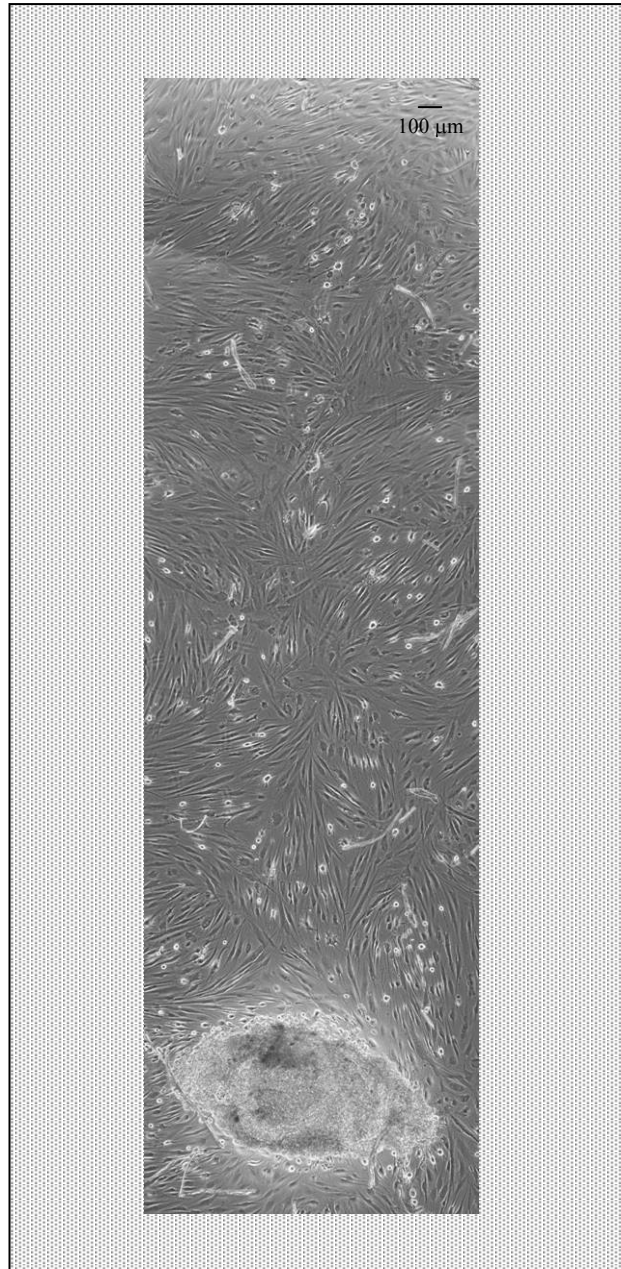


Figura 15. Explante do mesmo oligodendrogloma humano não causa anoikis na monocamada de fibroblastos FGH. Explantes dissecados foram repousados sobre monocamada confluyente de fibroblastos e mantidos. Imagens capturadas após 72 horas da cocultura. Montagem das fotos feita no programa Adobe Photoshop (ferramenta Photomerge).

uma quantidade de proteína imobilizada considerada com 1 unidade arbitrária) e 10 µg/ml (ou 8 unidades arbitrárias).

Conforme já evidenciado na **Figura 16**, dos componentes matriciais analisados, a TN foi o único ausente nas matrizes endoteliais. Diante de diferenças tão importantes no conteúdo de TN e de diferenças significativamente menores no conteúdo de FN, na matriz da linhagem de glioma U373 em comparação às matrizes de células FGH e de HUVECs, resolvemos estudar um pouco mais nos outros gliomas a distribuição relativa destas duas glicoproteínas matriciais. Assim, conforme podemos observar na **Tabela 4**, as matrizes secretadas por gliomas contém baixas concentrações de FN, sendo o GBM95 o glioma que mais incorpora esta proteína adesiva na matriz, com $0,4 \pm 0,07$ U.A. A incorporação de TN apresentou U.A. = $1,1 \pm 0,035$. Assim, a incorporação da proteína matricelular TN nesta matriz parece predominar quantitativamente sobre a incorporação da proteína adesiva FN.

As demais linhagens de glioma incorporam níveis muito baixos de FN em suas matrizes e maiores níveis de TN, conforme indica a Tabela 5. A linhagem de glioma humano U373 apresentou a menor incorporação de FN ($0,03 \pm 0,001$ U.A.) e exibiu o mais alto valor entre os gliomas para a incorporação de TN em sua matriz ($2,82 \pm 0,02$ U.A.). A TN não foi detectável na MEC de HUVECs, enquanto o valor obtido para a FN foi de $0,56 \pm 0,001$ U.A.

Estes dados sugerem que um balanço apropriado de TN/FN poderia estar envolvido na *anoikis* induzida por matrizes de tumores. Esta possibilidade é corroborada pelos valores observados nas MECs de fibroblasto de gengiva FGH. Esta linhagem possui os maiores índices de TN, com $4,41 \pm 0,36$ U.A. No entanto, esta linhagem possui também os maiores níveis para a incorporação de FN, com $1,76 \pm 0,08$ U.A.

4.6 - Células endoteliais resistentes à *anoikis* induzida por matrizes tumorais possuem maior capacidade proliferativa

Diversos trabalhos sugerem que a apoptose endotelial, faz parte de um mecanismo de

D. O. 490 nm

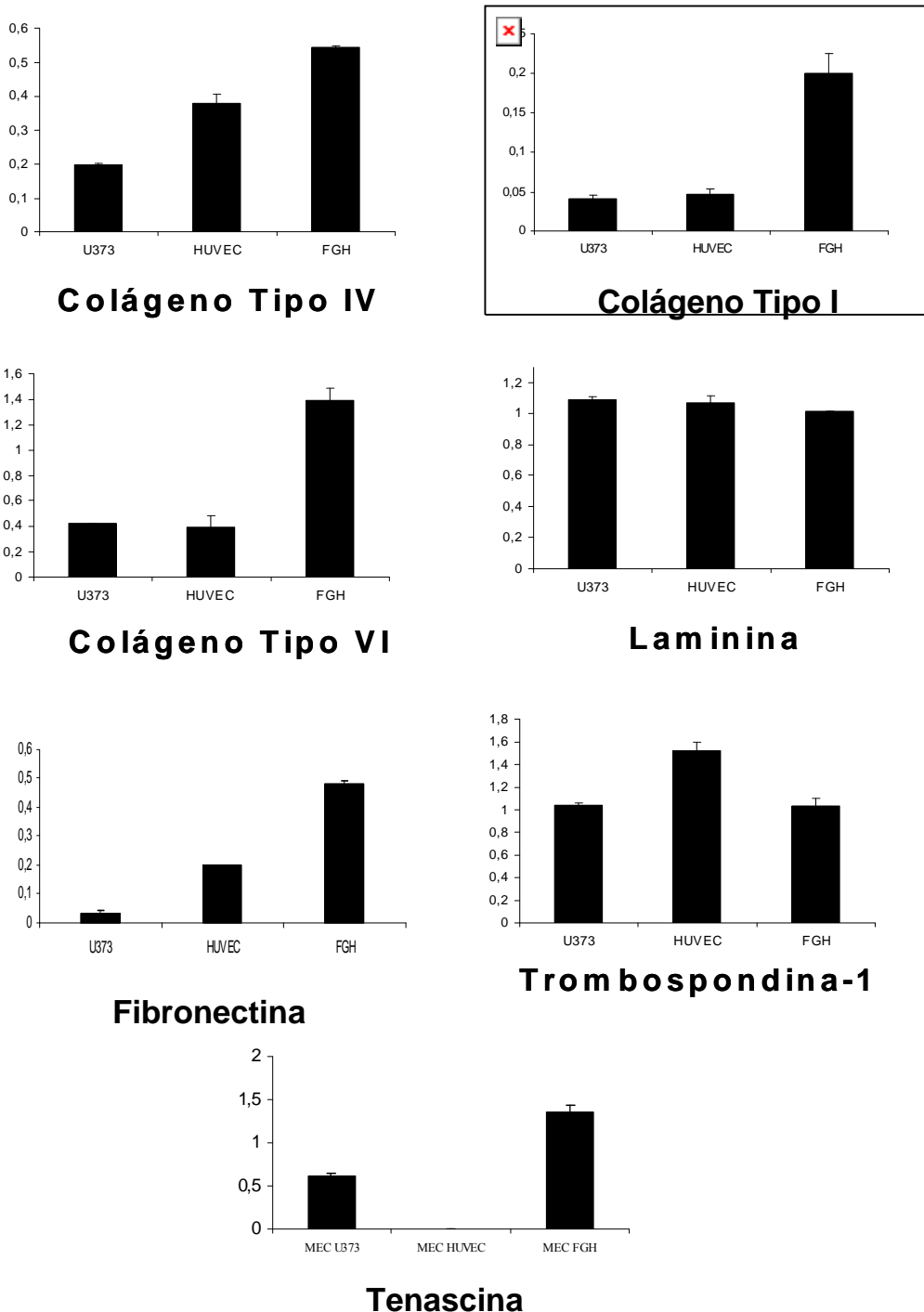


Figura 16. A linhagem de glioma humano U373 incorpora pouca quantidade de FN e alta quantidade de TN em sua matriz extracelular. Detecção qualitativa por ELISA indireto de proteínas matriciais na linhagem de glioma humano U373, linhagem de fibroblasto humano FGH e em células endoteliais primárias de veia umbilical humana (HUVECs). Os anticorpos primários contra as proteínas matriciais indicados nas legendas de cada gráfico foram incubados em PBS contendo tween 20 0,05% (ver Métodos) diretamente sobre as MECs imobilizadas obtidas por dissolução de monocamadas celulares com amoníaco/Triton X-100, em PBS contendo inibidores de proteases.

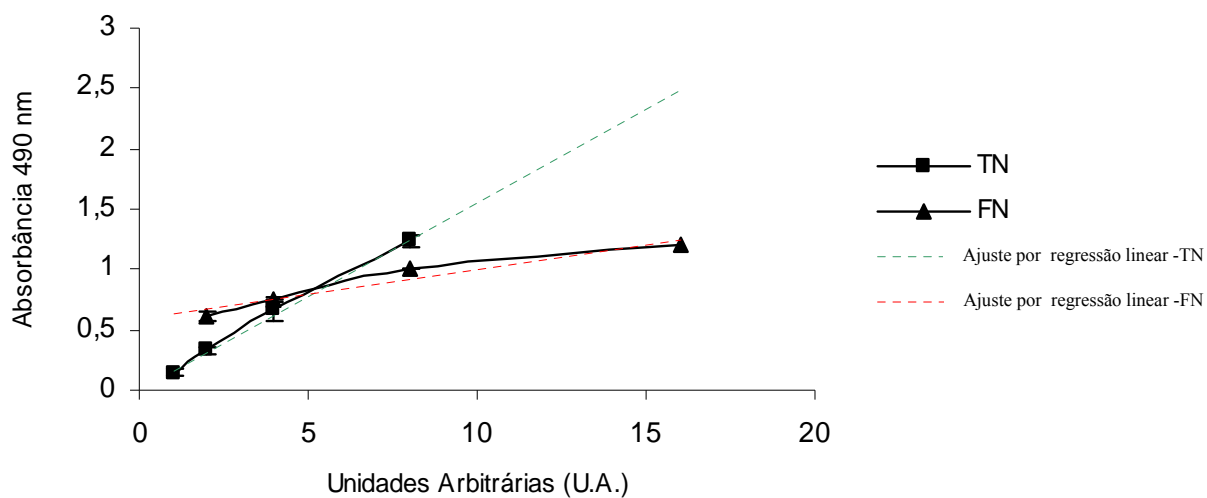


Figura 17. Padronização de um método semi-quantitativo para determinação do conteúdo de fibronectina e tenascina em matrizes nativas. Detecção semi-quantitativa de FN e TN por ELISA indireto de proteínas matriciais A menor concentração usada para sensibilizar os poços para a curva padrão de cada proteína e detectada pelo método para a curva-padrão foi considerado como unidade arbitrária (U.A.) = 1 (ver *Métodos e Resultados*). Os gráficos representam as curva-padrão para FN e TN (valores de absorbância a 490 nm).

remodelamento e está envolvida na formação de estruturas capilares portando uma arquitetura adequada (Meyer *et al.*, 1997). Considerando que nossos ensaios mostraram que uma proporção das células endoteliais em contato com matrizes de gliomas resistiam à *anoikis* observada, resolvemos estudar se havia diferenças no padrão proliferativo de HUVECs incubadas por 24 horas nas diversas matrizes estudadas.

A fim de averiguar se as células que ainda permaneciam aderidas após as 24 horas corresponderiam a células endoteliais mais proliferativas, realizamos dois ensaios de proliferação. No primeiro, recolhemos as células ainda aderidas após 24 horas sobre as matrizes e as transferimos para plástico em presença de 20% de SFB. Observamos que a incorporação de timidina em um pulso de 6 horas por HUVECs cultivadas em matrizes de gliomas foi seis vezes maior em comparação as HUVECs cultivadas em matriz de fibroblasto (**Figura 18A**). Este ensaio de proliferação de 24h por incorporação de timidina tritiada foi confirmado em outro experimento independente através da quantificação do número de células por incorporação de MTT (**Figura 18B**). Este ensaio foi feito em 72 horas e o MTT (1 mg/ml) foi incubado nas amostras e em uma curva-padrão de densidade celular nas últimas 4 horas finais do ensaio proliferativo.

4.7 - Células endoteliais resistentes à *anoikis* induzida por matrizes tumorais apresentam menor capacidade tubulogênica

Células endoteliais cultivadas sobre as matrizes também foram transferidas para cultivo sobre Matrigel[®], um ambiente tridimensional que favorece a tubulogênese endotelial. Neste ensaio, observamos que embora as HUVECs cultivadas em matriz de glioma U373 proliferem mais que as outras células endoteliais cultivadas sobre MECs mais adesivas (secretadas por FGH ou por HUVECs), as mesmas se mostraram deficientes na capacidade de originar estruturas tubulares *in vitro* (**Figura 19**).

A alta capacidade proliferativa e a pobre capacidade de diferenciação angiogênica das células endoteliais que restaram aderidas após 24 horas, quando cultivadas sobre a MEC de U373, são traços compatíveis com a elevada densidade vascular e com a formação de vasos mal organizados encontrados na massa tumoral de um glioma *in vivo*.

4.8 - O domínio EGF-like da tenascina não está envolvido na adesão inicial das células endoteliais sobre as MECs imobilizadas

Vimos na **Figura 2** que as HUVECs inicialmente aderem às matrizes de gliomas, sendo a desaderência um processo que apenas começa a ocorrer a partir de 4 horas de contato (**Figura 3**). No intuito de avaliar se a TN estaria envolvida no processo de adesão e na posterior desaderência endotelial, pré-incubamos as matrizes nativas com um anticorpo monoclonal anti-TN (dirigido contra o domínio N-terminal de homologia ao EGF) e cultivamos as HUVECs sobre tais substratos por 6 horas. Não vimos diferenças significativas na adesão endotelial em matrizes com a porção EGF-like bloqueada pelo anti-TN, ou pelo isotipo controle IgG1, em comparação à matriz não bloqueada com o anticorpo, o que indica que esta porção da proteína não estaria envolvida na adesão célula-matriz inicial das células endoteliais (**Figura 20**).

Como em outros experimentos previamente comentados, a desaderência endotelial das matrizes de glioma após 6 horas de contato foi significativamente maior, quando comparada às matrizes mais adesivas. No entanto, o anticorpo contra o domínio EGF-like da TN-C não influenciou esse descolamento.

4.9 - Células endoteliais sincronizadas na fase G0/G1 resistem mais à anoikis induzida pela matriz de glioma

Durante o crescimento do glioma acontece uma íntima associação das células tumorais ao redor dos vasos sanguíneos próxima à associação pericito-endotélio, o que chamamos também de co-optação das células de glioma pelos vasos nativos (Zagzag *et al.*, 2000). No organismo adulto normal, o endotélio encontra-se em estado quiescente ou repouso, apresentando baixo metabolismo e *turnover* lento, em até 7 anos (Risau, 1995). No entanto, sabe-se que a célula endotelial é sensível a sinais variáveis, segundo esteja em um estado quiescente, não proliferativo ou em um estado dito ativado, típico dos processos angiogênico e inflamatório (Risau, 1995).

A fim de saber se a indução da apoptose endotelial no curso da interação matriz tumoral-endotélio seria direcionada ao endotélio quiescente ou ativado, induzimos quiescência da monocamada endotelial por *sincronização* do ciclo celular em G0/G1 por privação de SFB por um período de 18-24 horas. As células que não tiveram o ciclo celular sincronizado, permaneceram por

igual período de tempo em presença de 20% de SFB (condições-padrão de cultura de HUVECs) e são chamadas por nós de **população heterogênea**.

Células endoteliais sincronizadas desaderem menos das MECs de glioma, quando comparadas à população heterogênea (**Figura 21**) e este efeito de manutenção da adesão parece, ainda, ser específico para as matrizes tumorais pois não vimos diferenças de desaderência na monocamada endotelial das matrizes autólogas e dos fibroblastos FGH.

4.10 - O domínio EGF-like da TN contribui para a baixa eficiência tubulogênica das células endoteliais causada pela matriz de glioma U373.

conforme mostramos na **Figura 19**, HUVECs que resistiram à *anoikis* induzida pelas MECs de U373 após 24 horas não possuem capacidade de formar corretamente estruturas tubulares em matrigel[®] *in vitro*. Fomos averiguar o papel do domínio EGF-like da porção N-terminal da TN na má formação de estruturas tubulares *in vitro*.

HUVECs semeadas sobre MEC de glioma U373, sem acesso à porção EGF-like da TN (pelo bloqueio com anticorpo), formam mais estruturas tubulares do que HUVECs que foram cultivadas com o isotipo-controle IgG1 (**Figura 22**). Apesar do bloqueio do domínio N-terminal da TN melhorar a tubulogênese da população heterogênea de células endoteliais, este efeito é mais acentuado em células endoteliais sincronizadas na fase G0/G1 cultivadas em MECs de gliomas, com duas vezes mais prolongamentos citoplasmáticos (*sprouts*, considerados estruturas precursoras dos túbulos), em relação à população heterogênea (**Figuras 22 e 23**). A neutralização deste domínio da TN não surtiu efeitos na diferenciação angiogênica induzida por MECs autólogas e de FGH (estas possuindo uma grande quantidade de TN), seja em células endoteliais quiescentes ou não, o que sugere ainda um efeito específico da matriz de glioma humano U373.

Este resultado sugere que a tenascina age especificamente em células endoteliais quiescentes e tem papel direto na má formação da angioarquitetura em gliomas.

Tabela 4 – Comparação dos teores de fibronectina e tenascina em matrizes nativas

Origem das matrizes	FN (U.A.)	TN (U.A.)
U373	0,03 ± 0,001	2,82 ± 0,02
U87	0,06 ± 0,037	0,85 ± 0,016
GBM95	0,4 ± 0,07	1,1 ± 0,035
GBM0202	0,06 ± 0,035	1,07 ± 0,18
FGH	1,76 ± 0,08	4,41 ± 0,36
HUVEC	0,56 ± 0,001	zero

U.A = unidades arbitrárias, definidas conforme descrito em Métodos

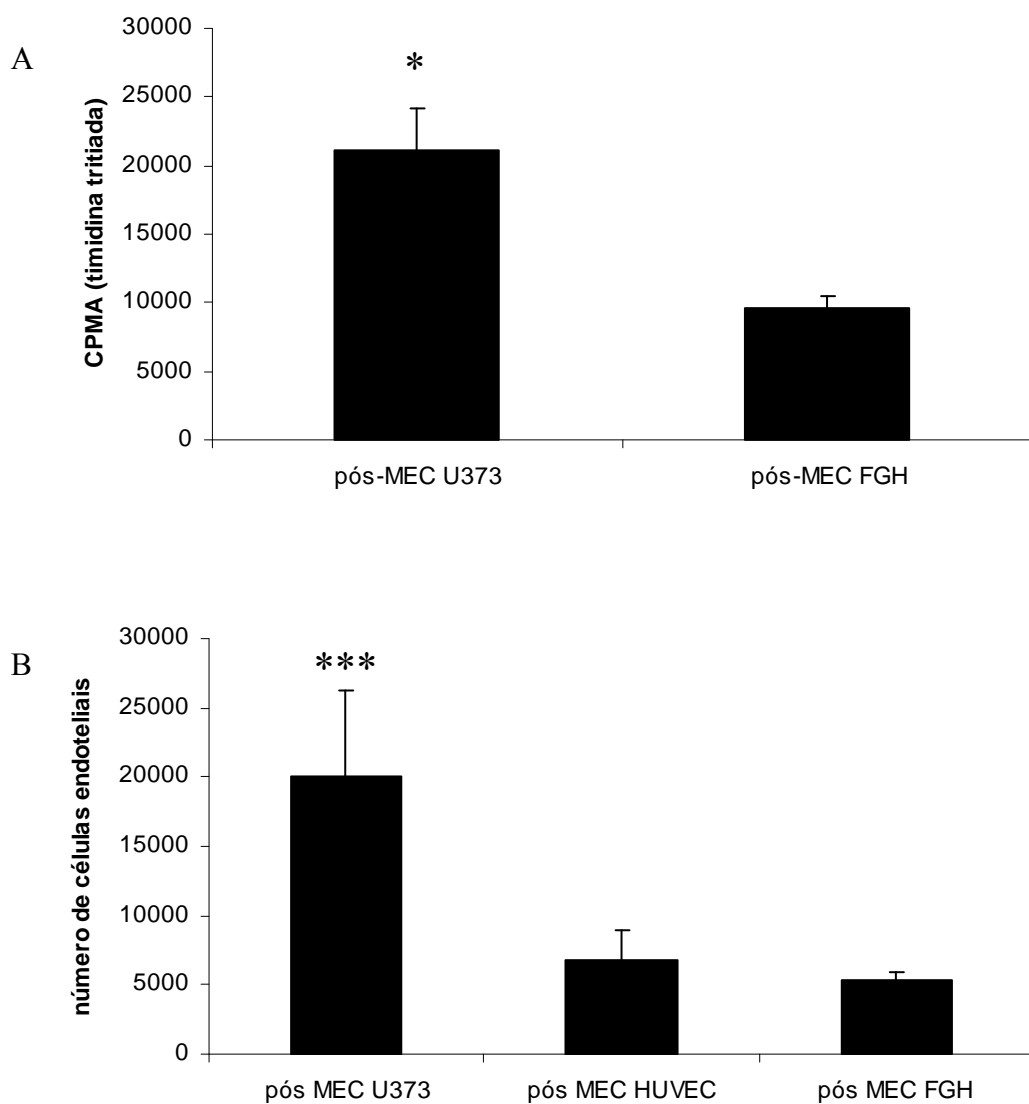


Figura 18. Células endoteliais resistentes à anoikis induzida pela matriz do glioma U373 possuem maior capacidade de proliferação. (A) Análise da capacidade de proliferação de HUVECs que estiveram em contato com diferentes MECs imobilizadas (pós-MEC). As HUVECs foram retiradas das MECs após 24h e receberam um pulso de 6 horas de timidina tritiada. A CPMA foi lida em cintilador e o resultado dado em valores absolutos. * $\rho < 0,05$, teste t; (B) ensaio de proliferação por incorporação de MTT (1 mg/ml), de 72 horas. A quantificação das células que proliferaram foi feita com uma curva com quantidades conhecidas de células endoteliais. *** $\rho < 0,001$. Teste ANOVA, Tukey's multiple comparison.

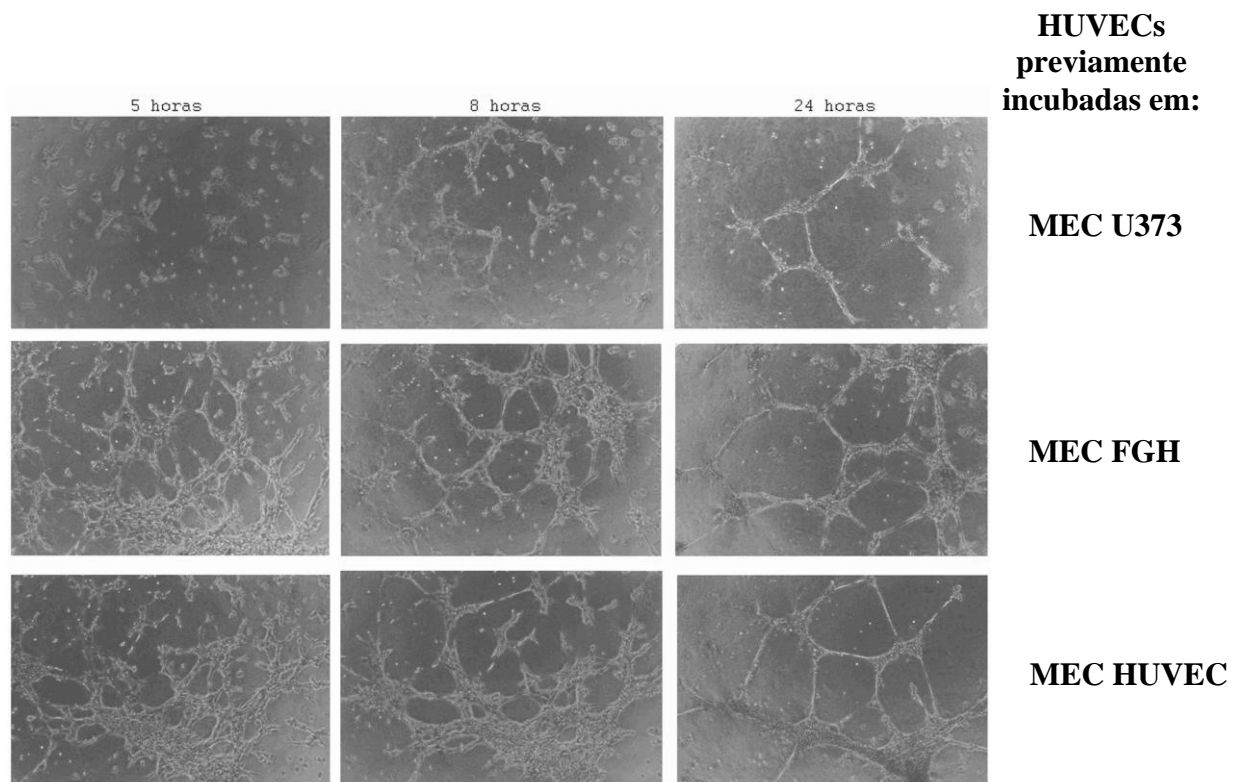


Figura 19. Células endoteliais resistentes à anoikis induzida pela matriz do glioma U373 não estabelecem uma correta angioarquitetura. Análise da capacidade tubulogênica de HUVECs que estiveram em contato com diferentes MECs imobilizadas. As HUVECs ($2 \times 10^5/\text{cm}^2$) foram cultivadas sobre MECs imobilizadas por 24h e então transferidas para Matrigel e mantidas por 24 h para análise da capacidade de diferenciação em estruturas tubulares. Aumento 40 ×.

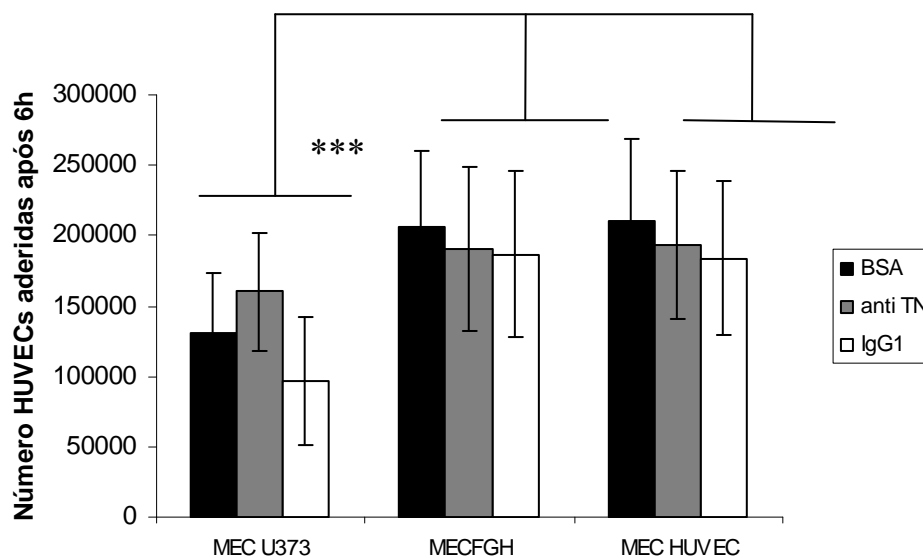


Figura 20. O domínio EGF-like da TN não interfere na desaderência das HUVECs após 6 horas de contato com as matrizes testadas. $15 \times 10^4/\text{cm}^2$ células foram plaqueadas sobre matrizes imobilizadas obtidas por dissolução de monocamadas celulares com amoníaco/Triton X-100, em PBS contendo inibidores de proteases e bloqueadas por duas horas com anti-TN (1:800) ou IgG1 (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$). As HUVECs foram incubadas por 6 horas sobre MECs bloqueadas ou não com anti-TN e em seguida, tripsinizadas e contadas (oito contagens para cada condição). *** $\rho < 0,001$ teste ANOVA, Tukey's multiple comparison.

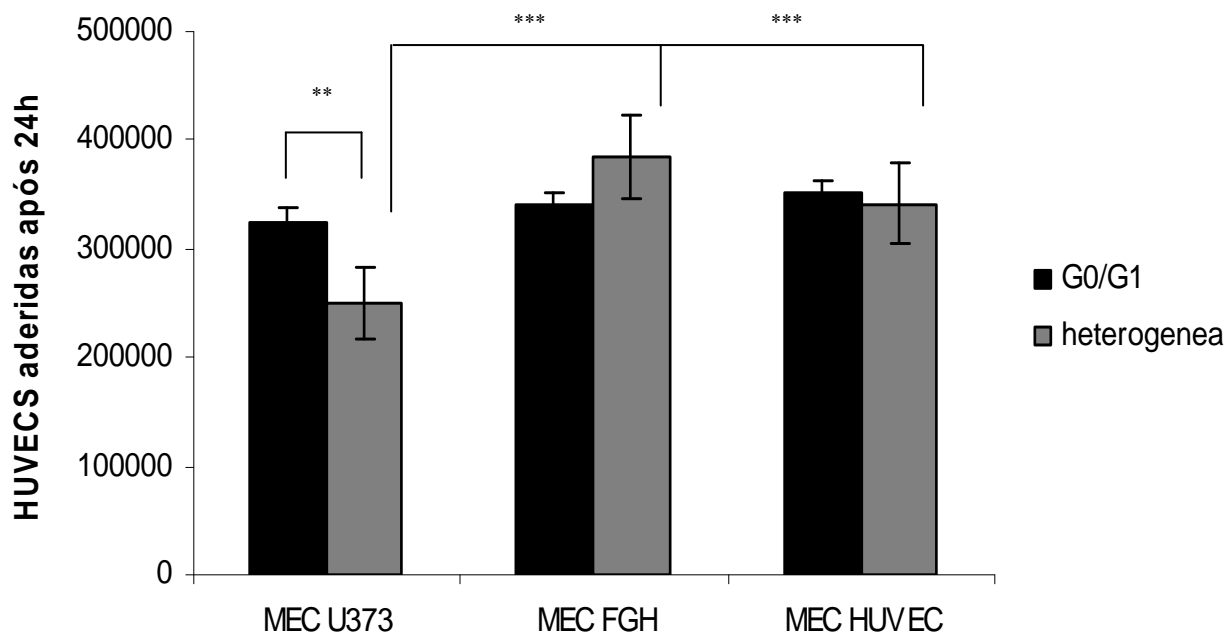


Figura 21. HUVECs em fase G0/G1 do ciclo celular permanecem aderidas à MEC de glioma de maneira equivalente às MECs adesivas. 60×10^4 células endoteliais em paradas na fase G0/G1 ou não (heterogêneas) foram plaqueadas sobre matrizes imobilizadas obtidas por dissolução de monocamadas celulares com amoníaco/Triton X-100, em PBS contendo inibidores de proteases e mantidas por 24 horas. Em seguida as células que permaneceram aderidas foram trpsinizadas e contadas (seis contagens para cada condição).

* * $\rho < 0,01$; * * * $\rho < 0,001$. Análise estatística feita pelo ANOVA, Tukey's multiple comparison.

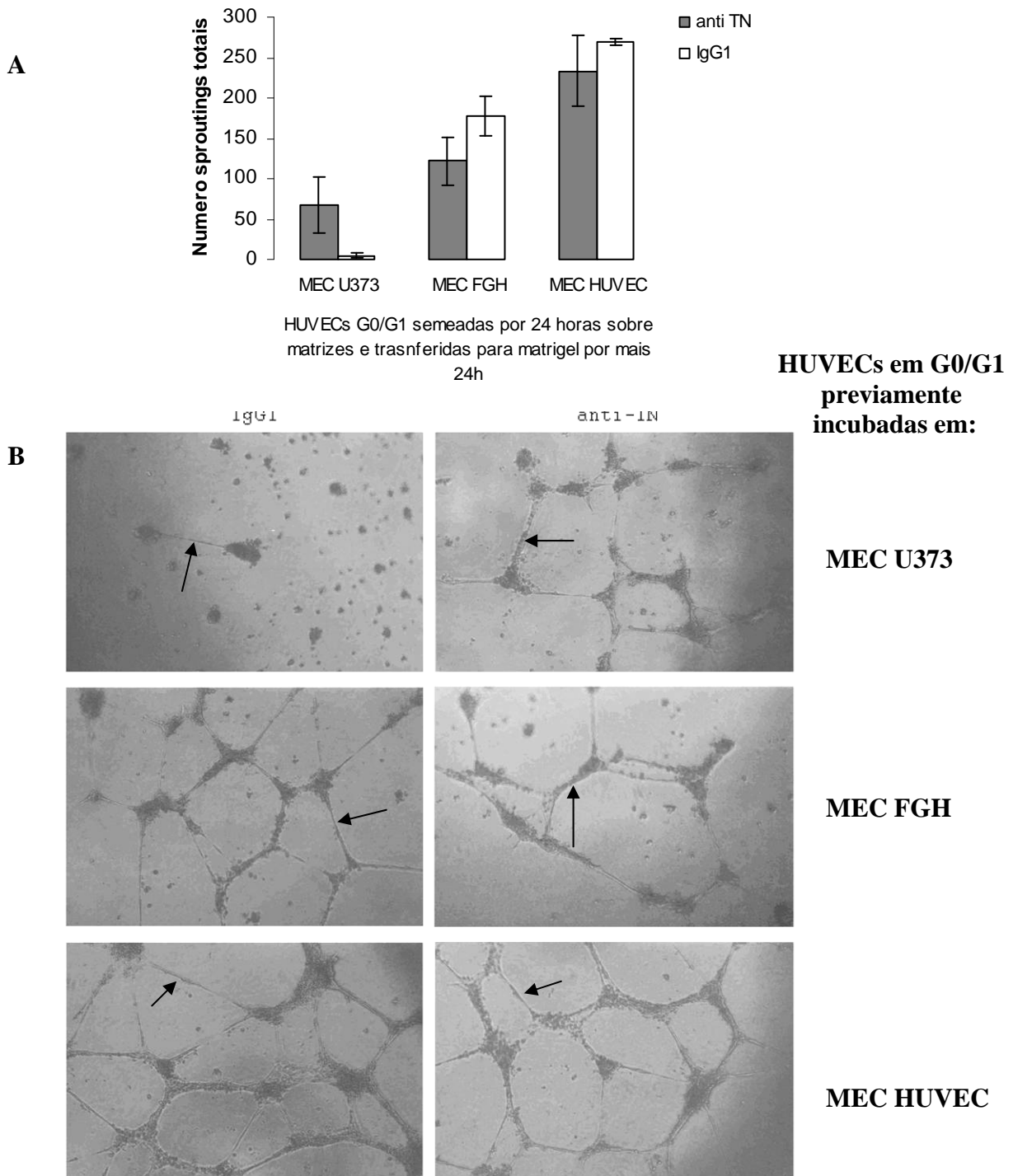


Figura 22. O domínio EGF-like da TN influencia a capacidade tubulogênica de células endoteliais que estão em fase G0/G1. As HUVECs foram privadas de SFB por 24 horas e em seguida cultivadas sobre as MECs imobilizadas previamente bloqueadas com anti-TN (1:800), IgG1 (30 µg/ml) ou 0,1% BSA por 24h e então transferidas para (3 x 10⁴/0,2cm²) Matrigel e mantidas por mais 24 h para análise da capacidade de diferenciação em estruturas tubulares induzida pela TN matricial. (A) Contagem dos *sprouts* totais encontrados em todo o poço após fixação das células com glutaraldeído 1% por 15 minutos. (B) Imagens representativas do período de 24 horas de diferenciação. Aumento 40 x. As condições com BSA foram excluídas na representação por estarem muito similares à condição com o anticorpo-controle IgG1. As setas exemplificam os *sprouts*.

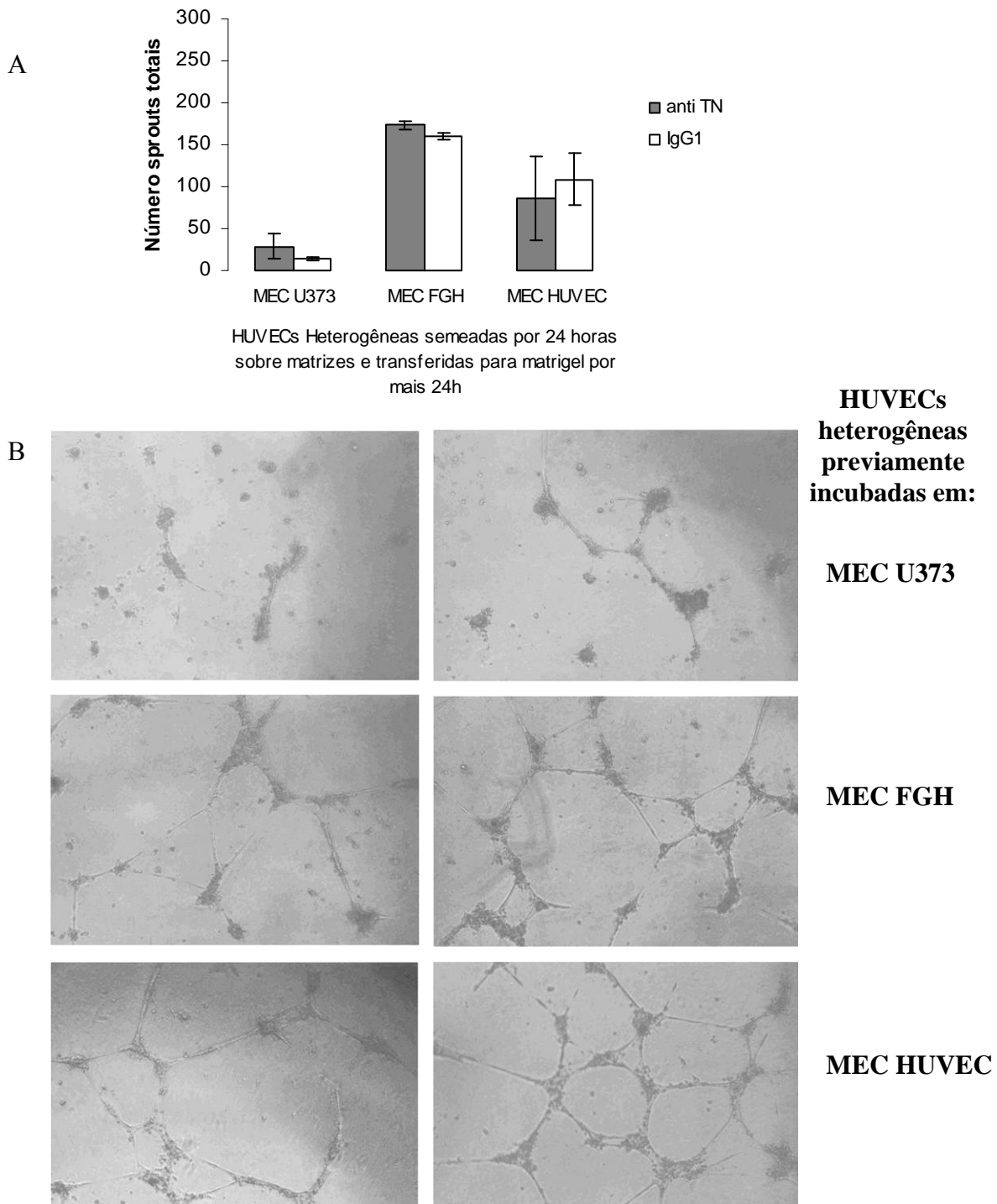


Figura 23. O domínio EGF-like da TN influencia na capacidade tubulogênica de células endoteliais heterogêneas. As HUVECs foram cultivadas sobre as MECs imobilizadas previamente bloqueadas com anti-TN (1:800), IgG1 (30 $\mu\text{g/ml}$) ou 0,1% BSA por 24h e então transferidas para ($3 \times 10^4/0,2\text{cm}^2$) Matrigel e mantidas por 24 h para análise da capacidade de diferenciação em estruturas tubulares induzida pela TN matricial. (A) Contagem dos *sprouts* totais encontrados em todo o poço após fixação das células co glutaraldeído 1% por 15 minutos. (B) Imagens representativas do período de 24 horas de diferenciação. Aumento 40 x. As condições com BSA foram excluídas na representação por estarem muito similares à condição com o anticorpo-controle IgG1.

5 - Discussão

5.1 - Adesão e viabilidade celular no endotélio

Nos capilares e em outros tipos de vasos sanguíneos, as células endoteliais possuem disposição e função que lembram um epitélio, apesar da origem embrionária ser o folheto embrionário mesodérmico (Risau, 1995). Esta função de barreira semi-permeável entre o sangue e o tecido é mantida por interações célula-célula e célula-matriz.

As interações célula-célula são mediadas por estruturas de moléculas adesivas transmembranares unidas ao citoesqueleto por uma rede de proteínas citoplasmáticas caracterizando as junções oclusivas (*tight junctions*), adesivas e comunicantes (*gap junctions*) (Michiels, 2003). Além disso, interações adesivas também são formadas por caderinas que reconhecem apenas receptores do mesmo tipo (interação homofílica) e são ancoradas por proteínas citoplasmáticas, as cateninas, que se ligam à rede microfilamentar de actina (Michiels, 2003). Estes receptores adesivos estão envolvidos na permeabilidade vascular e são reguladas negativamente por fosforilação de seus resíduos citoplasmáticos de tirosina. Um dos reguladores da VE-caderina (caderina do endotélio) é o VEGF (*vascular endothelial growth factor*) que reconhece o seu receptor VEGFR2 (flk-1) que, por sua vez, induz a fosforilação da VE-caderina, desfazendo as adesões intercelulares. Esta fosforilação resulta em aumento de migração e permeabilidade vascular o que poderia ser útil durante a migração e alinhamento endotelial na angiogênese (Esser *et al.*, 1998).

As interações célula-matriz são igualmente importantes na funcionalidade dos vasos. As adesões focais (compostas por integrinas e proteoglicanos inseridos na membrana celular que se prendem ao citoesqueleto com a ajuda de várias proteínas citoplasmáticas) providenciam uma base à ancoragem apropriada da célula endotelial à matriz que circunda a parede do vaso sanguíneo. A diminuição destas interações celulares também aumenta a permeabilidade endotelial no decorrer de etapas da angiogênese, inflamação e do estresse mecânico – forças de atrito ou de turbilhonamento produzidas pelo fluxo sanguíneo (Wu, 2005).

A célula endotelial também depende da adesão à matriz extracelular para sobreviver (Re *et al.*, 1994) e a desestabilização do contato célula-matriz parece ser suficiente para iniciar apoptose dependente de caspases e culminar em rápida involução das estruturas vasculares (Meredith *et al.*, 1993). A adesão celular ao substrato gera repressão de fatores pró-apoptóticos que envolve diversos

componentes: moléculas da matriz, integrinas, citoesqueleto, proteínas associadas ao citoesqueleto, além de interações dos microtúbulos com cálcio (Michel, 2003). A adesão à matriz extracelular protege células endoteliais humanas (HUVECs) da apoptose mediada por Fas/FasL, ao passo que células mantidas em suspensão ficaram suscetíveis à apoptose mediada por Fas (Aoudjit & Vuori, 2005).

O crescimento celular, diferenciação e sobrevivência são resultados de sinalizações químicas e biofísicas do microambiente circundante à célula (Murphy-Ullrich, 2001). Caso a diminuição das adesões intercelulares ou adesões à matriz da célula seja suficiente para impedi-la de interagir com as células vizinhas e/ou com o substrato, a célula se destaca e morre por apoptose. Este mecanismo parece ser uma forma de prevenir que células desadidas venham a aderir em outros órgãos/tecidos, que não os de sua localização anatômica e fisiológica correta, mantendo a arquitetura e homeostase no organismo. A apoptose decorrente da desaderência celular é chamada de *anoikis* (palavra do grego que significa “sem teto, sem abrigo”). Se sinais apropriados forem dados pela MEC às células, as mesmas organizam o citoesqueleto para a formação de fibras de estresse contendo actina e adesões focais que fazem a transdução de sinais mecânicos e bioquímicos. Isto configura a célula num estágio forte de adesão (Murphy-Ullrich, 2001). Nossos resultados indicaram que a MEC secretada pelos gliomas mostrou-se permissiva à adesão e à viabilidade endotelial nas primeiras duas horas de cultivo. A presença da proteína citoplasmática vinculina juntamente com a formação de fibras de estresse de actina, indicaram, portanto, um estado de adesão forte ao substrato.

De maneira interessante, observamos que as matrizes de glioma induzem uma alta porcentagem de *anoikis* nas HUVECs após o período inicial de adesão (após 4 horas de cultivo), que se caracterizou pelo completo arredondamento de células antes espalhadas e o desprendimento das mesmas da matriz tumoral, comprovado por videomicroscopia. Sabemos que o efeito adesivo inicial das células endoteliais sobre as matrizes de glioma não é devido à MEC secretada pelas próprias células endoteliais. Quando incubamos as HUVECs por 2 horas sobre as MECs de variadas origens (de astrócito, fibroblasto, gliomas) ou sobre fibronectina purificada, com ou sem ciclohexamida (10nM), um inibidor de síntese protéica, a adesão endotelial observada foi idêntica nas duas condições (dados não mostrados). A matriz de tumores gliais foi suficiente para permitir a formação de adesões focais, mesmo quando as HUVECs estavam impedidas de produzir a própria MEC. Entretanto, HUVECs em presença de cicloheximida sobre plástico ou lamínulas de vidro não são capazes de aderir sobre tais substratos em 2 horas. Isto indica que a MEC secretada pela

HUVEC seria necessária à adesão inicial, em condições de privação total de um substrato protéico. Estes dados permitem ainda afirmar que, apesar da elevada taxa de desaderência observada com matrizes de gliomas após cultivos longos nestas matrizes, estes suportes contém algum teor de proteínas com sítios adesivos para as células endoteliais.

HUVECs cultivadas sobre matrizes imobilizadas secretadas por outros tipos de tumores não neurais, como as linhagens de carcinoma de cólon uterino U79 e carcinoma mamário MCF-7 e MDA-MB-431 apresentaram também altas taxas de apoptose, com mais de 40% de *anoikis*, em análise por citometria de fluxo através de marcações com anexina V-FITC (AV-FITC) e iodeto de propídeo. Estes dados podem indicar que tipos diferentes de tumores podem usar mecanismos similares na interação com o endotélio, incluindo indução de apoptose endotelial inicial. Sabemos que as HUVECs, provenientes de veia umbilical humana, não possuem a diferenciação em barreira hematoencefálica como as células endoteliais nativas do cérebro. Contudo, esta *anoikis* endotelial sobre MECs de tumores não neurais, comparável a encontrada no cultivo das HUVECs sobre matrizes de gliomas, nos indica que as especializações adquiridas pelo endotélio do sistema nervoso não estão envolvidas na acentuada desaderência das matrizes.

As MECs imobilizadas livre de células são obtidas por rompimento da monocamada de células em confluência, através de tampão amoníaco contendo Triton X-100 e inibidores de proteases. Entretanto, sabemos que algumas proteínas matriciais, como a FN por exemplo, são dependentes de integrinas/células para polimerizarem (Sottile & Hocking, 2002). A fim de sabermos se a destruição da monocamada que origina as MECs imobilizadas estaria comprometendo a estrutura, arranjo e/ou interações entre as proteínas matriciais realizamos ensaios de contato direto com células endoteliais sobre células de glioma (A172, U87, U373, GBM95 e GBM0202), astrócitos e fibroblastos (co-cultura). A porcentagem de apoptose das células endoteliais em co-cultura foi muito similar à morte endotelial em MECs imobilizadas. Ensaio de co-cultura com HUVECs em monocamada fixada também gerou resultados muito similares à co-cultura com células vivas (resultados não mostrados). Estes resultados indicam que a técnica que utilizamos para a obtenção das MECs é eficaz para o nosso modelo de interação de MEC de glioma com células endoteliais e o arranjo protéico possivelmente perdido na lise celular não influi na apoptose endotelial.

A importância do contato físico com astrócitos normais e não de fatores solúveis na diferenciação endotelial foi demonstrada anteriormente. Os astrócitos possuem papel na

vascularização do cérebro e retina. O contato físico entre astrócitos corticais de ratos neonatos e células endoteliais de retina bovina (BRE) parece liberar fatores solúveis pró-angiogênicos que induzem o alinhamento das células endoteliais em estruturas tipo-capilares e inibem a proliferação endotelial. O efeito tubulogênico foi reproduzido com meio condicionado (MC) desta co-cultura, entretanto, não foi conseguido com MC de astrócitos (Jiang *et al.*, 1995). Um efeito angiostático do MC foi relacionado à secreção do TGF- β (Behazadian *et al.*, 1995). Contudo, parece que em gliomas C6 somente o contato direto entre os dois tipos celulares induz diferenciação endotelial, sem qualquer efeito tubulogênico com o MC da co-cultura (Lattera *et al.*, 1990). A indução da tubulogênese neste modelo pareceu ser dependente de indução de transcrição e síntese protéica, ao contrário da diferenciação em estruturas tipo-capilares observada em Matrigel[®] (Lattera & Goldstein, 1991), sugerindo um efeito angiogênico específico pelo glioma. Estes dados, ainda que contraditórios em alguns aspectos, indicam uma participação dos astrócitos normais na manutenção dos vasos cerebrais. Os astrócitos parecem ser os responsáveis, no tecido nervoso normal, pela aquisição de características fenotípicas específicas pelas células endoteliais em barreira hematoencefálica. A co-cultura de HUVECs com astrócitos de rato induziu a expressão nas células endoteliais de marcadores de barreira hematoencefálica, como γ -GTP (γ -glutamiltanspeptidase), transportador de glicose GLUT-1, junções oclusivas e aumento do número de mitocôndrias (Hayashi *et al.*, 1997). Nos sistemas de co-cultura utilizados neste trabalho, as células endoteliais foram colocadas em contato com matriz secretada, fatores membranares e com fatores solúveis secretados constitutivamente pela monocamada de glioma, astrócito ou fibroblasto. Contudo, estes fatores solúveis não resgataram as HUVECs da apoptose. Estes resultados ajudaram a corroborar a ineficiência de fatores solúveis em reverter a indução de apoptose das HUVECs observada na citometria, com marcações de AV-FITC e PI. As HUVECs, quando cultivadas sobre MECs imobilizadas continuaram a morrer mesmo em presença de meios condicionados (MCs), sejam de astrócitos ou de gliomas.

Um outro sistema de co-cultura abordado por nós foi o uso de explantes tumorais humanos sobre monocamada confluyente de HUVECs, feitos sobre lamínulas ou em modelos angiogênicos em gel tridimensional de fibrina. Esta co-cultura também levou ao desaparecimento das células endoteliais próximas à massa tumoral. Contudo, houve diferenciação da porção da monocamada endotelial mais distante ao explante. Isto sugere que os fatores solúveis secretados pelo glioma não revertem o efeito de desaderência endotelial, entretanto, podem agir na indução angiogênica das células que não receberam o sinal de *anoikis*.

5.2 - Apoptose endotelial no curso da angiogênese

A eliminação de células por apoptose é um evento fundamental no desenvolvimento, através do qual os organismos multicelulares regulam números de células ou eliminam as que são funcionalmente redundantes ou potencialmente prejudiciais ao organismo (Twomey & McCarthy, 2005). Em organismos adultos, a apoptose também é útil no remodelamento tecidual e reparo de injúrias permitindo a eliminação de populações inteiras sem dano tecidual ou resposta inflamatória (Greenhalgh, 1998).

No campo de estudo da angiogênese, principalmente da angiogênese tumoral, as pesquisas tem possuído como paradigma dominante a indução da morte endotelial como estratégia anti-tumoral indireta, visando o desenvolvimento de terapias anti-angiogênicas. Apesar de atualmente o uso terapêutico da angiogênese também contemplar sua indução, em tecidos lesionados por isquemias, o grande desenvolvimento nos estudos sobre este evento se deu pela possibilidade, hoje largamente aceita, de se interromper o crescimento tumoral através da indução do colapso de sua rede de vascularização (SoRelle, 1998).

No entanto, trabalhos recentes sugerem a existência de um papel para a apoptose endotelial na construção da rede vascular. Na embriogênese de camundongos, a apoptose é imprescindível à formação da microcirculação, porém parece ser dispensável ao desenvolvimento dos vasos de grande calibre (Duval *et al.*, 2007). A apoptose endotelial nos embriões de idades gestacionais E8,5, E10,5, E12,5 e E14,5 foi confirmada por dupla marcação com CD31 e caspase 3 e acompanhada de observação da morfologia apoptótica clássica, como a presença de núcleo picnótico. Contudo, os autores levantaram a possibilidade das células endoteliais apoptóticas poderem se desprender dos vasos e se perderem no fluxo sanguíneo, subestimando a quantificação do endotélio apoptótico. Assim, os autores utilizaram videomicroscopia para observação de HUVECs semeadas sobre gel de lâmina basal, privadas de SFB, em presença de anexina V-FITC e PI, em sistema de fluxo e pressão constante sobre as células. A *anoikis* envolvida na formação dos vasos foi confirmada, pois 68% destas HUVECs que se desprenderam do matrigel estavam AV positiva porém ainda PI negativas, o que mostrava que já haviam recebido o sinal de apoptose, embora ainda tivessem integridade da membrana plasmática. A geração de embriões transgênicos para expressar a proteína anti-apoptótica Bcl-2 levou à letalidade dos embriões na segunda fase gestacional, devido à má

formações capilares, resultando em órgãos pouco desenvolvidos e também em má formação cardíaca (Duval *et al.*, 2007).

Em outro trabalho, células endoteliais apoptóticas foram encontradas nas áreas de ramificação vascular e nos lúmens dos capilares em formação durante a vasculogênese e angiogênese da placenta de ratos, mas nenhuma célula apoptótica foi encontrada nas ilhas de hemangioblastos (Tertemiz *et al.*, 2005). Uma porcentagem significativamente menor de células endoteliais apoptóticas foi encontrada nos vasos mais maduros, o que sugere que a apoptose esteja envolvida no estabelecimento da rede vascular, porém, numa determinada janela temporal da diferenciação endotelial.

A importância da apoptose para a angiogênese foi ainda sugerida por outro estudo, no qual a adição de inibidores de caspases a HUVECs em Matrigel[®] inibiu a formação de estruturas tubulares mesmo em presença de VEGF. A apoptose acontecia antes da reorganização das células endoteliais e sua inibição impedia o alinhamento correto da angioarquitetura sem, no entanto, alterar a migração ou a proliferação celular (Segura *et al.*, 2002). Neste estudo vemos ainda que etapas da angiogênese como alinhamento, migração e proliferação podem ser regulados independentemente. Experimentos comparáveis foram feitos com células de melanoma em Matrigel[®] e a apoptose também pareceu crucial para a organização em estruturas tubulares em células de melanoma simulando o mimetismo vascular (a formação de estruturas tubulares por células tumorais e não pelo endotélio propriamente dito). Conforme demonstrado por Segura e colegas (2002), a apoptose e a tubulogênese também foram bloqueadas por inibidores de caspases. E ainda, a apoptose pareceu ser crucial **antes** do aparecimento das estruturas capilares sem nenhuma influência **após** a sua formação (Vartanian *et al.*, 2007).

No caso específico dos gliomas, a apoptose endotelial também já foi proposta como uma etapa que antecederia a formação de capilares no crescimento e evolução dos GBM *in vivo*, ou seja, que antecederia a fase angiogênica do tumor (Zagzag *et al.*, 2000). A injeção de células de glioma em encéfalos de camundongo mostrou que as células tumorais se organizaram e proliferaram ao redor dos vasos nativos cerebrais (co-optação). Células de glioma posicionadas perivascularmente induzem a apoptose dos pericitos e desestruturam os pés vasculares astrocitários dos vasos, que têm sua lâmina basal extremamente diminuída em espessura. As células endoteliais se destacam da parede do vaso e entram em apoptose, causando uma involução dos vasos (regressão vascular) que resulta em focos múltiplos de necrose das células tumorais, dependentes dos mesmos. A

angiopoietina-2 (Ang-2), um antagonista do fator de sobrevivência e quiescência endotelial angiopoietina-1, é expressa somente pelos vasos circundados pelo tumor e parece ter relação com a indução de apoptose e regressão vascular (Zagzag *et al.*, 2000). O glioma seria, portanto, inicialmente, um tumor não-angiogênico. Contudo, a regressão vascular descrita acima geraria hipóxia local, o que induziria a secreção de VEGF e conseqüente a neovascularização do tecido tumoral, de forma vigorosa (fase angiogênica da progressão tumoral).

É importante ressaltar que a co-optação de vasos nativos por gliomas e a injúria vascular dela decorrente não foi observada somente em modelos murinos, tendo sido também observada em **gliomas humanos**. Num estudo feito por microscopia eletrônica de transmissão com 25 astrocitomas, danos também foram vistos nos vasos sanguíneos co-optados pelas células tumorais que os circundavam totalmente, pericitos apresentando edema e material fagocitado, as células endoteliais apresentaram edema e sinais variados de morte celular. Os astrócitos perivasculares mostraram sinais de oncose e necrose (Arismendi-Morillo & Castellano, 2005). Nossas primeiras observações sobre a morte endotelial induzida pela matriz secretada pelo astrocitoma U373 datam da época da publicação do estudo de Zagzag *et al.* (2000), no qual ficava evidente que o(s) mecanismo(s) da morte endotelial causada pela co-optação de vasos nativos pelo glioma eram ainda desconhecidos.

Estes trabalhos recentes mostram a apoptose endotelial como essencial ao estabelecimento de uma angioarquitetura apropriada nos sítios de angiogênese. Nossos dados mostram que as HUVECs morrem por apoptose ao perderem o espalhamento, arredondarem-se e desaderirem das MECs secretadas pelo glioma. Houve apoptose em MECs autólogas, de fibroblasto, de astrócitos, fibronectina e em ausência de MEC (plástico ou lamínulas), porém as taxas de mortalidade endotelial foram **sempre** abaixo das encontradas nas interações com a MEC de gliomas, o que nos sugere um papel ativo de componentes das matrizes tumorais na aderência e posterior desaderência endotelial.

5.3 - Relevância da composição da MEC de gliomas na interação com células endoteliais

Estas observações acima, nos levaram a analisar em maior detalhe a composição da matriz de linhagens de gliomas, em comparação com matrizes que se mostraram mais eficazes para a adesão das células endoteliais. A MEC pode, através da ligação e ativação de integrinas, sinalizar

proliferação, migração e sobrevivência, e tanto as células tumorais como as endoteliais podem responder aos sinais vindos do microambiente que as circunda. Ao analisarmos a composição de várias proteínas adesivas e desadesivas das MECs secretadas pelas células em estudo neste trabalho, como colágenos tipo I, IV e VI, laminina (LN), fibronectina (FN), trombospondina-1 (TSP-1) e tenascina (TN), vimos que HUVECs e U373 incorporam em suas MECs quantidades similares de colágeno tipo I e VI e a U373, menor quantidade de colágeno tipo IV, típico de membrana basal, em comparação às matrizes adesivas. A incorporação de laminina e TSP-1 foi alta nas três matrizes investigadas. Contudo, HUVECs não secretam TN, porém incorporam grande quantidade de FN; ao contrário, a linhagem U373 incorpora alta quantidade de TN porém incorpora pequenas quantidades de FN matricial; a linhagem de fibroblasto FGH incorpora altas taxas de ambas as glicoproteínas.

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). No **cérebro normal**, o glicosaminoglicano ácido hialurônico (AH) é o componente majoritário da MEC, garantindo assim o influxo osmótico de água. Além do AH, são encontrados proteoglicanos da família lectican (agrecan, versican, brevican) entre outros proteoglicanos cujo número já chega a 25, segundo estimativas recentes (Bellail *et al.*, 2004). Glicoproteínas como SPARC, trombospondina-1 (TSP-1) e tenascina-C (TN-C) podem ser expressas em localizações específicas do cérebro adulto normal, enquanto componentes como colágenos fibrosos, laminina e fibronectina estão limitadas a áreas vasculares e perivasculares no cérebro (Gladson, 1999).

Nos **tumores cerebrais** primários, o AH e diversos outros componentes, têm sua expressão aumentada, tanto no estroma tumoral quanto nas bordas da lesão (Bellail *et al.*, 2004). TN-C, TSP-1 e SPARC se tornam mais expressos na parede vascular e nos tecidos circundantes dos vasos (Higuchi *et al.*, 1993; Zagzag *et al.*, 1995, 1996; Sage, 1997), sugerindo um papel destas proteínas na angiogênese destes tumores. No caso da TN-C, sua expressão aumenta com a gradação do tumor e sua expressão se correlaciona inversamente com a expressão da fibronectina (FN). *In vitro*, além destes componentes, foi observado que células de glioma cultivadas também são capazes de produzir laminina e colágenos tipos I, III, IV e V (Rucklidge *et al.*, 1989; Tysnes *et al.* 1999; Bellail *et al.*, 2004). No entanto, nenhum depósito destas glicoproteínas foi evidenciado em amostras de tecido tumoral *in situ*, levando à consideração de que as condições de secreção *in vitro* não devam refletir a situação *in vivo*. Na verdade, de todos os componentes aqui enumerados, a TN-C é o único consistentemente identificado em depósitos nos espaços intercelulares de gliomas (Zamecnick, 2005). Desta maneira, considerando nossos dados comparativos iniciais, a expressão dos

componentes matriciais pesquisados não parece discrepante em relação aos dados disponíveis na literatura.

Ao analisarmos a Tabela 4, tivemos nossa atenção voltada particularmente para os níveis de TN-C nas matrizes examinadas, tendo em vista que esta glicoproteína está totalmente ausente das matrizes secretadas por HUVECs, nas condições de nossos ensaios. Conforme já abordado na *Introdução* desta tese, a TN-C faz parte do grupo das proteínas matricelulares, que são componentes portadores de atividades anti-adesivas na matriz extracelular. Este grupo, que inclui também a TSP-1 e a SPARC, principalmente, está envolvido na indução do chamado estado intermediário de adesão (Murphy-Ullrich, 2001). Neste estado, as células exibem ancoragem suficiente para manutenção da viabilidade - evitando assim a *anoikis* – porém resguardam sua capacidade proliferativa e de migração celular. Nos casos mais bem estudados, como o da própria TN-C e da TSP-1, este efeito é em geral obtido através de um antagonismo às propriedades fortemente adesivas da FN. A inspeção da Tabela 4 permitiu verificar que 3 dos 4 gliomas analisados possuem uma grande quantidade de TN em suas matrizes, em relação às quantidades de FN, em concordância com os trabalhos de outros autores (Bellail et al, 2004). A matriz de fibroblasto FGH, que foi muito eficaz na adesão de HUVECs, apesar dos elevados níveis de TN, contém também os mais elevados conteúdos de FN, dentre todas as matrizes utilizadas neste estudo. Estes dados sugerem a existência de um intrincado equilíbrio entre os conteúdos de glicoproteínas pró- e anti-adesivas, que devem influenciar o comportamento das células em contato com as matrizes tumorais.

5.4 Influência do glioma no comportamento de células endoteliais

A capacidade de proliferar e de formar estruturas com lúmen (tubulogênese) é característica essencial de células endoteliais comprometidas com o processo angiogênico. Nos nossos ensaios de contato de HUVECs com matrizes tumorais, foi observado com grande reprodutibilidade que, lado a lado com as elevadas taxas de *anoikis* – que variaram entre 50 e 80 % , sendo estas sempre as maiores obtidas, em comparação com matrizes de quaisquer outras origens, no mesmo ensaio – uma parcela não negligenciável das células endoteliais sobrevivia a este contato e se mantinha aderida à matriz do glioma U373. Este fato sugeriu a co-existência de pelo menos duas sub-populações endoteliais, diferencialmente susceptíveis ao processo de *anoikis*.

Sabe-se que, sob diversos aspectos, a angiogênese associada aos gliomas transcorre com um desequilíbrio de diversas atividades associadas ao processo, como o excesso de estímulo

proliferativo e migratório dependente de VEGF, ou com falhas no mecanismo de recrutamento de pericitos, levando não raro à formação de vasos defeituosos, tortuosos ou pouco funcionais (Munn, 2003). Com base nestes fatos, especulamos se as matrizes secretadas por gliomas poderiam intervir na delicada regulação entre a indução de apoptose e a angiogênese no estabelecimento da rede vascular de sua massa tumoral, aumentando a *anoikis* endotelial, levando assim a uma seleção das células endoteliais mais resistentes à apoptose. Khodarev e colegas (2004) demonstraram que HUVECs co-cultivadas com células de glioma U87-GFP+ apresentaram maior resistência à apoptose induzida por radiação, com acúmulo de RNAs (e sua expressão) para moléculas de adesão (subunidades de integrinas α_v , α_6 , β_1) e proteínas regulatórias do ciclo celular (ciclina A, ATM) e de reparo de DNA (RAD51), sugerindo que as células tumorais modificam o padrão transcricional das células endoteliais, incluindo genes que participam da resposta a estresse genotóxico. Células que cresceriam no microambiente tumoral podem ainda desenvolver resistência aos tratamentos citotóxicos (Brown *et al.*, 2004). Charalambous et al (2005) efetivamente constataram que células endoteliais derivadas de gliomas sofrem menos apoptose após privação de soro *in vitro*.

Além disso, se pensarmos que a massa tumoral pode ser considerada como um ambiente hostil para células não-transformadas, com excesso de células em proliferação, pouco espaço, competição por nutrientes limitados e excreção de metabólitos em excesso, podemos questionar se durante a progressão do glioma, a injúria dos vasos quiescentes não poderia também resultar em uma seleção positiva de células endoteliais com maior potencial proliferativo, fato que seria condizente com as altas taxas proliferativas das células endoteliais nos vasos do glioma, *in vivo* (Plate & Risau, 1995). Com base nesta hipótese, pudemos constatar que as células endoteliais que se mantiveram aderidas por 24 horas na MEC da linhagem de glioma U373 e que sobreviveram, quando mantidas em 20% de SFB por mais 24 horas, proliferam cerca de 3 vezes mais que as células endoteliais pré-incubadas com MEC de propriedades mais adesivas (fibroblasto e autólogas). Estes dados estão em concordância com outros trabalhos, nos quais foi observado que células endoteliais de tumores gliais proliferam mais do que células endoteliais de tecidos normais (Bussolati et al, 2003; Denekamp, 1984; Miebach et al, 2006).

Khodarev e colegas (2003) mostraram que, quando co-cultivadas com células de linhagem de glioma humano U87-GFP+, HUVECs adquirem um fenótipo *ativado* e se tornam mais migratórias, proliferativas, formando melhor as estruturas tubulares *in vitro*. Contudo, nossos resultados indicaram este mesmo tipo de célula endotelial, após passar 24 horas aderidas em MECs de glioma, apesar de altamente proliferativas, foram incapazes de adequadamente fazer tubulogênese em

Matrigel®. Ao contrário, as HUVECs transferidas de MECs adesivas e que são menos proliferativas, conseguem estabelecer correto alinhamento e formação de uma grande quantidade de prolongamentos – ou *sprouts*. No entanto, deve ser ressaltado que no trabalho de Khodarev et al (2003), o efeito tubulogênico foi observado em ausência de contato físico, seja das células endoteliais com células de glioma, seja com a matriz destas últimas, sendo que os filtros de cocultura utilizados apenas permitiam a passagem de macromoléculas (0,4 µm de porosidade). Em outro estudo, células endoteliais diretamente retiradas de glioma humano (GDMEC) e cultivadas *in vitro* são mais proliferativas e formam melhor as estruturas tubulares que HUVECs (Bian *et al.*, 2006), em presença do fator angiogênico VEGF. Ainda que as diferenças entre HUVECs e células diretamente extraídas do tecido tumoral, ou de variações de certos detalhes do protocolo *in vitro* possam ser responsáveis por algumas das discrepâncias detectadas entre os ensaios - incluindo os nossos - não podemos ignorar a grande diferença da modulação exercida pelas diferentes matrizes na proliferação e na tubulogênese das HUVECs, que são células endoteliais típicas, funcionais e portadoras de todos os marcadores endoteliais característicos do endotélio adulto.

Assim, pudemos verificar que a sub-população endotelial que resiste à anoikis em matriz do glioma U373 possui uma capacidade proliferativa aumentada, o que teoricamente seria compatível com uma densidade endotelial aumentada nos tumores, ao lado de uma incapacidade em se diferenciar em estruturas tubulares. Este fenótipo alterado seria, a nosso ver, plenamente concordante com as características vasculares dos gliomas de grau elevado, que apresentam uma grande quantidade de vasos compondo uma rede vascular caótica e sub-funcional (Munn, 2003). O endotélio tumoral é frouxo, dilatado, tortuoso e parece estabelecer interconexões ao acaso. A morfologia destas células endoteliais também é aberrante, a membrana basal é irregular (grossa em alguns pontos e ausente, em outros) e os pericitos estão fracamente associados à parede dos capilares ou mesmo ausentes (Vajkoczy & Menger, 2004; Bart *et al.*, 2000; Raza *et al.*, 2002; Munn, 2003).

Da mesma maneira que células endoteliais respondem de forma variável a fatores solúveis dependendo da fase do ciclo celular em que se encontram (Hulleman & Boonstra, 2000), seria coerente pensarmos que as fases do ciclo também influenciem as respostas celulares a fatores imobilizados, presentes na matriz extracelular, uma vez que nem todas as células endoteliais que desaderiram num período de 24 horas. Na verdade, nossos dados (não mostrados) mostraram que estas apresentavam ainda fibras de estresse e marcação positiva para vinculina. Questionamos então, se a fase do ciclo celular das HUVECs poderia influenciar na desaderência das matrizes de

gliomas. Vimos que HUVECs sincronizadas na fase G0/G1 por privação de soro permaneceram mais aderidas à matriz de glioma após 24 horas, do que HUVECs que não passaram por sincronização - mantidas continuamente em 20% de soro. O número de células em G0/G1 aderidas à MEC de glioma foi igual ao número visto nas matrizes mais adesivas ($p > 0.05$). Este resultado nos sugere que as células endoteliais em fase S ou G2/M que estariam sujeitas à *anoikis* e que este é um efeito exclusivo da matriz tumoral, pois as HUVECs aderem igualmente nas MECs autólogas ou de fibroblastos, independentemente de terem sofrido sincronização na fase G0/G1.

A abordagem experimental de se trabalhar com populações não-sincronizadas não deve ser encarada como uma condição não fisiológica. Inicialmente, ainda que a meia-vida de células endoteliais no organismo seja medida em anos (entre 4 e 10 anos, segundo diferentes estudos), não seria lógico supor que todas as células endoteliais se renovam em uma curta janela temporal, todas ao mesmo tempo. Obviamente, tal *turnover* deve se dar gradativamente, o que leva à conclusão de que populações em diferentes fases do ciclo celular co-existem no leito vascular. Além disso, durante o processo angiogênico em particular, sabemos que há realmente uma heterogeneidade celular na população de células endoteliais, e cada subpopulação tem uma participação diferente no processo angiogênico, envolvendo migração, proliferação, *anoikis* e tubulogênese, segundo observações morfológicas *in situ* que comprovaram a existência de figuras celulares variadas – mitóticas, pavimentosas, fibroblastóides ou apoptóticas - na estrutura vascular em formação (Meyer *et al.*, 1997). Neste trabalho, experimentos feitos com HUVECs cultivadas em gel de colágeno em presença de ester de forbol miristato (PMA) e anti-integrina $\alpha_2\beta_1$ (permite maior mobilidade no gel ao interagir menos com o colágeno gelificado), mostraram que há pelo menos três subpopulações de células endoteliais envolvidas na formação das estruturas tipo-capilares *in vitro*. Inicialmente, células migratórias com características fagocíticas (lisossomos primários e secundários) “cavariam” túneis na matriz de colágeno estabelecendo a trilha para a migração da segunda sub-população endotelial. Esta seria caracterizada por grande número de vacúolos intracelulares que coalescem nos espaços intercelulares e originam o lúmen vascular primitivo (o lúmen que se estende ao longo de várias células). O espaço intercelular é remodelado posteriormente pela fusão desses vacúolos com a membrana plasmática. Esta população vacuolítica ao migrar para o alinhamento e a formação de lúmen englobava as células fagocíticas que, impedidas de interagir com a matriz de colágeno, morreram por *anoikis*. Por fim, a terceira sub-população é adicionada aos tubos capilares aumentando-os em comprimento. Não houve indícios de proliferação endotelial nesse modelo, fato que sugere ainda que proliferação (considerado aqui como tendo a função de aumentar a massa

endotelial para o processo angiogênico) e tubulogênese (processo de “construção” do tubo vascular a partir das células endoteliais geradas pela proliferação estimulada por fatores angiogênicos), configuram dois eventos distintos da angiogênese, submetidos a regulações específicas (Ilan et al, 1998).

Conforme ficou evidente na comparação do perfil de componentes matriciais secretados pela linhagem de glioma U373, os níveis de TN-C são mais de 80 vezes superiores aos níveis de FN, uma proporção qualitativamente inversa à detectada na matriz endotelial, rica em FN e desprovida de TN-C. Em gliomas, a expressão de TN-C aumenta cerca de 4 vezes mais em relação ao cérebro normal e parece favorecer a migração celular e fosforilação de FAK (*focal adhesion kinase*), vista nas células da borda migratória na massa tumoral e é uma das primeiras proteínas a ser fosforilada após ativação de integrinas (Zagzag *et al.*, 2002). A TN-C parece influenciar também a proliferação de células tumorais, inclusive gliomas (Chiquet-Ehrismann & Tucker, 2004). A expressão de TN-C aumenta com a malignidade e está correlacionada ao baixo prognóstico de vida do paciente (Leins *et al.*, 2003).

O balanço de TN/FN foi relacionado também à proliferação celular de gliomas, de maneira muito semelhante ao que acontece no remodelamento em tecidos conjuntivos. Quando a TN e FN são imobilizadas em plástico, a TN-C se liga à FN pela repetição III-13 não permitindo que esta última se ligue e ative o co-receptor na membrana celular, o proteoglicano contendo heparan sulfatos, sindecán-4. Esta competição TN/FN resultaria em desestabilização de contatos focais, menor espalhamento celular e aumento na proliferação de células tumorais de glioma humano T98G e de carcinoma de mama MDA-MB435 (Huang *et al.*, 2001).

Fibroblastos semeados em suportes de TN purificada têm seu ciclo celular inibido por redução da atividade de cdk2 – importante para entrada na fase S - via ação de CKIs (inibidores de ciclinas). Em substratos mistos de TN/FN, também há diminuição de cdk2, porém, de maneira independente de CKIs (Orend *et al.*, 2003). A repressão da cdk2 pela TN/FN envolve o sindecán-4, visto que a superexpressão deste proteoglicano membranar restabelece a proliferação celular. O efeito da TN nos fibroblastos é, portanto, o de bloquear a progressão do ciclo celular, causando a parada (*arrest*) na fase G0/G1. Já em células tumorais, a TN-C tem efeito indutor da proliferação e não causa repressão de cdk2, inclusive em gliomas. Parece que células tumorais tornaram-se independentes do controle do ciclo celular pela adesão ao aumentaram a expressão de ciclinas e cdk2 (Orend *et al.*, 2003).

Diante dessas evidências de outros trabalhos, fica claro o envolvimento da TN-C na modulação das propriedades adesivas da FN e o potencial desta glicoproteína matricelular em regular a proliferação e as etapas do ciclo celular, em células de tumores e em fibroblastos. Dados experimentais que detalhem estes aspectos no âmbito das células endoteliais são praticamente inexistentes. Desta maneira, nos interessamos em verificar se anticorpos anti-TN eram capazes de interferir nos eventos endoteliais que estudamos neste trabalho.

5.5. O envolvimento da TN-C na eficiência tubulogênica

Pudemos dispor de um anticorpo monoclonal dirigido contra o domínio N-terminal da proteína (de homologia ao EGF), altamente conservado nas várias isoformas de TN. Alguns autores mostraram que, apesar de ser chamado de porção não-adesiva da TN-C, o domínio EGF-like desta glicoproteína mostrou ser um ótimo substrato permissivo ao crescimento de neuritos, comparável à laminina (Fischer *et al.*, 1997). Este domínio induziu ainda, a adesão e espalhamento de fibroblastos. A proteína recombinante TN-C/EGF⁻ (faltando a porção EGF-like) inibiu em 50% a adesão dos fibroblastos à FN, mais que os domínios conhecidos como adesivos da molécula, o domínio fibrinogênio globular e as repetições tipo III da FN da TN-C. Em nossos ensaios, o bloqueio da porção EGF-like da TN não interferiu na desaderência endotelial observada a partir de 4 horas de cultivo, sugerindo que esta porção da TN não estaria envolvida no reconhecimento inicial da TN pelas HUVECs, além de também sugerir que também não esteja, por isso, envolvida na sinalização de apoptose endotelial na MEC de glioma. Além disso, pudemos observar que o efeito da matriz de U373 na desaderência de células endoteliais é abolido pela sincronização em G0/G1, fato que sugere que as competências adesivas das células nesta fase do ciclo as permitem reconhecer e aderir de maneira estável na matriz tumoral. Uma hipótese para explicar esta diferença entre as duas populações endoteliais comparadas (sincronizadas e não sincronizadas/heterogêneas), seria uma menor expressão de receptores de adesão em células já comprometidas com a replicação celular, o que levaria à possibilidade da *anoikis* ser decorrente mais de uma limitação adesiva de células endoteliais em fases S/G2/M, do que da composição da matriz do glioma.

No entanto, o resultado obtido com o anticorpo anti-TN não seria suficiente, até o momento, para se excluir totalmente um papel da TN na indução na *anoikis* endotelial e nos demais eventos celulares relacionados à angiogênese aqui estudados, uma vez que outros domínios estruturais da proteína, não reconhecidos pelo anticorpo, poderiam estar envolvidos. Nós testamos ainda a

capacidade deste anticorpo interferir nos efeitos da matriz do glioma na tubulogênese. Nossos resultados mostraram que o domínio *EGF-like* da porção N-terminal da TN-C está envolvido na sinalização que leva à má organização em estruturas tipo-capilares das células endoteliais em matriz de glioma. O bloqueio desta região da TN-C das matrizes secretadas pelo glioma restabeleceu uma melhor qualidade das estruturas tubulares *in vitro*.

Apesar das várias questões ainda em aberto, os dados aqui apresentados apontam claramente para um papel da TN de origem tumoral no processo angiogênico, um fato já relatado por outros autores, mas cujos mecanismos subjacentes continuam inexplicados. A tenascina C é predominantemente encontrada ao redor dos vasos recém-formados de gliomas (Kim *et al.*, 2000; Rascher *et al.*, 2002; Leins *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Behrem *et al.*, 2005). Em modelos de transmigração *in vitro*, foi sugerido um papel para a TN-C na contribuição angiogênica, uma vez que células de glioma U251 migram e aderem melhor sobre FN, ao passo que células endoteliais de retina bovina (BRE) e HUVECs migram melhor sobre a TN-C (Zagzag *et al.*, 2002).

Diferentes isoformas de TN-C podem ser geradas por processamento alternativo do transcrito primário e em tecidos neoplásicos a geração destas isoformas se encontra regulada de forma aberrante (Jones e Jones, 2000). Foi identificada uma isoforma de TN-C cuja expressão é muito específica dos astrocitomas malignos de grau IV, encontrada principalmente ao redor de vasos (Carnemolla *et al.*, 1999). Não sabemos no momento qual a isoforma expressa pela linhagem U373. Porém o efeito especificamente obtido na melhoria da capacidade tubulogênica de células em G0/G1, pela neutralização de matrizes do glioma com anticorpo anti-TN domínio-específico, levanta a importância de se conhecer em detalhes a composição dos domínios das tenascinas tumorais.

Não foi possível, até o presente, propor ainda uma explicação para o fato de que a população endotelial que sobrevive à matriz do glioma U373 adquirir uma melhor capacidade proliferativa. A TN-C diminui a expressão de moléculas envolvidas na estabilidade genética, como Bard1 (Orend *et al.*, 2003). Células que estariam, por ação da TN-C, instáveis geneticamente e em plena progressão do ciclo celular morreriam por apoptose como mecanismo de defesa, caso o reparo não fosse possível. Células em G0/G1 poderiam reparar danos no DNA e por isso, ser mais resistentes à apoptose. Além disso, a TN-C induz a expressão de c-myc em células epiteliais mamárias cultivadas em plástico ou colágeno tipo I, um proto-oncogene que induz progressão do ciclo celular, independência de ancoragem e apoptose. O cultivo das células epiteliais mamárias em Matrigel[®]

impediu a apoptose e diminuiu a expressão de c-myc. Isto indica que a expressão de c-myc está dependente da composição do substrato em que a célula está aderida (Boudreau *et al.*, 1996). O impedimento de adesão ao substrato nestas células leva ao bloqueio do ciclo celular em G1 e diminuição da expressão de c-myc. Já uma indução de expressão de c-myc nestas células privadas da adesão, leva à independência de ancoragem e progressão do ciclo celular por ativação do complexo cdk2 (Benaud & Dickson, 2001). Assim, podemos especular se as células sincronizadas em G0/G1 adquiriram, por aumento de expressão de c-myc, independência de ancoragem e por isso tenham resistido a *anoikis*, ao contrário das células endoteliais em fases distintas do ciclo celular (S/G2/M). Uma vez que detectamos que os eventos de desaderência, proliferação e diferenciação estão associados à regulação do ciclo celular e à presença de TN nas matrizes tumorais, as estratégias a serem adotadas na continuidade deste trabalho deverão incluir uma criteriosa análise dos níveis de ativação e/ou expressão de componentes do ciclo celular, bem como contar com um painel mais variado de ferramentas para o estudo da TN-C (e.g., um conjunto mais abrangente de anticorpos; manipulação da expressão de TN pelas células tumorais, etc).

A contribuição de outros possíveis mecanismos para o evento da *anoikis* endotelial não foi ainda suficientemente explorada. É possível que as células endoteliais estejam entrando em *anoikis* por degradação dos componentes matriciais induzidos pelo balanço de TN/FN que induziria um efeito autócrino de expressão e secreção de proteases. O envolvimento de proteases já foi proposto na apoptose de células em cultura em ausência de soro (Michel, 2003). A clivagem proteolítica pericelular pode liberar e solubilizar proteínas ligadas à membrana plasmática, libertar fatores seqüestrados/ligados à MEC ativando-os (ex: TGF- β) e quebrar e solubilizar as próprias proteínas componentes da MEC. A importância do balanço de TN/FN já foi demonstrada em sistemas de reparo de injúrias em tecidos conjuntivos. A presença de TN-C em áreas de remodelamento tecidual levou à investigação se essa proteína matricelular poderia induzir a expressão de metaloproteinases. A TN-C imobilizada a substratos que já contém FN induziu a secreção de metaloproteinases (colagenase) por fibroblastos. A adição de TN-C solúvel a substratos de FN não teve o mesmo efeito sugerindo que a importância da imobilização da TN-C para a sua função (Tremble *et al.*, 1994). A baixa quantidade de FN nas MECs de glioma, parece favorecer a migração tumoral (Ruoslahti, 1999), contudo, é plausível que também possa exercer efeitos na célula endotelial. A MEC é continuamente remodelada pela deposição e remoção controlada de componentes específicos. A FN regula a adesão e o espalhamento da célula endotelial de maneira dose-dependente. E a morfologia celular está intimamente relacionada à conversão de pró-MMP-2 (pró-

metaloproteinase-2) em MMP-2 ativa. Células endoteliais de capilar humano (HCE), quando cultivadas sobre baixas densidades de FN imobilizada (10 ng/cm²), apresentam morfologia arredondada e secretam cerca de 5 vezes mais MMP-2 ativa do que as HCE aderidas e bem espalhadas sobre altos níveis de FN - 2500 ng/cm² (Yan *et al.*, 2000).

A melhora na capacidade tubulogênica das HUVECs obtida com o bloqueio da porção EGF-*like* da TN-C matricial de glioma, poderia ser considerada como uma estratégia de **normalização** da vasculatura tumoral. A normalização de vasos tem sido descrita como uma proposta alternativa à terapia anti-angiogênica ao melhorar a estrutura e função dos vasos sanguíneos, diminuindo a hipóxia e permitindo maior acesso às drogas terapêuticas (Jain, 2005). Esta proposta tem tido uma recepção controversa por parte da comunidade científica envolvida na pesquisa da angiogênese, porém tem sido divulgada em periódicos de elevado impacto (Winkler *et al.*, 2004; Batchelor *et al.*, 2007). A apoptose endotelial, conforme já descrevemos nesta *Discussão*, parece ter um papel real na consolidação da angiorquitetura. Um trabalho recente mostrou uma importante função e envolvimento das células endoteliais apoptóticas durante a formação de *sprouts* (processos endoteliais que irão originar as estruturas tipo-capilares contendo lúmen). As células endoteliais apoptóticas possuem carga negativa pela externalização da fosfatidilserina e atraem as células endoteliais viáveis que formam *sprouts* em suas direções por atração eletrostática (Weihua *et al.*, 2005) sem nenhum envolvimento de VEGF e seus receptores nesta etapa. Trazendo esta informação à interpretação de nossos dados, é possível imaginar que a co-existência das células endoteliais com capacidade proliferativa aumentada, no microambiente tumoral, apesar de terem sua capacidade tubulogênica comprometida, possam ainda formar tubos devido à proximidade com a população endotelial apoptótica. Estes vasos não seriam, por certo, plenamente funcionais, mas vez por outra ocorreria o estabelecimento de fluxo sanguíneo em porções do tecido tumoral. Trabalhos como o nosso mostram que as respostas das diversas populações celulares às manipulações do microambiente tumoral são variáveis e devem ser consideradas quando da adoção de terapias anti-angiogênicas, cujo objetivo primordial têm sido o de induzir a apoptose de vasos neoformados no tumor.

5.6 – Nossa contribuição ao modelo proposto de co-optação vascular por células tumorais gliais

A **Figura 24** representa um cenário possível para um papel da apoptose no curso da angiogênese dos gliomas, tendo como base nossos dados e de outros grupos aqui mostrados e discutidos (mais informações na legenda da Figura). Na verdade, o tumor deve ser visto como um tipo de tecido complexo, no qual células mutantes recrutam e reprogramam células normais (células endoteliais, fibroblastos e células do sistema imune) que resultam em ativos colaboradores na neoplasticidade (Hanahan & Weiberg, 2000). Esta visão, na verdade, não é nova. Ela foi lançada há mais de um século, em um trabalho histórico de Stephen Paget (1889, republicado em 1989), que delineou a hipótese da “semente e do solo”: no primeiro número do *Lancet*, ele propôs que o microambiente de cada órgão (o solo) influencia a sobrevivência e o crescimento das células tumorais (as sementes), definindo em última instância que órgão será preferencialmente colonizado, caso o tumor se dissemine pelo organismo. Em um trabalho clássico, Mintz (1975) demonstrou que células de carcinoma embrionário, quando injetadas em blastocistos, perdem sua tumorigenicidade, contribuindo para o desenvolvimento de tecidos adultos saudáveis.

Portanto, questionamos neste trabalho, se a MEC do glioma, que também faz parte deste microambiente tumoral, poderia gerar sinalizações e respostas nas células endoteliais e nos ajudar a compreender mais sobre a interação íntima e complexa do glioma com o endotélio. Uma revisão recente aborda o problema do microambiente no câncer, deixando bastante clara a idéia de que “o microambiente tumoral é uma parte integrante de sua anatomia e fisiologia, não podendo ser dissociado daquilo que tradicionalmente se convencionou chamar de célula tumoral” (Albini e Sporn, 2007). Trabalhos recentes mostraram que os efeitos apoptóticos, anti-migratórios e anti-proliferativos da endostatina, um dos inibidores de angiogênese considerados mais promissores e já em avançados protocolos clínicos nos EUA, foram totalmente dependentes da composição da matriz em contato com as células endoteliais (Addison et al, 2005; Delaney et al, 2006). A matriz extracelular aparece como um alvo fundamental, conforme já proposto por outros autores (Sanz & Alvarez-Vallina, 2003; Delaney, 2006), a ser melhor conhecido e, eventualmente, manipulado de forma a produzir um microambiente menos favorável ao desenvolvimento das neoplasias.

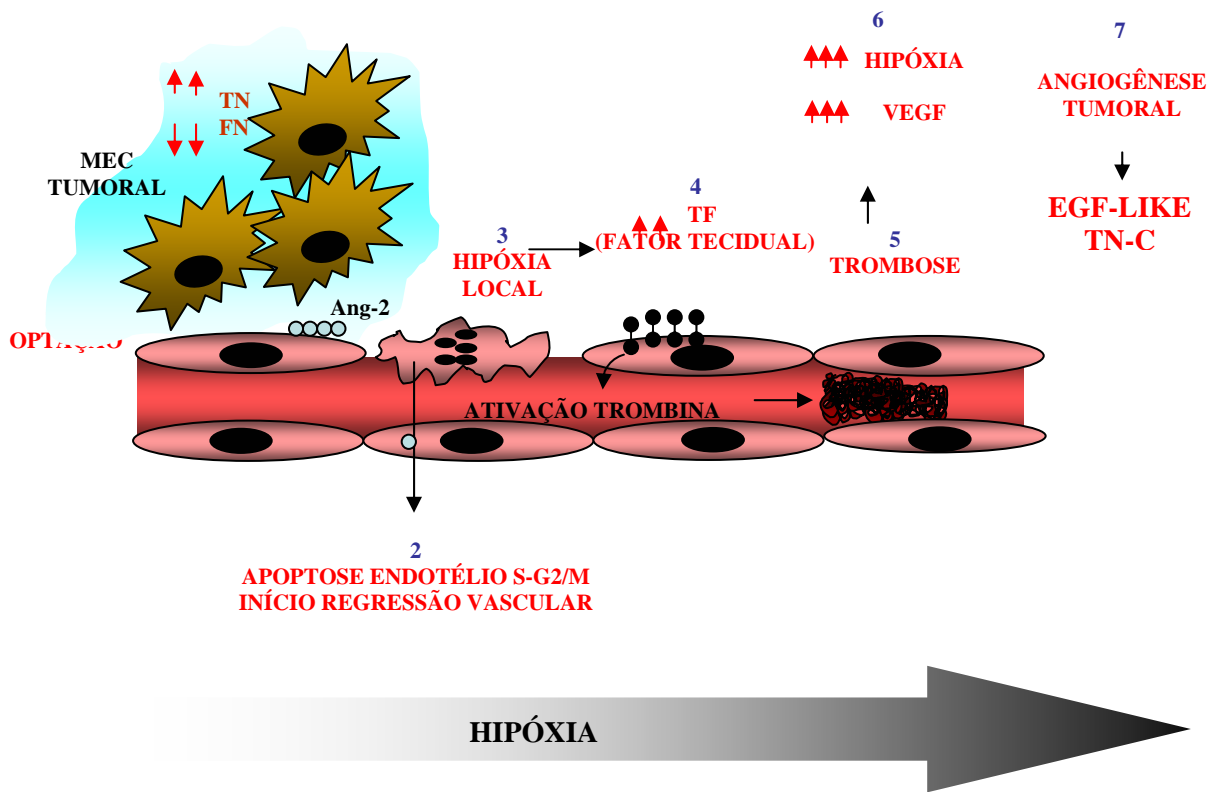


Figura 24. Modelo esquemático da indução de apoptose endotelial em fase S-G2/M na cooptação de células de glioma humano *in vivo*. A contribuição ativa da matriz extracelular (MEC) tumoral na indução de apoptose endotelial e regressão vascular durante a progressão maligna do glioblastoma. Os eventos seguem da esquerda para a direita, conforme indica a seta cinza. 1) Cooptação das células de glioma nos vasos sanguíneos nativos; O tumor em proliferação se nutre através de moléculas que passam por difusão; 2) a MEC do glioma contendo altas taxas de TN-C e pequenas taxas de FN, induz desaderência e *anoikis* nas células endoteliais em fase S-G2/M; 3) com esta regressão vascular, há hipóxia local 4) indução de expressão de TF (fator tecidual) pelas células tumorais e endoteliais e também um aumento na secreção de VEGF; O TF é uma glicoproteína membranar que se liga ao fator VII do plasma e cliva a pró-trombina em trombina causando agregação plaquetária e deposição de fibrina; 5) formação de trombos nos vasos e consequente grande aumento na hipóxia; 6) indução da expressão de VEGF pelas células hipóxicas; o impedimento de fluxo sanguíneo nos segmentos dos capilares causará o aparecimento de vários focos necróticos/hipóxicos na massa tumoral em expansão; 7) consequente angiogênese tumoral pelo crescente aumento de VEGF; o domínio EGF-like da TN-C age nas células endoteliais remanescentes e está envolvido na má qualidade vascular. Adaptado de Zagzag *et al.*, 2000; Rong *et al.*, 2006.

6. Conclusão

1) A MEC de glioma é permissiva à adesão inicial de células endoteliais, contudo não mantém a adesão das últimas;

2) O domínio EGF-like da TN-C não está envolvido na aderência ou *anoikis* das HUVECs em MECs de glioma;

3) A MEC de glioma humano induz acentuada *anoikis* endotelial provavelmente pelo balanço TN/FN;

4) Fatores solúveis secretados pelo glioma não revertem o efeito apoptótico induzido pela MEC de gliomas;

5) A *anoikis* endotelial não é um evento particular de gliomas, sendo vista na interação endotelial com outras MECs de linhagens tumorais, como carcinoma mamário (MCF-7) e carcinoma uterino (U79);

6) Células endoteliais quiescentes são mais resistentes à *anoikis* induzida por MEC de glioma;

7) Células endoteliais que resistiram à *anoikis* recebem sinalização da MEC de glioma e tornam-se mais proliferativas, porém, não são capazes de formar estruturas tipo-capilares;

8) O domínio EGF-like da TN-C está diretamente envolvido na sinalização para a má formação das estruturas tipo-capilares somente nas HUVECs que foram cultivadas em MECs de glioma

7. Perspectivas:

1) Confirmar os resultados obtidos por sincronização de células endoteliais em fase G0/G1 no cultivo com as MECs de glioma;

2) Analisar se o domínio *EGF-like* da TN-C está envolvido também na indução de proliferação endotelial das HUVECs que resistiram à *anoikis* pela MEC de gliomas;

3) Analisar o possível envolvimento dos outros domínios da TN-C nas MECs de glioma;

4) Silenciar (siRNA) nas células de glioma humano a expressão de TN-C a fim de analisar a aderência/*anoikis* endotelial;

5) Dosar cisteíno-catepsinas no MC de HUVECs cultivadas sobre as MECs e estudar sua possível indução e efeito autócrino na *anoikis*;

6) Analisar a possível indução de expressão de VEGF e flk-1 (VEGR2) nas células endoteliais pela TN-C de gliomas; e caso haja um efeito indutor, analisar se o bloqueio da ligação VEGF/flk-1 melhora a formação das estruturas tipo-capilares nas HUVECs que resistiram a *anoikis* induzida pela MEC de glioma.

8. Referências Bibliográficas

- Abbott, NJ (2002). "Astrocyte-endothelial interactions and blood brain barrier permeability". 200; 629-638.
- Addison CL, Nor JE, Zhao H, Linn SA, Polverini PJ, Delaney CE. (2005) "The response of VEGF-stimulated endothelial cells to angiostatic molecules is substrate-dependent" *BMC Cell Biol.* 31:6:38.
- Aguzzi, MS; Giampietri, C; De Marchis, F; Padula, F; Gaeta, R; Ragone, G; Capogrossi, MC; Facchiano, A (2004) "RGDS peptide induces caspase 8 and caspase 9 activation in human endothelial cells" *Hemostasis, Thrombosis and vascular biology*, 103: 4180-4187.
- Akerman, M; Pilch, J; Peters, D; Ruoslahti, E (2005) "Angiostatic peptides use plasma fibronectin to home to angiogenic vasculature" *PNAS*, 102: 2040-2045.
- Albini A, Sporn MB. (2007) "The tumour microenvironment as a target for chemoprevention" *Nat Rev Cancer.* 7:139-47.
- Annabi, B; Torcotte, S; Naud, E; Desrosiers, RR; Champagne, M; Eliopoulos, N; Galipeau, J; Béliveau, R (2003) "Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tumor formation" *Stem Cells* 21:337-347.
- Aoudjit, F; Vuori, K (2005) "matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-FLIP and implications for anoikis" *The J Cell Biol*, 6: 633-643.
- Arai, F; Hirao, A; Suda T (2005) "regulation of hematopoietic stem cells by the niche" *Trends cardiovascular Med*, 15: 75-9.
- Arismendi-Morillo, G; Castellano, A (2005) "Tumoral micro-blood vessels and vascular microenvironment in human astrocytic tumors. A transmission electron microscopy study" *J Neuro-Oncol* 73: 211-217.
- Armstrong, LC; Bornstein, P (2003) "Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis" *Matrix Biology*, 22: 63-71.
- Arosarena, O; Guerin, C; Brem, H; Laterra, J (1994) "Endothelial differentiation in intracerebral and subcutaneous experimental gliomas" *Brain res* 640: 98-104.
- Asahara, T Kawamoto, A (2004) "Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis" *Am J Physiol Cell Physiol*, 287:C572-9.
- Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hohenester E, Jones JC, Kleinman HK, Marinkovich MP, Martin GR, Mayer U,

- Meneguzzi G, Miner JH, Miyazaki K, Patarroyo M, Paulsson M, Quaranta V, Sanes JR, Sasaki T, Sekiguchi K, Sorokin LM, Talts JF, Tryggvason K, Uitto J, Virtanen I, von der Mark K, Wewer UM, Yamada Y, Yurchenco PD. (2005) "A simplified laminin nomenclature" *Matrix Biol*, 24:326-32.
- Bart J, Groen HJ, Hendrikse NH, van der Graaf WT, Vaalburg W, de Vries EG. (2000) "The blood-brain barrier and oncology: new insights into function and modulation" *Cancer Treat Rev*. 26:449-62
- Bart, J; Groen, HJM; Hendrikse, NH; de Graaf, WTA; Vaalburg, W; de Vries, EGE (2000) "The blood-brain barrier and oncology: new insights into function and modulation" *Cancer Treatment Reviews*, 26:449-462.
- Batchelor TT, Sorensen AG, di Tomaso E, Zhang WT, Duda DG, Cohen KS, Kozak KR, Cahill DP, Chen PJ, Zhu M, Ancukiewicz M, Mrugala MM, Plotkin S, Drappatz J, Louis DN, Ivy P, Scadden DT, Benner T, Loeffler JS, Wen PY, Jain RK. (2007) "AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients" *Cancer Cell*, 11:83-95.
- Behrem, S; Zarkovic, K; Eskinja, N; Jonic, N (2005) "Distribution pattern of tenascin-C in glioblastoma: correlation with angiogenesis and tumor cell proliferation" *Pathol Oncol Research*, 11: 229-235.
- Behzadian MA, Wang XL, Jiang B, Caldwell RB. (1995) "Angiostatic role of astrocytes: suppression of vascular endothelial cell growth by TGF-beta and other inhibitory factor(s)" *Glia*, 15:480-90.
- Bellail, AC; Hunter, SB; Brat, DJ; Tan, C; Van Meir, EG (2004) "Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion" *The international journal of biochemistry & cell biology* 36: 1046-1069.
- Benaud CM, Dickson RB. (2001) "Adhesion-regulated G1 cell cycle arrest in epithelial cells requires the downregulation of c-Myc" *Oncogene*, 20:4554-67.
- Berger, F; Gay, E; Pelletier, L; Tropel, P; Wion, D (2004) "Development of gliomas: potential role of asymmetrical cell division of neural stem cells". *The Lancet* 5:511-514.
- Bergers, G; Benjamin, LE (2003) "Tumorigenesis and the angiogenic switch" *Nature Reviews* 3: 401-410.
- Bertolini, F; Shaked, Y; Mancuso, P; Kerbel, RS (2006) "The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification" *Nature Review*, 6: 835-844.

- Bian XW, Jiang XF, Chen JH, Bai JS, Dai C, Wang QL, Lu JY, Zhao W, Xin R, Liu MY, Shi JQ, Wang JM. (2006) "Increased angiogenic capabilities of endothelial cells from microvessels of malignant human gliomas" *Int Immunopharmacol*, 6:90-9.
- Bian, X-w; Jiang, X-f; Chen, J-h; Bai, J-s; Dai, C; Wang, Q-l; Lu, J-y; Zhao, W; Xin, R; Liu, M-y; Shi, J-q; Wang, JM (2006) "Increased angiogenic capabilities of endothelial cells from microvessels of malignant human gliomas" *Int Immunopharmacology* 6: 90-99.
- Bogdanov A Jr, Marecos E, Cheng HC, Chandrasekaran L, Krutzsch HC, Roberts DD, Weissleder R. (1999) "Treatment of experimental brain tumors with thrombospondin-1 derived peptides: an in vivo imaging study" *Neoplasia*,1:438-45.
- Boudreau N, Werb Z, Bissell MJ. (1996) "Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle" *Proc Natl Acad Sci* 93:3509-13.
- Brat,D; van Meir, EG (2004) "Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma" *Lab Invest* 84: 397-405.
- Brown CK, Khodarev NN, Yu J, Moo-Young T, Labay E, Darga TE, Posner MC, Weichselbaum RR, Mauceri HJ. (2004) "Glioblastoma cells block radiation-induced programmed cell death of endothelial cells" *FEBS Lett*, 565:167-70.
- Bussolati B, Deambrosis I, Russo S, Deregibus MC, Camussi G. (2003) "Altered angiogenesis and survival in human tumor-derived endothelial cells" *FASEB J*, 17:1159-61.
- Carnemolla B, Castellani P, Ponassi M, Borsi L, Urbini S, Nicolo G, Dorcaratto A, Viale G, Winter G, Neri D, Zardi L. (1999) "Identification of a glioblastoma-associated tenascin-C isoform by a high affinity recombinant antibody" *Am J Pathol*, 154:1345-52.
- Castellani, P; Borsi, L; Camemolla, B; Biro, A; Dorcaratto, A; Viale, GL; Neri, D; Zardi, L (2002) "Differentiation between high- and low-grade astrocytoma using a human recombinant antibody to the extra domain-B of fibronectin" *American J Pathol*, 161: 1695-1700.
- Chandrasekaran L, He CZ, Al-Barazi H, Krutzsch HC, Iruela-Arispe ML, Roberts DD. (2000) "Cell contact-dependent unctio n of $\alpha 3\beta 1$ integrin modulates endothelial cell responses to thrombospondin-1" *Mol. Biol. Of the Cell*, 11, 2885-2900.
- Chang, Y; di Tomaso, E; McDonald, DM; Jones, R; jain, RK; Munn, LL (2000) "Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with blood flowing blood" *PNAS*, 97: 14608-14613.

- Charalambous C, Hofman FM, Chen TC. (2005) "Functional and phenotypic differences between glioblastoma multiforme-derived and normal human brain endothelial cells" *J Neurosurg*.102:699-705.
- Charalambous, C; Chen, TC; Hofman, FM (2006) "Characteristics of tumor-associated endothelial cells derived from glioblastoma multiforme" *Neurosurg Focus* 20: 1-5.
- Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP. (2004) "Connective tissues: signalling by tenascins" *Int J Biochem Cell Biol*. 36:1085-9.
- Choi, K. (1998) Hemangioblast development and regulation. *Biochem Cell Biol*. 76:947-56.
- Cominetti MR, Terruggi CH, Ramos OH, Fox JW, Mariano-Oliveira A, De Freitas MS, Figueiredo CC, Morandi V, Selistre-de-Araujo HS. (2004) "Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro" *J Biol Chem*, 279:18247-55.
- Daumas-Duport, C; Sheithauer, B; O'Fallon, J; Kelly, P (1988). Grading of astrocytomas: a simple and reproducible method. *Cancer*, 62: 2152-2165.
- Davis, GE; Senger, DR (2005) "Endothelial extracellular matrix. Biosynthesis, remodeling and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization"
- De Fraipont F, Nicholson AC, Feige JJ, Van Meir EG. (2001) "Thrombospondins and tumor angiogenesis" *Trends Mol Med*. 2001, 7:401-407.
- Delaney CE, Weagant BT, Addison CL. (2006) "The inhibitory effects of endostatin on endothelial cells are modulated by extracellular matrix" *Exp Cell Res*. 312:2476-89.
- Denekamp, J (1984) "Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours" *Acta Radiol Oncol*. 23:217-25.
- DiPietro, L; Polverini, PJ (1993) "Angiogenic macrophages produce the angiogenic inhibitor thrombospondin-1" *Am J Pathol*, 143: 678-684.
- Duval, H; Johnson, EM; Li, J; Evans, A; Chen, S; Licence, D; Skepper, J; Jones, SC; Smith, S; Print, C (2007) "Vascular development is disrupted by endothelial cell-specific expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2" *Angiogenesis* 10:55-68
- Eng, LF; Ghirnikan, RS; lee, YL (2000) "Glial fibrillary acidic protein: GFAP - thirty-one years (1969-2000)" *Neurochem Res* 25: 1439-51.
- Engbring, JA; Kleinman, HK (2003) "The basement membrane matrix in malignancy" *J Pathol*, 200: 465-470.

- Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. (1998) "Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells" *J Cell Sci.*111:1853-65.
- Faouzia Zemani, Danielle Benisvy, Isabelle Galy-Fauroux, Anna Lokajczyk, Sylvia Collic-Jouault, Georges Uzan, Anne Marie Fischer, Catherine Boisson-Vidal (2005) "Low-molecular-weight fucoidan enhances the proangiogenic phenotype of endothelial progenitor cells" *Biochemical Pharmacology* 70: 1167–1175.
- Faria, J; Romão, L; Martins, S; Alves, T; Mendes, FA; De Faria, GP; Hollanda, R; Takiya, C; Chimelli, L; Morandi, V; De Souza, JM; Garcia-Abreu, J; Moura Neto, V (2006) "Interactive properties of human glioblastoma cells with brain neurons in culture and neuronal modulation of glial laminin organization" *Differentiation* 74: 562-572.
- Fears, CY; Gladson, C; Woods, A (2006) "Syndecan-2 is expressed in the microvasculature of gliomas and regulates angiogenic processes in microvascular endothelial cells" *J Biological Chem*, 281: 145333- 14536.
- Ferrari do Outeiro-Bernstein MA, Nunes SS, Andrade AC, Alves TR, Legrand C, Morandi V. (2002) 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.* 21:311-24.
- Figarella-Branger, D; Bouvier, C (2005) "Classification anatomopathologique des gliomes: faits et controverses" *Bulletin du cancer* 92:301-309.
- Fischer D, Brown-Ludi M, Schulthess T, Chiquet-Ehrismann R. (1997) "Concerted action of tenascin-C domains in cell adhesion, anti-adhesion and promotion of neurite outgrowth" *J Cell Sci.*110:1513-22.
- Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. (1971) Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis *J Exp Med*, 133, 275-288.
- Folkman, J (1995) "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease" *Nat Med*, 1: 27-31.
- Folkman, J (2000) "Can mosaic tumor vessels facilitate molecular diagnosis of cancer?" *PNAS*, 98: 398-400.
- Folkman, J (2003) Can mosaic tumor vessels facilitate molecular diagnosis of cancer? *PNAS*, 98:398-400.

- Freire, E; Coelho-Sampaio, T (2000) Self-assembly of laminin induced by acidic pH. *J Biol Chem.* 14; 275: 817-22
- Freire, E; Gomes, FC; Jotha-Mattos, T; Neto, VM; Silva Filho, FC; Coelho Sampaio, T (2004) “Sialic acid residues on astrocytes regulate neuritogenesis by controlling the assembly of laminin matrices”. *J Ceçç Sci.* 117: 4067-4076.
- Freire, E; Gomes, FCA; Linden, R; Moura neto, V; Coelho-Saampaio, T (2002) “Structure of laminin substrate modulates cellular signaling for neuritogenesis” *J Cell Science* 115: 4867-4876.
- Friedlander, DR; Zagzag, D; Shiff, B; Cohen, H; Allen, JA; Kelly, PJ; Grumet, M (1996) “Migration of brain tumor cells on extracellular matrix proteins in vitro correlates with tumor type and grade and involves α_v and β_1 integrins” *Cancer research* 56: 1939-1947.
- Garcia-Abreu J, Cavalcante LA, Moura Neto V. (1995) Differential patterns of laminin expression in lateral and medial midbrain glia. *Neuroreport.* 27; 6:761-4.
- Garcia-Abreu, J; Cavalcante, LA; Moura Neto, V (1995) “Differential patterns of laminin expression in lateral and medial midbrain glia” *NeuroReport* 6: 761-764.
- Giese, A; Rief, MD; Loo, MA; Berens, ME (1994) “Determinants of human astrocytoma migration” *Cancer research* 54: 3897-3904.
- Gladson, CL (1999) “The extracellular matrix of gliomas: modulation of cell function” *J Neuropathol Exp Neurol.* 58:1029-40.
- Gomes, FCA; Paulin, D; Moura Neto, V (1999) Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation *Braz J Med Biol Res* 32: 615:631.
- Gondi, CS; Lakka, SS; Dinh, DH; Olivero, WC; Gujrati, M; Rao, JS (2004a) “Downregulation of uPA, uPAR and MMP-9 using small, interfering, hairpin RNA (siRNA) inhibits glioma cell invasion, angiogenesis and tumor growth” *Neuron glia biology* 1: 165-176.
- Gondi, SG; Lakka, SS; Yanamandra, N; Olivero, WC; Dinh, DH; Gujrati, M; Tung, CH; Weissleder, R; Rao, JS (2004b) “Adenovirus-Mediated expression of antisense urokinase plasminogen activator receptor and antisense cathepsin B inhibits tumor growth, invasion, and angiogenesis in gliomas” *Cancer research* 64: 4069-4077.
- Greenhalgh, DG (1998) “The role of apoptosis in wound healing” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30: 1019-30

- Guerin, C., Laterra, J. (1997) Regulation of angiogenesis in malignant gliomas. In: Regulation of angiogenesis. Alemanha, ID Goldberg e EM Rosen (ed), 1997. 47-64.
- Guo N, Krutzsch HC, Inman JK, Roberts DD. (1997) "Thrombospondin-1 and type I repeat peptides of thrombospondin-1 specifically induce apoptosis of endothelial cells" *Cancer Res.*,571735-1742.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000) "The hallmarks of cancer" *Cell.* 100:57-70.
- Haskell, H; Natarajan, M; Hecker, TP; Ding, Q; Stewart, J; Grammer, R; Gladson, C (2003) "Focal adhesion kinase is expressed in the angiogenic blood vessels of malignant astrocytic tumors *in vivo* and promotes capillary tube formation of brain microvascular endothelial cells" *Clin Cancer Res* 9: 2157-2165.
- Hayashi, Y; Nomura, M; Yamagishi, S-I; Harada, S-I; Yamashita, J; Yamamoto, H (1997) "Induction of various blood brain barrier properties in non neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes" *Glia*, 19; 13-26.
- Hess, DC; Hill, WD; Martin-Studdard, A; Carrol, J; Brailer, J; Carothers, J (2002) "Bone Marrow as a source of endothelial cells and Neu-expressing cells after stroke" *Stroke*, 33: 1362-1368.
- Higuchi M, Ohnishi T, Arita N, Hiraga S, Hayakawa T. (1993) "Expression of tenascin in human gliomas: its relation to histological malignancy, tumor dedifferentiation and angiogenesis" *Acta Neuropathol* 85:481-7.
- Hochberg FH, Pruitt A. (1980) Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. *Neurology.* 30:907-11.
- Hochberg, FH, Pruitt, A (1980) Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. *Neurology*, 30, 907-911.
- Hsia, HC; Schwarzbauer, JE (2005) "Meet the tenascins: multifunctional and mysterious" 280: 26641-26644.
- Hsia, HC; Schwarzbauer, JE (2005) "Meet the tenascins: multifunctional and mysterious" 280: 26641-26644.
- Hsu, SC; Volpert, OV; Steck, PA; Polverini, PJ; Rao, S; Chou, P; Bouck, N (1996). "Inhibition of angiogenesis in human glioblastomas by chromosome 10 induction of thrombospondin-1" *Cancer Res.*, 56: 5684-5691.
- Huang, W; Chiquet-Ehrismann, R; Moyano, JV; Garcia-Pardo, A; Orend, G (2001) "Interference of tenascin-C with syndecan-4 binding to fibronectin blocks cell adhesion and stimulates tumor cell proliferation" *Cancer research*, 61: 8586-8594.

- Hulleman E, Boonstra J. (2000) "Regulation of G1 phase progression by growth factors and the extracellular matrix" *Cell Mol Life Sci.*, 58:80-93.
- Ilan N, Mahooti S, Madri JA. (1998) "Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis" *J Cell Sci.* 111:3621-31.
- 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, 2745-2756.
- Jain, RK (2005) "Antiangiogenic therapy for cancer: current and emerging concepts" *Oncology* 19:7-16. Review.
- Jiang B, Bezhadian MA, Caldwell RB. (1995) "Astrocytes modulate retinal vasculogenesis: effects on endothelial cell differentiation" *Glia*, 15:1-10.
- Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N. (2000) "Signals leading apoptosis inhibition of neovascularization by thrombospondin-1" *Nat. Med.*, 6, 41-48.
- Jones PL, Jones FS. (2000) "Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function" *Matrix Biol.* 19:581-96.
- Khodarev NN, Labay E, Darga T, Yu J, Mauceri H, Gupta N, Kataoka Y, Weichselbaum RR. (2004) "Endothelial cells co-cultured with wild-type and dominant/negative p53-transfected glioblastoma cells exhibit differential sensitivity to radiation-induced apoptosis" *Int J Cancer*, 109:214-9.
- Khodarev NN, Yu J, Labay E, Darga T, Brown CK, Mauceri HJ, Yassari R, Gupta N, Weichselbaum RR. (2003) "Tumour-endothelium interactions in co-culture: coordinated changes of gene expression profiles and phenotypic properties of endothelial cells" *J Cell Sci*, 15:1013-22.
- Kim CH, Bak KH, Kim YS, Kim JM, Ko Y, Oh SJ, Kim KM, Hong EK. (2000) "Expression of tenascin-C in astrocytic tumors: its relevance to proliferation and angiogenesis" *Surg Neurol.*54:235-40.
- Kim, CH; bak, KH; Kim, YS; Kim, JM; Ko, Y; Oh, SJ; Kim, KM; Hong, EK (2000) "Expression of tenascin-C in astrocytic tumors: its relevance to proliferation and angiogenesis" *Surg Neurol*, 54: 235-240.
- Kleihues P, Soylemezoglu F, Schauble B, Scheithauer BW, Burger PC. (1995) Histopathology, classification and grading of gliomas. *Glia* 15: 211-221.

- Kondo, T; Setoguchi, T; Taga, T (2004) "Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cell in the C6 glioma cell line". PNAS 101: 781-786.
- Kroger, S; Schroder, JE (2002) "Agrin in the developing CNS: new roles for a synapse organizer" News Physiol Sci, 59: 1296-316.
- Labat-Robert, J (2002) "Fibronectin in malignancy. Effect of age" Cancer Biol, 12: 187-195.
- Larsson, O; Dafgard, E; Engstrom, W; Zetterberg, A (1986) "Immediate effects of serum depletion on dissociation between growth in size and cell division in proliferating 3T3 cells" J Cell Physiol, 127:267-73.
- Lattera J, Goldstein GW. (1991) "Astroglial-induced in vitro angiogenesis: requirements for RNA and protein synthesis" J Neurochem. 57:1231-9.
- Lattera, J et al (1990) Astrocytes induce neural microvascular endothelial cells to form capillary-like structures in vitro.
- Lawler, J (2000) "The functions of thrombospondin-1 and -2" Curr Opin Cell Biol 12: 634-640.
- Lawler, J (2002) "Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth" J. Cell. Mol. Med., 6: 1-12.
- Le, DM; Besson, A; Fogg, DK; Waisman, DM; Goodyer, CG; Rewcastle, B; Yong, VW (2003) "Exploitation of astrocytes by glioma cells to facilitate invasiveness: a mechanism involving matrix metalloproteinase-2 and the urokinase-type plasminogen activator-plasmin cascade" The journal of neuroscience 23: 4034-4043.
- Leins A, Riva P, Lindstedt R, Davidoff MS, Mehraein P, Weis S. (2003) "Expression of tenascin-C in various human brain tumors and its relevance for survival in patients with astrocytoma" Cancer. 98:2430-9.
- Li, L; Connely, MC; Wetmore, C; Curran, T; Morgan, JI (2003) "Mouse embryos cloned from brain tumors" Cancer Research 63: 2733-2736.
- Ljubimova, JL; Fujita, M; Khazenzon, NM; Ljubimov, AV; Black, K (2006) "Changes in laminin isoform associated with brain tumor invasion and angiogenesis" Frontiers in Bioscience, 11: 81-88.
- Lotem, J; Sachs, L (2006) "Epigenetics and the plasticity of differentiation in normal and cancer stem cells". Oncogene 25: 7663-7672.
- Lugassy, C; Haroun, RI; Brem, H; Tyler, B; Jones, RV; Fernandez, PM; Patierno, SR; Kleinman, HK; Barnhill, RL (2002) "Pericytic-like angiotropism of glioma and melanoma cells" The American J Dermatopathol. 24: 473-478.

- Lyden, D; Hattori, K; Dias, S; Costa, C; Blaikie, P; Butros, L; Chadburn, A; Heissig, B; Marks, W; Witte, L; Wu, Y; Hicklin, D; Zhu, Z; Hackett, NR; Crystal, RG; Moore, MAS; Hajar, KA; Manova, K; Benezra, R, Rafii, S (2001) "Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth" *Nature Medicine*, 7: 1194-1201.
- Mead, PE; deconinck, AE; Huber, TL; Orkin, SH; Zon, LI (2001) "Primitive erythropoiesis in the xenopus embryo: the synergistic role of LMO-2, SCL and GATA-binding proteins" *development* 128: 2301-2308.
- Mercier, Frederic (2004) "Astroglia as a modulation interface between meninges and neurons" *Glia-Neuronal Signaling*, Ed Glenn I. Hatton and Valdimir Parpura, pp125-163, Kluwer Academic Publishers.
- Meredith, JE; Fazeli, B; Schwartz, MA (1993) "The extracellular matrix as a cell survivor factor" *Mol. Biol. Cell.* 4: 953-961.
- Meyer, GT; Matthias, LJ; Noack, L; vadas, MA; gamble, JR (1997) "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*, 249: 327-340.
- Mi H, Haeberle H, Barres BA. (2001) Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *J Neurosci.* 21(5):1538-47.
- Michel, J-B (2003) "Anoikis in the cardiovascular system" *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16: 2146-2154.
- Michiels, C (2003) "Endothelial cell functions" *J Cell Physiol*, 196: 430-443.
- Miebach S, Grau S, Hummel V, Rieckmann P, Tonn JC, Goldbrunner RH. (2006) "Isolation and culture of microvascular endothelial cells from gliomas of different WHO grades" *J Neurooncol*, 76:39-48.
- Millauer, B; Wизigmann-voos; Schaurch, H; Martinez R; Moller, NP; Risau W; Ullrich, A (1993) "High affinity VEGF binding and developmental expression suggest FLK-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis" *Cell*, 72: 835-46.
- Mintz B, Illmensee K. (1975) "Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells" *Proc Natl Acad Sci*, 72:3585-9.
- Mohamed, MM; Sloane, B (2006) "Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer" *Nature reviews* 6: 764-775.

- Morrone, FB; Oliveira, DL; Gamermann, P; Stella, J; Wolfchuck, S; Wink, MR; Meurer, L; Edelweiss, MIA; Lenz, G; Battastini, AMO (2006) “*In vivo* glioblastoma growth is reduced by apirase activity in a rat glioma model” BMC Cancer 6: 226-235.
- Moura Neto, V; Mallat, M; Jeantet, C; Prochiantz, A (1983) “Microheterogeneity of tubulin proteins in neuronal and glial cells from the mouse brain in culture” EMBO J 2: 1243-1248.
- Munn, LL (2003) “ Aberrant vascular architecture in tumor and its importance in drug-based therapies” Drugs Discovery Today 8: 396-403.
- Murphy-Ullrich, J (2001) “The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptative state?” The J Clin Investigation, 107: 785-790.
- Naganuma, H; Satoh, E; Asahara, T; Amagasaki, K; Watanabe, A; satoh, H; Kuroda, K; Zhang, L; Nukui, H (2004) “Quantification of thrombospondin-1 secretion and expression of $\alpha v \beta 3$ and $\alpha 3 \beta 1$ integrins and syndecan-1 as cell-surface receptors for thrombospondin-1 in malignant glioma cells” J neuro-Oncology, 70: 309-317.
- Nakano, A; Tani, E; Miyazaki, K; Yamamoto, Y; Furuyama, J (1995) “Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gliomas”. J Neurosurgery 83: 298-307.
- Neuwelt EA, Howieson J, Frenkel EP, Specht HD, Weigel R, Buchan CG, Hill SA. (1986) Therapeutic efficacy of multiagent chemotherapy with drug delivery enhancement by blood-brain barrier modification in glioblastoma. Neurosurgery. 19:573-82.
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. (1997) Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell. 24;88:277-85.
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. (1994) Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. Cell. 21;79:315-28.
- Orend G, Chiquet-Ehrismann R. (2006) “Tenascin-C induced signaling in cancer” Cancer Lett, 244:143-63.
- Orend G, Huang W, Olayioye MA, Hynes NE, Chiquet-Ehrismann R. (2003) “Tenascin-C blocks cell-cycle progression of anchorage-dependent fibroblasts on fibronectin through inhibition of syndecan-4” Oncogene, 22:3917-26.
- Orend, G (2005) “Potential oncogenic action of tenascin-C in tumorigenesis” The international journal of biochemistry & cell biology, 37: 1066-1083.

- Pallud, J; Devaux, B; Daumas-Duport, C; Oppenheim, C; Roux, FX (2005) "Glioma dissemination along the corticospinal tract" *Journal of neuro-oncology* 73: 239-240.
- Parangi S, O'Reilly M, Christofori G, Holmgren L, Grosfeld J, Folkman J, Hanahan D. (1996) Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Mar 5;93(5):2002-7.
- Pierce, GB (1983) The cancer cell and its control by the embryo. Rous-Whipple Award lecture. *Am J Pathol.* 113:117-24.
- Pietsch T, Wiestler OD. (1997) Molecular neuropathology of astrocytic brain tumors. *J Neurooncol.* 35:211-22.
- Plate, KH; Risau, W (1995). Angiogenesis in malignant gliomas. *Glia*, 15: 339-347.
- Pozzetto, U; Aguzzi, MS; Maggiano, N; Scala, E; Capelli, A; Castagneto, M; Capogrossi, MC; Citterio, F; Serino, F; Facchiano, A (2005) "RGDS peptide inhibits activation of lymphocytes and adhesion of activated lymphocytes to human umbilical vein endothelial cells *in vitro*" *Immunol Cell Biol*, 83: 25-32.
- Qian X, Wang TN, Rothman VL, Nicosia RF, Tuszynski GP.(1997) Thrombospondin-1 modulates angiogenesis *in vitro* by up-regulation of matrix metalloproteinases-9 in endothelial cells. *Experimental cell research*, 235, 403-412.
- Qian X; Tuszynski GP.(1997) "Expression of thrombospondin-1 in cancer: a role in tumor progression" *PSEBM*, 212: 199-207.
- Ramsauer, M; Krause, D; Dermietzel, R (2002) "Angiogenesis of the blood brain barrier *in vitro* and the function of cerebral pericytes". *FASEB J*, 21: 1274-1276.
- Rao, JS (2003) "Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases" *Nature reviews* 3: 489-501.
- Rascher G, Fischmann A, Kroger S, Duffner F, Grote EH, Wolburg H.(2002) "Extracellular matrix and the blood-brain barrier in glioblastoma multiforme: spatial segregation of tenascin and agrin" *Acta Neuropathol (Berl)*. 104:85-91
- Rascher, G; Fischmann, A; Kroger, S; Duffner, F; Grote, E-H; Wolburg, H (2002) "Extracellular matrix and the blood-brain barrier in glioblastoma multiforme: spatial segregation of tenascin and agrin" *Acta Neuropathol*, 104: 85-91.
- Rataboul, P; Faucon Biguet N; vernier, P; De Vitry, F; Boularand, S; Privat, A; Mallet, J (1988) "Identification of a human glial fibrillary acidic protein cDNA: a tool for the molecular analysis of reactive gliosis in the mammalian CNS" *J neurosci Res*, 20: 165-75.

- Raynaud, F; Marcilhac, A (2006) "Implication of calpain in neuronal apoptosis: a possible regulation of Alzheimer's disease" FEBS Journal 273 3437-3443.
- Raza, SM; Lang, FF; Aggarwal, BB; Fuller, GN; Wildrick, DM; Sawaya, R (2002) "Necrosis and glioblastoma: a friend or a foe? A review and a hypothesis 51: 2-13.
- Re F, Zanetti A, Sironi M, Polentarutti N, Lanfrancone L, Dejana E, Colotta F. (1994) Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. The J. Cell Biol., 127, 537-546.
- Risau, W (1995) Differentiation of endothelium FASEB J. 9(10):926-33.
- Rothstein, JD; Brem, H (2001) "Excitotoxic destruction facilitates brain tumor growth" Nature medicine 7: 994-995.
- Rozenfeld, C; Martinez, R; Figueiredo, RT; Bozza, MT; Lima, FRS; Pires, AL; Silva, PM; Adriana Bonomo, A; Lannes-Vieira, J; De Souza, W; Moura-Neto, V (2003) "Soluble Factors Released by *Toxoplasma gondii*-Infected Astrocytes Down-Modulate Nitric Oxide Production by Gamma Interferon-Activated Microglia and Prevent Neuronal Degeneration" Infection and Immunity, 71: 2047-2057
- Rucklidge GJ, Dean V, Robins SP, Mella O, Bjerkvig R. (1989) "Immunolocalization of extracellular matrix proteins during brain tumor invasion in BD IX rats" Cancer Res. 1989 Oct 1;49(19):5419-23.
- Ruoslahti, E (1999) "Fibronectin and its integrin receptors in cancer" Advances in cancer research, in press.
- Sage, EH (1997) "Terms of attachment: SPARC and tumorigenesis" Nat Med.3:144-6.
- Sanai, N; Alvarez-Buylla, A; Berger, MS (2005) "Neural stem cells and the origin of gliomas. The new England Journal of Medicine 353: 811-822.
- Sanson, M; Thillet, J; Hoang-Xuan, K (2004) "Molecular changes in glioma". Current opinion in Oncology 16: 607-613.
- Santarelli, JG; Udani, V; Yung, YC, Cheshier, S; Wagers, A; Brekken, RA; Weissman, I; Tse, V (2006) "Incorporation of bone marrow-derived Flk-1 expressing CD34+ cells in the endothelium of tumor vessels in the mouse brain" Neurosurgery, 59: 374-382.
- Sanz L, Alvarez-Vallina L. (2003) "The extracellular matrix: a new turn-of-the-screw for anti-angiogenic strategies" Trends Mol Med, 9:256-62.

- Sanz, L; Feojóo, M; Blanco, B; Serrano, A; Álvarez-Vianna, L (2003) “generation of non-permissive basement membranes by anti-laminin antibody fragments produced by matrix-embedded gene-modified cells” *Cancer Immunol Immunother*, 52:643-647.
- Schwarzbauer, JE; (1992) “Fibronectin: from gene to protein” *Curr. Opin. Cell Biol.* 3: 780.
- Segura I, Serrano A, De Buitrago GG, Gonzalez MA, Abad JL, Claveria C, Gomez L, Bernad A, Martinez-A C, Riese HH. (2002) “Inhibition of programmed cell death impairs in vitro vascular-like structure formation and reduces in vivo angiogenesis” *FASEB J*, 16:833-41.
- Shibuya, M (2006) “Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis” *J Biochem and Mol Biol* 39: 469-478.
- Sontheimer, H (2003) “Malignant gliomas: perverting glutamate and ion homeostasis for selective advantage” *TRENDS in neuroscience* 26: 543-549.
- SoRelle, R (1998) “Two sides of the same coin: stop angiogenesis for cancer and encourage it for coronary artery disease” *Circulation*. 98: 383-4.
- Sottile J, Hocking DC. (2002) “Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions” *Mol Biol Cell*. 13:3546-59.
- Strojnik, T; Kos, J; Zidanik, B; Golouh, R; Lah, T (1999) “Cathepsin B immunohistochemical staining in tumor and endothelial cells is a new prognostic factor for survival in patients with brain tumors” *Clinical cancer research* 5: 559-567.
- Taraboletti G, Morbidelli L, Donnini S, Parenti A, Granger HJ, Giavazzi R, Ziche M. (2000) “The heparin binding 25 Kda fragment of thrombospondin-1 promotes angiogenesis and modulates gelatinase and TIMP-2 production in endothelial cells” *FASEB J.*, 14, 1674-1676.
- Tertemiz, F; Kayisli, UA; Arici, A; Demir, R (2005) “Apoptosis Contributes to Vascular Lumen Formation and Vascular Branching in Human Placental Vasculogenesis” *Biol Rep* 72: 727-735.
- Thiery, JP; Duband, JL; Tucker, G; Darribere, T; Boucaut, JC (1984) “The role of fibronectin in cell migration during early vertebrate embryogenesis” *Prog. Clin, Biol, Res.* 151: 187-198.
- Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, Frazier WA, Polverini PJ, Bouck N. (1993) Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol.* 122:497-511.
- Tremble P, Chiquet-Ehrismann R, Werb Z. (1994) “The extracellular matrix ligands fibronectin and tenascin collaborate in regulating collagenase gene expression in fibroblasts” *Mol Biol Cell.* 5:439-53.

- Trentin, AG; Alvarez-Silva, M; Moura Neto, V (2001) "Thyroid hormone induces cerebellar astrocytes and C6 glioma cells to secrete mitogenic factors" *Am J Physiol Endocrinol Metabol*, 281: E1088-94.
- Twomey, C; McCarthy, JV (2005) "Pathways of apoptosis and importance in development" *J Cell Mol Med* 9: 345-359.
- Tysnes BB, Mahesparan R, Thorsen F, Haugland HK, Porwol T, Enger PO, Lund-Johansen M, Bjerkvig R. (1999) "Laminin expression by glial fibrillary acidic protein positive cells in human gliomas" *Int J Dev Neurosci*. 1999 Aug-Oct;17(5-6):531-9.
- Ueda, Y; Nakagawa, T; Kubota, T; Ido, K; Sato, K (2005) "Glioma cells under hypoxic conditions block the brain microvascular endothelial cell death induced by serum starvation" *J Neurochem* 95: 99-110.
- Vajkoczy P, Menger MD. (2004)"Vascular microenvironment in gliomas" *Cancer Treat Res*.17:249-62
- van Genderen, H; Kenis, H; Lux, P; Ungethüm, L; Maassen, C; Deckers, N; Narula, J; Hofstra, L; Reutelingsperger, C (2006) "*In vitro* measurement of cell death with the annexin A5 affinity assay *Nature protocols*, 1: 363-367.
- Varlet, P; Guillamo, JS; Kosiak, NM; Beuvon, F; Fallet, C; Dumas-Duport, C (2000) "Vascular endothelial growth factor expression in oligodendrogliomas: a correlative study with Sainte-Anne malignancy grade, growth fraction and patient survival" *Neuropathology and applied neurobiology* 26: 379-389.
- Varlet, P; Soni, D; Miquel, C; Roux, F; Meder, JF; Chneiweiss, H; Dumas-Duport, C (2004) "New variants of malignant glioneuronal tumors: a clinicopathological study of 40 cases" *Neurosurgery* 55: 1377-1392.
- Vartanian AA, Burova OS, Stepanova EV, Baryshnikov AY. (2007) "The involvement of apoptosis in melanoma vasculogenic mimicry" *Melanoma Res*.17:1-8.
- Wang, D; Anderson, JC; Gladson, CL (2005) "The role of the extracellular matrix in angiogenesis in malignant glioma tumors" *Brain pathol*, 15: 318-326.
- Wang, L (2006) "Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells" *trends in cardiovascular medicine* 16: 89-94.
- Watanabe, A; Mabuchi, T; Satoh, E; Furuya, K; Zhang, L; Maeda, S; Naganuma, H (2006) "Expression of syndecans, a heparan sulfate proteoglycan, in malignant gliomas: participation of nuclear factor- κ B in regulation of syndecan-1 expression" *J Neuro-Oncology*, 77: 25-32.

- Weihua Z, Tsan R, Schroit AJ, Fidler IJ. (2005) "Apoptotic cells initiate endothelial cell sprouting via electrostatic signaling" *Cancer Res.* 65:11529-35.
- Wierzbicka-Patynowski, I; Schwarzbauer, JE (2003) "The ins and outs of fibronectin matrix assembly" *J Cell Science*, 116: 3269-3276.
- Wiilis CL, Nolan CC, Reith SN, Lister T, Prior MJ, Guerin CJ, Mavroudis G, Ray DE. (2004) Focal astrocyte loss is followed by microvascular damage, with subsequent repair of the blood-brain barrier in the apparent absence of direct astrocytic contact.. *Glia*, 45(4):325-37.
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*.385:810-3. Erratum in: *Nature* 386:200.
- Wink, MR; Lenz, G; Rodnight, R; Sarkis, JJ; Battastini, AM (2000) "Identification of brain ecto-apyrase as a phosphoprotein" *Mol. Cell Biochem*, 213: 11-16.
- Winkler F, Kozin SV, Tong RT, Chae SS, Booth MF, Garkavtsev I, Xu L, Hicklin DJ, Fukumura D, di Tomaso E, Munn LL, Jain RK. (2004) "Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases" *Cancer Cell*, 6:553-63.
- Wolburg, H et al (1994) Modulation os tight junction structure in blood brain barrier endothelial cells. *J Cell Sci* 107; 1347-1357.
- Wu, MH (2005) "Endothelial focal adhesions and barrier function" *J Physiol*, 23: 359-366.
- Yan L, Moses MA, Huang S, Ingber DE. (2000) "Adhesion-dependent control of matrix metalloproteinase-2 activation in human capillary endothelial cells" *J Cell Sci*. 113:3979-87.
- Yanamandra, N; Gumidyala, KV; Waldron, KG; Gujrati, M; Olivero, WC; Dinh, DH; Rao, JS; Mohanam, S (2004) " Blockade of cathepsin B expression in human glioblastoma cells is associated with supression of angiogenesis" *Oncogene* 23: 2224-2230.
- Yano, M; Iwama, A; Nishio, H; Suda, J; takada, G; Suda T (1997) "Expression and function of murine receptor tyrosine kinases, TIE and TEK, in hematopoietic stem cells" *Blood*, 12: 4317-26.
- Ye, Z-C; Sontheimer, H (1999) "Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate" *Cancer research* 59: 4383-4391.
- Yurchenco, PD; Cheng, YS; Colognato, H (1992) "Laminin forms an independent network in basement membranes" *J cell biol.* 17: 1119-1133.

- Yurchenco, PD; Tsilibary, EC; Charonis, AS; Furthmayr, H (1985) "Laminin polymerization in vitro" *J Biol Chem* 260: 7636-7644.
- Zagzag D, Amirnovin R, Greco MA, Yee H, Holash J, Wiegand SJ, Zabski S, Yancopoulos GD, Grumet M. (2000) Vascular apoptosis and involution in gliomas precede neovascularization: a novel concept for glioma growth and angiogenesis. *Lab Invest.* 80:837-49.
- Zagzag D, Friedlander DR, Dosik J, Chikramane S, Chan W, Greco MA, Allen JC, Dorovini-Zis K, Grumet M. (1996) "Tenascin-C expression by angiogenic vessels in human astrocytomas and by human brain endothelial cells in vitro" *Cancer Res.* 1996 Jan 1;56(1):182-9.
- Zagzag D, Friedlander DR, Miller DC, Dosik J, Cangiarella J, Kostianovsky M, Cohen H, Grumet M, Greco MA. (1995) "Tenascin expression in astrocytomas correlates with angiogenesis" *Cancer Res*, 55:907-14.
- Zagzag D, Shiff B, Jallo GI, Greco MA, Blanco C, Cohen H, Hukin J, Allen JC, Friedlander DR. (2002) "Tenascin-C promotes microvascular cell migration and phosphorylation of focal adhesion kinase" *Cancer Res*, 62:2660-8.
- Zagzag, D; Friedlander, D; Miller, DC; Dosik, J; Cangiarella, J; Kostianovsky, M; Cohen, H; Gramet, M; Green, MA (1995) "Tenascin expression in astrocytomas correlates with angiogenesis" *cancer research*, 55: 907-914.
- Zamecnick, J (2005) "The extracellular space and matrix of gliomas" *Acta Neuropatho* 10:435-42.
- Zhou, FC (1990) "Four patterns of laminin-immunoreactive structure in developing rat brain" *Dev Brain Research*, 55: 191-201.

ANEXO 1

•HUVECs em cultura de células:

O aprendizado do modelo de cultura de células de veia de cordão umbilical humana foi feito em nosso laboratório alguns anos atrás por ocasião de minha formação de graduação/Mestrado. Aqui nesta tese, restabeleço o modelo e apresento alguns campos da cultura para orientar o leitor. A **Figura 25** mostra as células endoteliais em condições-padrão de cultura, exemplificando diferentes densidades celulares e aumentos no microscópio óptico.

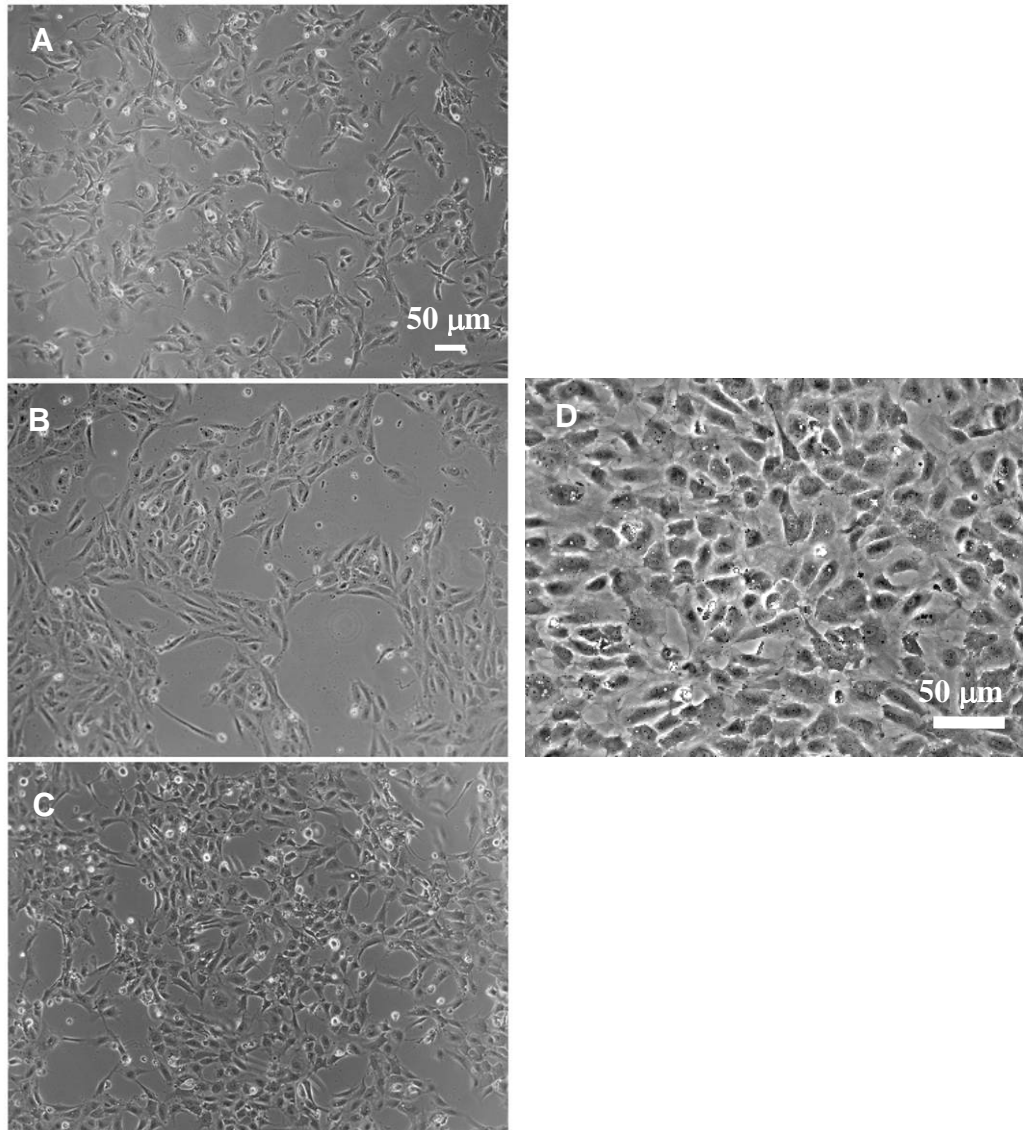


Figura 25. Cultura de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). Aspecto morfológico de cultura de HUVECs cultivadas em M199 suplementado com 20% de SFB, em sub-confluência (A, B e C) e em confluência (D).

1.1 Interação de células endoteliais com as do Sistema Nervoso:

Usando HUVECs como modelo de célula endotelial pretendemos analisar a capacidade interativa com astrócitos (normais e tumorais) e neurônios.

A interação com os dois tipos de células gliais está focalizada ao longo desta Tese. Mas a interação com neurônios mostrada na **Figura 26** é relevante. Esta importância se deve ao fato de que HUVEC, enquanto célula endotelial, não é um bom suporte para o crescimento de neurônios como o são os astrócitos e gliomas. Estas observações foram incluídas no trabalho do nosso laboratório recentemente publicado (Faria *et al.*, 2006). A figura abaixo mostra que já a partir de 6 horas de co-cultivo, os neurônios plaqueados sobre as HUVECs começam a morrer. Diferentemente, os neurônios estendem neuritos exuberantes quando plaqueados sobre astrócitos ou gliomas. A **Figura 27** (página seguinte) retirada da tese de Jane Faria ilustram a comparação com esta **Figura 26** - para maiores informações veja o artigo impresso em Anexo 2.

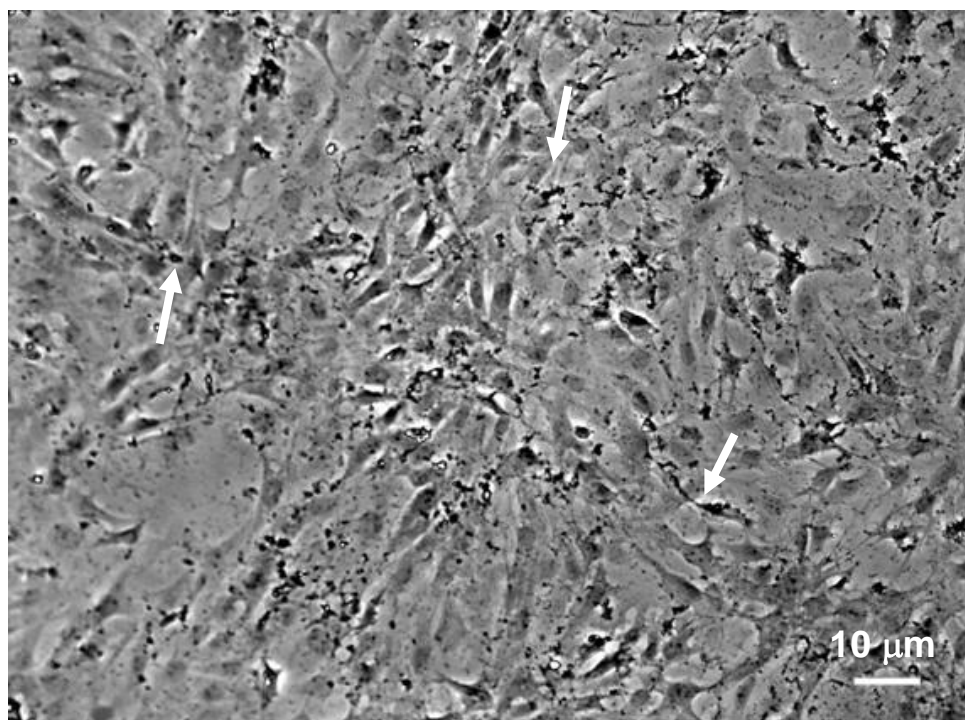


Figura 26. Co-cultura de neurônios e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) HUVEC demonstrado que neurônios corticais uma vez plaqueados sobre substratos não gliais, não suporta as primeiras 24 horas de co-cultivo. As setas indicam os neurônios mortos.

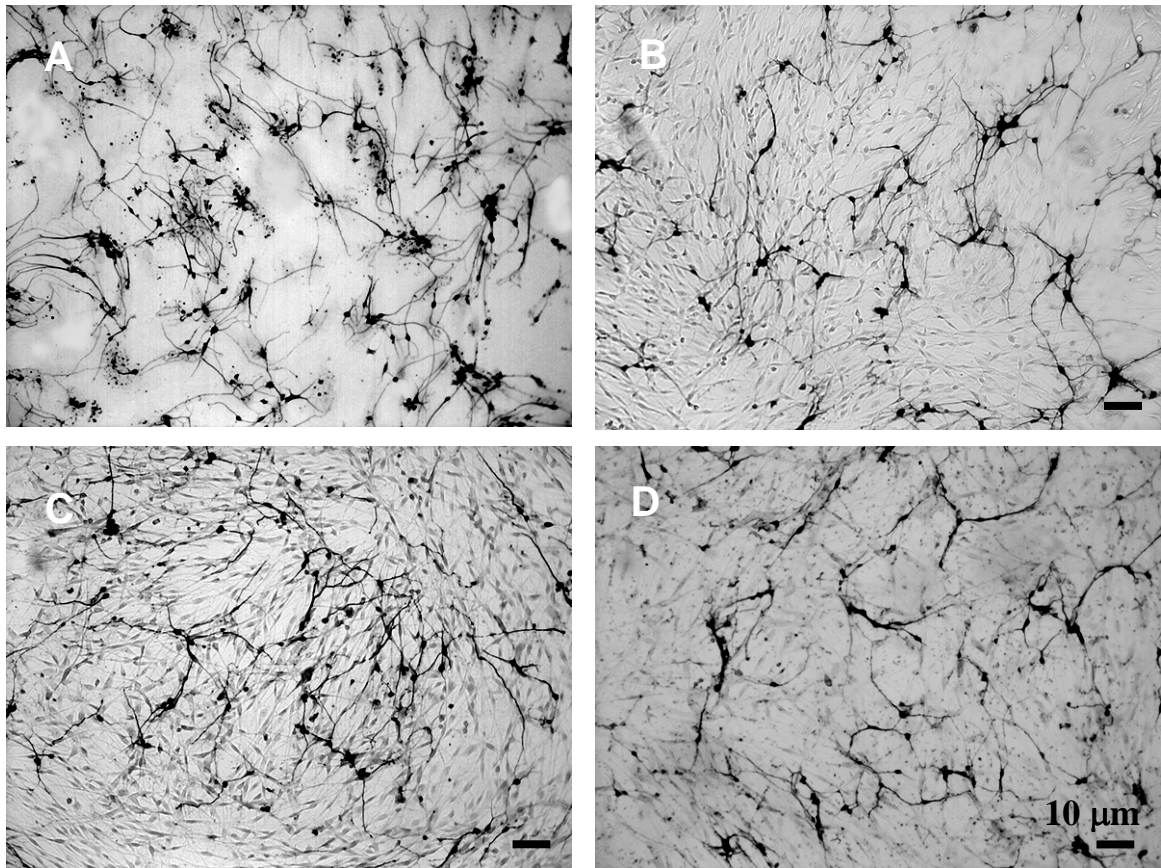


Figura 27. Co-cultura de neurônios e células de astrócitos corticais ou de células de glioblastoma humano. Em (A) observa-se neurônios crescendo sobre um tapete de células astrocíticas normais, enquanto B, C e D mostram neurônios crescendo sobre o tapete da glia tumoral [GBM95 (B), GBM02/02 (C) e GBM03/02 (D)].

ANEXO 2

ANEXO 3

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)