



**Joana de Vale Quaresma Gigante
Gonçalves Carinhas**
Licenciada em Biologia Celular e Molecular

**Estudo do efeito anti-angiogénico de
novos alvos terapêuticos no tratamento
do carcinoma mamário**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: António Duarte, Professor Associado,
Faculdade de Medicina Veterinária

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Paulo Nunes de Sousa Sampaio
Arguente: Prof. Doutora Carla Sofia Fernandes do Amaral Real Afonso
Vogal: Prof. Doutor António José de Freitas Duarte



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Outubro, 2011

Estudo do efeito anti-angiogénico de novos alvos terapêuticos no tratamento do carcinoma mamário

Copyright Joana de Vale Quaresma Gigante Gonçalves Carinhas, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador Professor Doutor António José de Freitas Duarte que me proporcionou a oportunidade de me integrar num projecto tão ambicioso e promissor. Estou-lhe muito grata por todo o seu apoio contínuo durante todo este tempo de trabalho e na escrita da tese de dissertação de Mestrado.

Gostaria também de agradecer ao Professor Doutor Pedro Viana Baptista pelo constante incentivo e dedicação ao meu trabalho, e pela amizade.

À Doutora Ana Teresa Tavares agradeço todo o tempo e dedicação ao meu trabalho e pela amizade.

Em especial gostaria de agradecer ao Dr. Dusan Djokovic (Faculdade de Medicina de Lisboa/Instituto Gulbenkian de Ciência) e Doutor Alexandre Trindade (Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa), que me foram orientando no decorrer do tempo do meu trabalho ensinando-me muito do que sei. A estes quero prestar o meu profundo agradecimento pela sua dedicação, orientação na minha formação, e acima de tudo amizade.

Às minhas colegas de bancada Dr^a Catarina Carvalho, Dr^a Carina Fernandes, Dr^a Marina Badenes, Dr^a Rita Pedrosa e Dr^a Liliana Mendonça quero agradecer pelo apoio, carinho e amizade com que fomos partilhando a bancada de trabalho no Departamento.

Gostaria ainda de agradecer ao Dr. Parkash S. Gill (*University of Southern California*, EUA), pelo fornecimento da proteína de fusão solúvel sEphB4 e ao Dr. William Muller (*McGill University*, *Canada*) pela disponibilização da linha de ratinhos Her2/*neu* utilizada neste trabalho.

Quero também agradecer à Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, ao Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal e ao Instituto Gulbenkian de Ciência pelo apoio logístico e financeiro, sem os quais este trabalho não teria sido possível.

Por fim, quero agradecer à minha família e amigos por estarem sempre presentes nas etapas mais importantes da minha vida. Em especial quero agradecer e dedicar esta tese de dissertação ao Miguel que com todo o amor e apoio incondicional me ajudou a chegar a mais esta tão importante etapa na minha vida, e ao António, o meu pequenino que foi e é a minha principal inspiração para seguir em frente.

SUMÁRIO

O ligando *Delta-like 4* (Dll4), através da via de sinalização Notch, é um potente regulador da angiogénese, sendo expresso na componente arterial do sistema vascular. Nos adultos, a sua expressão encontra-se aumentada numa grande variedade de condições patológicas.

Neste trabalho avaliou-se o desenvolvimento tumoral em ratinhos com perda parcial de função de Dll4 (*Dll4*^{+/-}). A mutação *Dll4*^{+/-} conduz a um aumento da densidade vascular, mas devido à fraca maturação dos vasos neoformados estes não são totalmente funcionais, têm fraca perfusão e elevada extravasação.

A área primordial onde a terapia anti-Dll4 se revela promissora é na oncologia. Neste trabalho efectuaram-se ensaios com perda parcial de função de Dll4 e com proteína solúvel EphB4 usando como modelo ratinhos transgénicos que desenvolvem tumores mamários autonomamente e metástases pulmonares, por sobreexpressão transgénica do gene *neu* (erbB2/her2) sob o controlo do promotor do *Mouse Mammary Tumor Virus* (MMTV) – ratinhos MMTV-NeuNDL2-5.

Os resultados indicaram que tanto a perda parcial de Dll4 como o bloqueio da via EfrinaB2/EphB4 conduzem a uma redução significativa do desenvolvimento tumoral e da metastização pulmonar, tendo o efeito mais pronunciado sido obtido mediante a administração da proteína solúvel EphB4.

Palavras-chave: *Dll4*^{+/-}, densidade vascular, maturação, proteína solúvel EphB4, Her2/*neu*, desenvolvimento tumoral.

ABSTRACT

Delta-like ligand 4 (Dll4), an arterial-specific component of the Notch pathway, is a potent regulator of angiogenesis. In adults, the expression of this gene is increased in a variety of pathological conditions.

In this work, we studied the tumoural development in mice with deletion of one allele of Dll4, *Dll4*^{+/-}. Partial deletion of Dll4 results in higher vascular density, but due to the weak maturation of new vessels, that has low functionality with weak perfusion and high extravasation.

Oncology was the first area where anti-Dll4 therapy revealed a promising future. In this work therapeutic assays were carried out with partial loss-of-function of Dll4 and soluble EphB4 protein in transgenic mice that spontaneously develops mammary tumors and lung metastasis (overexpression of gene *neu* under the control of the promoter *Mouse Mammary Tumor Virus* (MMTV)) – mice MMTV-NeuNDL2-5 (Her2/*neu* mice).

Tumour development and lung metastasis were largely reduced in experimental groups with the best results coming from the group treated with soluble EphB4.

Keywords: *Dll4*^{+/-}, vascular density, vessel maturation, soluble EphB4 protein, Her2/*neu*, tumour development.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	I
SUMÁRIO	II
ABSTRACT	III
ÍNDICE	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VII
1. INTRODUÇÃO	1
Via de sinalização Notch.....	1
i. Componentes e estrutura da via Notch.....	1
ii. Mecanismo de Sinalização.....	3
iii. Genes alvo da via Notch.....	3
Mecanismos de acção da via Notch.....	4
i. Inibição lateral.....	4
i. Indução lateral.....	5
ii. Destino celular.....	5
Vasculogénese e Angiogénese.....	6
Sinalização intrínseca.....	9
i. Sinalização via VEGF.....	9
ii. Sinalização via TGF- β	13
iii. Sinalização por Efrinas.....	13
iv. Sinalização Notch.....	14
v. Delta-like 4.....	16
Biologia tumoral.....	18
Modelos tumorais geneticamente alterados.....	18
i. Modelo transgénico Her2/ <i>neu</i>	19
Terapia anti-angiogénica tumoral.....	19
OBJECTIVOS	23
2. MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1. Materiais.....	24
2.1.1. Ratinhos Her2/ <i>neu</i>	24
2.1.2. Reagentes.....	24
2.1.3. Soluções.....	24
2.1.4. Sequências de Oligonucleótidos iniciadores.....	25
2.2. Métodos.....	26
2.2.1. Extração do DNA genómico de caudas de ratinhos Her2 (Neu NDL 2-5).....	26

2.2.2. Genotipagem de ratinhos <i>Her2/neu</i>	26
2.2.3. Genotipagem de ratinhos <i>Her2/neu</i> <i>Dll4</i> ^{+/-}	27
2.2.4. Determinação da concentração de sEphB4	28
2.2.5. Ensaio terapêutico com sEphB4 em ratinhos <i>Her2/neu</i>	29
2.2.6. Recolha dos adenocarcinomas mamários e metástases pulmonares e processamento dos tecidos	29
2.2.7. Recolha de adenocarcinomas mamários para PCR em tempo real.....	30
2.2.8. Criosecção dos blocos de gelatina de tumores e recolha dos cortes em lâminas adesivas	30
2.2.9. Imunofluorescência	30
2.2.10. Microscopia de fluorescência	31
2.2.11. Extração de RNA utilizando o mini <i>kit</i> RNeasy®	31
2.2.12. Transcrição reversa utilizando o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR.....	32
2.2.13. PCR em tempo real.....	32
2.2.14. Análise estatística	32
3. RESULTADOS	33
3.1. Avaliação da influência de <i>Dll4</i> no desenvolvimento de adenocarcinomas mamários e metástases pulmonares em ratinhos <i>Her2/neu</i>	33
3.2. Análise do envolvimento da via de sinalização <i>Dll4/Notch</i> na regulação da angiogénese.....	37
3.3. Análise do efeito terapêutico de sEphB4 no desenvolvimento de adenocarcinomas mamários e metástases pulmonares.....	38
4. DISCUSSÃO	43
5. BIBLIOGRAFIA	49
ANEXOS - Tradução, maturação e activação dos membros da via Notch	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura nº 1.1 – Estrutura dos receptores e ligandos da via Notch em <i>Drosophila melanogaster</i> e nos mamíferos.....	3
Figura nº 1.2 - Inibição lateral na neurogênese	5
Figura nº 1.3 - Mecanismo da Angiogênese.....	8
Figura nº 1.4 - Estrutura dos vasos sanguíneos de vertebrados.....	8
Figura nº 1.5 - Funções dos diferentes receptores e ligandos VEGF.....	11
Figura nº 1.6 – Efeitos do bloqueio de VEGF e de Dll4 no desenvolvimento tumoral	21
Figura nº 2.7 – Curva padrão para determinação da concentração de proteína pelo método de Bradford	28
Figura nº 3.8 – Média do número de tumores (A) e carga tumoral (B) por animal	33
Figura nº 3.9 - Imagens de imunofluorescência relativas à densidade vascular e ao recrutamento de células de suporte a nível vascular nos adenocarcinomas mamários de ratinhos Her2/neu.....	34
Figura nº 3.10 – Imagens de imunofluorescência relativas à perfusão vascular dos adenocarcinomas mamários de ratinhos Her2/neu.....	35
Figura nº 3.11 – Imagens relativas às metástases pulmonares observadas nos ratinhos Her2/neu <i>Dll4^{+/+}</i> e Her2/neu <i>Dll4^{+/-}</i>	36
Figura nº 3.12 - Expressão relativa de determinados genes em animais Her2/neu <i>Dll4^{+/-}</i> por PCR em tempo real	37
Figura nº 3.13 - Média do número (A), volume (B) e carga tumoral (C) por animal	39
Figura nº 3.14 – Imagens de imunofluorescência relativas à densidade vascular e ao recrutamento de células de suporte a nível vascular nos adenocarcinomas de ratinhos Her2/neu.....	40
Figura nº 3.15 – Gráficos relativos aos resultados da análise por imunofluorescência da densidade vascular e do recrutamento de células de suporte a nível vascular.....	41
Figura nº 3.16 – Imagens de imunofluorescência relativas à perfusão vascular nos tumores mamários de ratinhos Her2/neu.....	41
Figura nº 3.17 - Gráfico relativo aos resultados da análise por imunofluorescência da perfusão vascular	42
Figura nº 3.18 – Imagens relativas às metástases pulmonares observadas nos ratinhos Her2/neu tratados com sEphB4 e ratinhos tratados com PBS.....	42
Figura nº A.19 – Formação e mecanismo da sinalização Notch	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Alk	do inglês – <i>activin receptor-like kinase</i>
Ang	angiopoietina
BSA	albumina sérica bovina
CADASIL	arteriopatia cerebral autossômica dominante com infartos subcorticais e leucoencefalopatia
C _T	do inglês – <i>cycle threshold</i>
DAPI	4,6-diamino-2-fenil indol
DAPT	<i>N-[N-(3,5-difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine t-butyl ester</i>
DBZ	dibenzazepina
E	dia embrionário
Dll4	Ligando <i>Delta-like 4</i>
dNTPs	desoxirribonucleótidos
DSL	homólogo de Delta/Serrate/Lag-2
DTS	do inglês – <i>downregulation targeting signal</i>
DTT	do inglês – dithiothreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
EGF	factor de crescimento epitelial
FGF	factor de crescimento de fibroblastos
Flk	do inglês – <i>Flt related tyrosine kinase</i>
Flt	do inglês – <i>Fms-like tyrosine kinase</i>
Her2/neu	murganhos transgênicos com o promotor <i>Mouse Mammary Tumor Virus</i> que sobreexpressam o gene her2 (neu)
Hes	do inglês – <i>hairy/enhancer of split</i>
HGF	factor de crescimento de hepatócitos
HIF-1 α	subunidade <i>alpha</i> do factor de indução de hipoxia 1
IGF-1	factor de crescimento semelhante a insulina 1
MAML	do inglês – <i>mastermind-like family</i>
MMP	metaloproteases da matriz extracelular
NECD	domínio extracelular de Notch
Neur	do inglês – <i>neuralized-like</i>
NICD	domínio intracelular de Notch
Nrp	neuropilinas
PBS	tampão fosfato-salino
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDGFB	factor de crescimento derivado de plaquetas B

PECAM-1	molécula de adesão de células endoteliais e de plaquetas do tipo 1
PEST	domínio rico em prolina, glutamato, serina e treonina
R ²	coeficiente de determinação
RAM	moléculas associada a RBP-J _k
RBP-J _k	do inglês – <i>recombination signal sequence-binding protein J_K</i>
Rcf	força centrífuga relativa
sEphB4	proteína de fusão solúvel formada pelo derivado do domínio extracelular de EphB4 associado a albumina sérica humana
SHARP	SMRT (<i>silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptor</i>) e HDAC (<i>histone deacetylase</i>) associados
TE	devido aos seus componentes Tris e EDTA
Tek ou Tie2	receptor cinase de tirosina endotelial
TGF-β	factor de crescimento transformante- <i>beta</i>
Tie1	do inglês – <i>tyrosine kinase with immunoglobulin-like and epithelial growth factor-like domains 1</i>
TM	domínio transmembranar de Notch
T _m	temperatura de dissociação
TNFα	factor de necrose tumoral <i>alpha</i>
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
Triton X-100	<i>polyethylene glycol p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl ether, octyl phenol ethoxylate, polyoxyethylene octyl phenyl ether</i>
Tween-20	<i>polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate</i>
TβR	receptor do factor de crescimento transformante <i>beta</i>
VEGF	factor de crescimento vascular endotelial
VEGFR	receptor do factor de crescimento vascular endotelial
α-SMA	<i>alpha-actina</i> de músculo liso

1. INTRODUÇÃO

O processo angiogénico tem vindo a ser um foco de estudo na regulação do crescimento tumoral, tendo Judah Folkman em 1971 postulado que a inibição da angiogénese tumoral poderia impedir o crescimento dos tumores.

Recentemente, descobriu-se que através da via de sinalização Notch, o ligando Delta-like 4 (Dll4), evidencia um papel fulcral na regulação da angiogénese embrionária (Duarte et al., 2004). Dll4 actua como regulador negativo de sinalização por factores pró-angiogénicos, como o factor de crescimento vascular endotelial (VEGF), e como regulador positivo de factores de maturação e estabilização vascular. Tais conhecimentos, levaram-nos a testar o efeito do bloqueio de Dll4 na inibição do crescimento tumoral. A terapia de bloqueio de Dll4 produziu um efeito pró-angiogénico paradoxal no crescimento dos tumores com aumento da formação de novos vasos que não sendo funcionais, agravam a hipóxia tumoral.

No nosso Laboratório têm sido estudados diversos modelos tumorais *in vivo* em ratinhos, como os adenocarcinomas mamário, colo-rectal, pulmonar e da próstata, o insulinooma e o melanoma. Neste trabalho pretendeu-se avaliar o impacto do bloqueio de Dll4 no desenvolvimento de adenocarcinomas mamários em ratinhos transgénicos NeuNDL2-5 (Her2/neu/ErbB2), um modelo tumoral autóctone, utilizado em estudos de desenvolvimento de adenocarcinomas mamários dependentes de mutações em Her2 com desenvolvimento de metástases pulmonares. Para tal foram realizados cruzamentos dos transgénicos Her2/neu com ratinhos heterozigóticos para a perda-de-função de Dll4 (Dll4^{+/-}). A via EphB4/EfrinaB2 também está envolvida na determinação da identidade vascular arterial *versus* venosa, actuando a jusante da sinalização Dll4/Notch. A via de sinalização EphB4/EfrinaB2 também já foi envolvida na regulação da neo-angiogénese tumoral e combinada com terapia dirigida a Dll4, tendo a combinação revelado um efeito benéfico. Assim, também foi realizado um estudo do efeito da terapia com proteína de fusão solúvel sEphB4, um inibidor de sinalização EphB4/EfrinaB2. sEphB4 é formada pelo derivado monomérico do domínio extracelular de EphB4, cuja expressão do gene ocorre no endotélio venoso, associado a albumina sérica humana.

Via de sinalização Notch

i. Componentes e estrutura da via Notch

A via Notch é uma via de sinalização intercelular com funções regulatórias em diversos processos celulares nos tecidos nos quais é expressa. Deste modo, regula diversas funções biológicas, como a apoptose, proliferação, diferenciação e destino celular durante o desenvolvimento embrionário e do adulto de organismos multicelulares.

Tanto em *Drosophila melanogaster*, como em *Caenorhabditis elegans* existe apenas um receptor Notch, que interage com dois ligandos em *D. melanogaster*, designados de Delta e Serrate (Artavanis-Tsakonas et al., 1995), e somente com um ligando em *C. elegans*, denominado de Lag-2 (Artavanis-Tsakonas et al., 1995). Nos mamíferos, a via Notch é mais complexa, sendo constituída por quatro

receptores Notch (1-4) (Gridley, 1997) e 5 ligandos transmembranares (Jagged1 e 2, Delta-like1, 3 e 4) (Artavanis-Tsakonas et al., 1999).

Os receptores Notch são proteínas transmembranares compostas por um domínio extracelular (NECD), um curto domínio transmembranar (TM) e um domínio intracelular (NICD). O NECD é formado por várias repetições do domínio semelhante ao factor de crescimento epidérmico (*EGF-like*), essenciais para a interacção entre os receptores Notch e os seus ligandos. Após estas repetições contém 3 repetições LN (Lin-12/Notch), ricas em cisteína, que parecem inibir a activação de Notch quando o ligando não se encontra presente. O NICD mais descrito é o de Notch1, que contém sete repetições de anquirina, o domínio transactivador (TAD), o domínio OPA rico em glutamina, o domínio PEST rico em prolina, glutamina, serina e treonina e o domínio RAM23 (molécula associada a RBP-J_k, *recombination signal sequence-binding protein J_k*) que contém os sinais de localização nuclear (NLSs) (Tamura *et al.*, 1995; Kurooka *et al.*, 1998). Recentemente, foram descobertos outros domínios funcionais do NICD, incluindo o PPD (*potential phosphorylated domain*), DTS (*downregulation targeting sequence*) e S4. PPD está localizado entre as repetições de anquirina e a região PEST e parece promover a ligação do NICD à proteína RBP-J_k.

Os ligandos da via Notch geralmente são também proteínas transmembranares e estão também compostos por um domínio extracelular, um domínio transmembranar e um domínio intracelular. No entanto, surgiram evidências da existência de formas solúveis dos ligandos que podem interactuar com Notch e, consoante o caso, antagonizar ou promover esta via em cultura de células e em mutantes transgénicos de *Drosophila melanogaster* (Hicks *et al.*, 2002; Hukriede, Gu & Fleming, 1997; Li *et al.*, 1998; Lindner *et al.*, 2001; Ohishi, Varnum-Finney & Bernstein, 2002; Qi *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 2002; Sun & Artavanis-Tsakonas, 1997; Trifonova *et al.*, 2004). Estes resultados podem ser explicados pelo facto de os ligandos secretados competirem com os ligandos transmembranares para a ligação a Notch, mas aqueles são activadores mais fracos da via Notch que estes últimos (Le Borgne *et al.*, 2005). O domínio extracelular contém um domínio altamente conservado DSL (Delta, Serrate, Lag) seguido por uma série de repetições *EGF-like* (Figura nº 1). O domínio DSL é a única unidade necessária para a interacção com os receptores Notch. No entanto, as repetições *EGF-like* também têm um papel importante, uma vez que estabilizam esta interacção (Shimizu *et al.*, 1999). As duas famílias de ligandos diferem no facto de os ligandos Jagged terem um maior número de repetições *EGF-like* e um domínio rico em cisteína (CR) (Fleming, 1998).

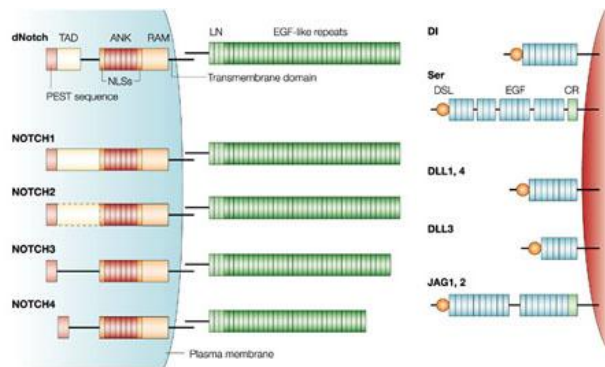


Figura nº 2.1 – Estrutura dos receptores e ligandos da via Notch em *Drosophila melanogaster* e nos mamíferos. In (Radtke and Raj, 2003)).

ii. Mecanismo de Sinalização

Os domínios NICD e NECD são sintetizados como uma única proteína (pré-Notch) que é transportada do retículo endoplasmático (ER) para o Aparelho de Golgi. O receptor Notch é então clivado em três fases específicas: S1, que ocorre no Aparelho de Golgi clivando a proteína Notch recém traduzida em duas partes, o NECD e a outra que engloba o domínio TM e o NICD (Fortini, 2002); S2 e S3, clivagens proteolíticas desencadeadas pela interação do receptor Notch e o ligando (Lag-2, Serrate, Delta ou Jagged) ativando a via (Kimble and Simpson, 1997). S2 ocorre no NECD permitindo a sua libertação da membrana celular (Brou *et al.*, 2000; Peschon *et al.*, 1998), clivagem essencial para que ocorra S3, catalizada pelo complexo *gamma*-secretase induzindo a libertação do NICD, que é translocado até ao núcleo e actua como coactivador transcricional (Bland, Kimberly & Rand, 2003; De Strooper *et al.*, 1999; Pan & Rubin, 1997). O NICD não se consegue ligar directamente ao DNA, formando um heterodímero com a proteína RBP-J_k (CSL), activando a transcrição de genes com domínios de reconhecimento de RBP-J_k (ver Anexo).

iii. Genes alvo da via Notch

Pensa-se que modificações nas histonas tenham um papel importante neste processo, principalmente a acetilação e metilação (Borggreffe and Oswald, 2009). A presença de modificações específicas pós-translacionais nas histonas determina transcionalmente se os domínios de cromatina se encontram activos ou inactivos. Sabe-se, por exemplo, que o complexo RBP-J_k/NICD/MAML recruta a acetiltransferase de histonas p300, que determina a activação dos genes alvo da via Notch. Interações funcionais entre Notch e PCAF e GCN5 também foram descritas, assim como o facto da metilação da histona H3K4 ocorrer a montante da activação dos genes alvo da via Notch. Adicionalmente, sabe-se que a deacetilase de histonas está implicada na acção bloqueadora do complexo co-repressor RBP-J_k/SHARP, que a chaperonina Asf1 da histona H3/H4 contribui para o bloqueio dos genes alvo da via Notch e que CtBP encontra-se associado à demetilase de histonas LSD1/CoREST (Borggreffe and Oswald, 2009).

Os diferentes receptores Notch não têm o mesmo efeito sobre a transcrição dos genes alvo. Por exemplo, o NICD de Notch3 é um ativador transcricional mais fraco do que o de Notch1 (Beatus, Lundkvist, Oberg & Lendahl, 1999). Estes mesmos autores sugerem ainda que o NICD de Notch3 compete com os NICDs de outros receptores Notch para a ligação a RBP-J_k e a co-ativadores, podendo deste modo funcionar como repressor, e não activador, da sinalização Notch.

Apesar da sinalização via receptores Notch ter diversos efeitos, apenas um número limitado de genes alvo foi identificado até este momento em vários tipos celulares e diferentes fases de desenvolvimento (Figura nº 8). Os mais descritos são os genes da família *Hairy/enhancer of split* (Hes) (Bailey & Posakony, 1995; Iso, Kedes & Hamamori, 2003; Jarriault *et al.*, 1995; Lecourtois & Schweisguth, 1995; Leimeister, Externbrink, Klamt & Gessler, 1999; Nakagawa *et al.*, 2000; Nakagawa, Nakagawa, Richardson, Olson & Srivastava, 1999; Oellers, Dehio & Knust, 1994). Nos mamíferos, a família Hes tem 4 subfamílias: Hairy (com o gene *Hes1*), E(spl) (com os genes *Hes2, 3, 5, 6, 7*), Hey (com os genes *Hey1, 2, L*) e Str13 (com os genes *Str13* e *Dec2*) (Davis & Turner, 2001; Iso *et al.*, 2003). Dependendo do tecido ou da célula em que o receptor Notch é activado, assim variam os genes da família Hes que são expressos. Por exemplo, durante o desenvolvimento do sistema nervoso são sobretudo expressos alguns Hes, enquanto no desenvolvimento do sistema vascular são expressos principalmente os Hey. As proteínas Hes e Hey têm domínios básicos hélice-ansa-hélice e ligam-se com alta afinidade ao DNA. Para além de formarem homodímeros, podem também formar heterodímeros (Hes-Hey) tendo uma acção ainda mais potente que os homodímeros (Iso *et al.*, 2001). Exceptuando Hes6, que antagoniza a actividade de Hes1 (Bae, Bessho, Hojo & Kageyama, 2000), todas as outras proteínas desta família funcionam como repressores da transcrição de outros genes.

Mecanismos de acção da via Notch

A via de sinalização Notch permite que uma célula que expresse o ligando Delta ou Jagged altere o programa genético da célula vizinha que expressa o receptor Notch, podendo funcionar de um modo indutivo ou inibitório.

i. Inibição lateral

Quando a via funciona de modo inibitório, a produção de ligando é reduzida e a do receptor aumentada na célula que recebe o estímulo Notch, sendo esta inibida de adoptar o mesmo destino das células vizinhas (Kimble and Simpson, 1997). A inibição lateral é o mecanismo de acção de Notch mais conhecido e o que parece ocorrer na maior parte dos contextos celulares. Em todos os modelos já estudados (neurogénese no gafanhoto (Doe *et al.*, 1985) e *D. melanogaster* e vertebrados (Chitnis, Henrique, Lewis, Ish-Horowicz & Kintner, 1995; Haddon, Jiang, Smithers & Lewis, 1998; Henrique *et al.*, 1995; Henrique *et al.*, 1997; Hrabe de Angelis, McIntyre & Gossler, 1997) observou-se que neurónios recém-diferenciados inibem progenitores neurais vizinhos de adoptar um destino idêntico,

mantendo assim uma reserva de células indiferenciadas. Este processo deve-se a que a activação da sinalização Notch por Delta numa célula vizinha, faz com que esta expresse menos *Delta* e mais *Notch*, aumentando assim o potencial de sinalização dessa célula e impedindo-a assim de se tornar um neurónio. Assim, mesmo que os níveis de *Delta* e *Notch* sejam inicialmente equivalentes entre as duas células vizinhas, ao fim de certo tempo, devido a mecanismos de retroamplificação, uma delas apresenta expressão reduzida de *Delta* e aumentada de *Notch* e a outra célula apresenta o inverso. Este mecanismo básico diverge em certos pontos consoante o contexto celular. Por exemplo, na neurogénese de *D. melanogaster* (Figura nº 2) a activação de Notch por Delta não é determinada pela quantidade da sua proteína na membrana, mas sim por outras proteínas, como Neur, que promovem a reciclagem e activação de Delta (como descrito anteriormente). Outros exemplos em vertebrados são a capacidade de Notch impedir as células precursoras das criptas intestinais de se diferenciarem e a capacidade de bloquear a neurogénese e miogénese através dos genes repressores *Hes*.

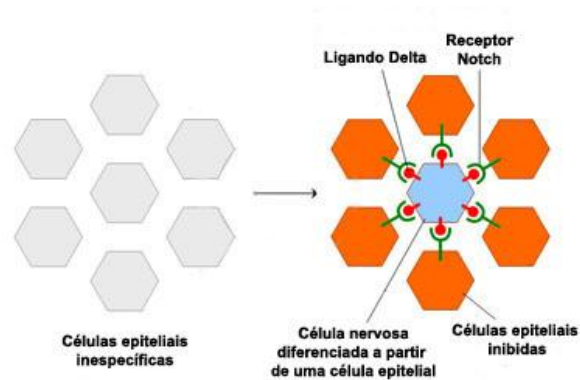


Figura nº 1.2 - Inibição lateral na neurogénese. Adaptado (Motifolio, 2009).

i. Indução lateral

Quando a via funciona de modo indutivo, a célula que recebe o estímulo Notch vai produzir mais quantidade de ligando e receptor, sendo assim induzida a adotar o mesmo destino das células vizinhas (Kimble and Simpson, 1997). Ocorre indução lateral, por exemplo, no desenvolvimento das células da ponta das asas de *D. melanogaster* (de Celis & Bray, 1997; Doherty, Feger, Younger-Shepherd, Jan & Jan, 1996). A activação de Notch por Serrate ou Delta activa respectivamente a expressão de *Delta* ou *Serrate* na célula vizinha. Um exemplo deste mecanismo de acção nos vertebrados é o papel de Notch na diferenciação dos queratinócitos da pele. Notch favorece a diferenciação celular através da indução da expressão de moléculas reguladoras (Borggreffe and Oswald, 2009).

ii. Destino celular

Notch tem também um papel crucial como determinante do destino celular em certos casos. Este mecanismo de acção ocorre quando a sinalização Notch entre duas células filhas é dependente da

herança assimétrica de reguladores desta via e assim, estas vão assumir destinos celulares distintos. Um exemplo deste mecanismo é o caso das células precursoras dos órgãos sensoriais de *Drosophila*, que depende da herança assimétrica de Numb entre as células filhas. Outro exemplo é o facto de Notch determinar a diferenciação de células precursoras em neurónios ou células da glia (Borggreve and Oswald, 2009).

Vasculogénese e Angiogénese

Nos vertebrados, o sistema cardiovascular é o primeiro a formar-se durante o desenvolvimento embrionário. Este forma-se através do desenvolvimento dos hemangioblastos a partir de células da mesoderme lateral e posterior e da sua agregação na parte visceral do saco vitelino. Os hemangioblastos vão-se diferenciar em células hematopoiéticas e endoteliais, formando as ilhéus sanguíneas, no saco vitelino (Robb and Elefanty, 1998). Posteriormente, as ilhotas sanguíneas fundem-se de modo a formar o plexo capilar primário. (Pardanaud et al., 1996). No embrião propriamente dito, angioblastos migram para a região mediana do embrião e agregam-se de modo a formar os primeiros vasos, nomeadamente as aortas dorsais e as veias cardinais anteriores (Ambler et al., 2001; Cleaver and Krieg, 1998; Fouquet et al., 1997; Pardanaud et al., 1996). No desenvolvimento do crescente cardíaco, precursores endoteliais vão formar o endocárdio primordial.

A formação no embrião propriamente dito e no saco vitelino dos primeiros vasos sanguíneos, uma rede primitiva de tubos endoteliais simples, é denominada de vasculogénese (Risau, 1995). Sabe-se que já neste momento estes vasos adquirem um carácter arterial e venoso, o que demonstra que a especificidade celular é geneticamente programada (Gerety and Anderson, 2002). No entanto, esta pré-determinação genética da identidade vascular é plástica e pode ser regulada por forças hemodinâmicas nos estádios mais precoces do desenvolvimento embrionário (Carmeliet, 2005). O desenvolvimento posterior dos primeiros vasos formados, com remodelações complexas que envolvem a proliferação e ramificação em novos vasos denomina-se de angiogénese (Risau, 1997). A sua activação ocorre devido ao aumento do número de moléculas pró-angiogénicas e/ou por diminuição de moléculas anti-angiogénicas. O processo angiogénico ocorre no embrião em desenvolvimento e no adulto em situações de feridas, isquémia, no ciclo éstrico das fêmeas e em determinadas patologias, como os tumores (Arbiser, 1996; Carmeliet, 2003; Folkman, 1971; Fox et al., 1996; Fraser and Lunn, 2000). Inicia-se através da destruição local da membrana basal dos vasos pré-existentes por proteases, tanto secretadas como da superfície celular, seguido de activação da proliferação e migração de células endoteliais (Sainson and Harris, 2007) (Figura nº 3). O factor de crescimento do endotélio vascular A (VEGFA) determina a direcção desta migração, que é liderada por umas células endoteliais especiais denominadas de células da ponta (*tip cells*) constituídas por

filopódios (Figura nº 3). VEGFA sinaliza assim ao ligar-se ao receptor VEGFR2 localizado à superfície desses filopódios (Gerhardt *et al.*, 2003).

As células da ponta desenvolvem filopódios em direcção ao gradiente de VEGFA, Sabe-se que a via Notch também está implicada neste processo, porque quando VEGFA afecta as células endoteliais, ocorre a activação da expressão de *Dll4* e dos seus receptores Notch (Liu *et al.*, 2003). No entanto, sabe-se que as células da ponta desenvolvem-se a partir de células endoteliais sem expressão de Notch1. Adicionalmente, Notch parece prevenir a transição das células endoteliais onde é expresso para o estado activado através da diminuição da sensibilidade destas para VEGFA. Deste modo, concluiu-se que a sinalização Notch actua de modo a evitar que se produzam células da ponta em excesso (Hellstrom *et al.*, 2007; Siekmann & Lawson, 2007; Suchting *et al.*, 2007). Quando as células da ponta são seleccionadas, inicia-se a proliferação e migração de outras células endoteliais, as células do tronco vascular (*stalk cells*) (Figura nº 3), estimuladas também pela ligação de VEGFA ao receptor VEGFR2 (Gerhardt *et al.*, 2003).

A maturação dos vasos envolve a inibição da formação de novos vasos, a estabilização dos vasos pré-existentes e a incorporação das células de suporte na parede dos mesmos (Cleaver & Melton, 2003; Jain, 2003) (Figura nº 3). Assim, os capilares fundem-se e o subsequente contacto entre as células da ponta promove a paragem da migração destas e a formação de interacções intercelulares altamente adesivas nos locais de contacto. Esta adesão é promovida por certas proteínas transmembranares, como a caderina endotelial vascular (VE-cadherin), a molécula de adesão de células endoteliais e de plaquetas do tipo 1 (PECAM-1) e as conexinas. Após o contacto entre os capilares, forma-se o lúmen dos vasos e o fluxo de sangue através destes contribui para a estabilização vascular. Este fenómeno ocorre porque o fornecimento de oxigénio promove a diminuição localizada dos níveis de VEGFA e outros factores pró-angiogénicos induzidos pela hipóxia. Adicionalmente, o factor de crescimento transformante β 1 (TGF- β 1) é activado pelo contacto entre as células endoteliais e os progenitores dos pericitos e promove a inibição da migração e da proliferação das células endoteliais (Orlidge & D'Amore, 1987; Sato & Rifkin, 1989), a inibição da expressão de *VEGFR2* nestas células (Mandriota, Menoud & Pepper, 1996) e a indução da diferenciação das células precursoras dos pericitos (Hirschi, Rohovsky & D'Amore, 1998; Ramsauer & D'Amore, 2002). As células de suporte dos vasos, pericitos e células do músculo liso, são recrutadas durante o processo de maturação destes. Estão envolvidos diversos factores no recrutamento destas células para formar a parede vascular, sendo os principais o factor de crescimento derivado de plaquetas B (PDGFB) (Bjarnegard *et al.*, 2004) e a interacção entre a angiopoietina1 (Ang1) com o receptor cinase de tirosina endotelial (Tie2) (Holash *et al.*, 1999).

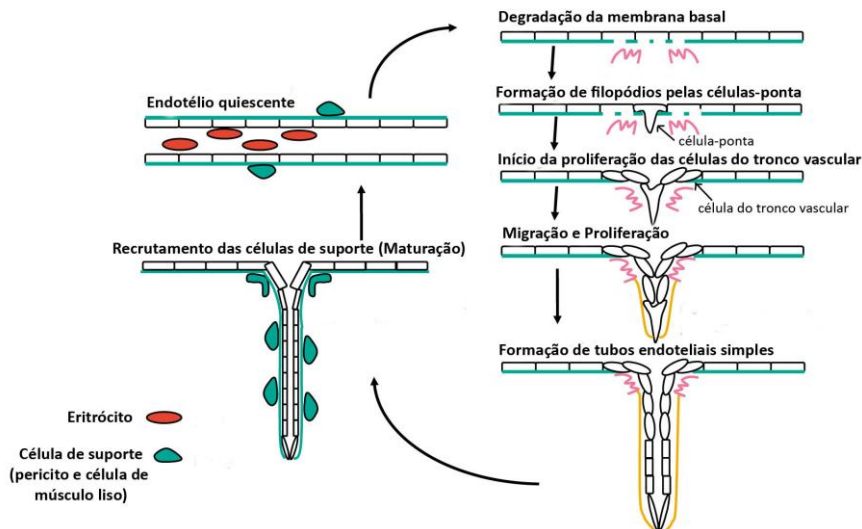


Figura nº 1.3 - Mecanismo da angiogênese. Adaptado (Dufraigne et al., 2008)

As artérias e veias são constituídas por uma túnica interna, formada pelo endotélio e pela membrana basal, uma túnica média de fibras elásticas e de músculo liso e uma túnica externa de tecido conjuntivo elástico. As artérias têm uma parede mais elástica e mais camadas de músculo para suportar altas pressões sanguíneas. As veias têm um lúmen maior e possuem válvulas para evitar que ocorra refluxo do sangue. As arteríolas possuem maior revestimento de células musculares do que as vénulas. As duas redes de vasos só se fundem ao nível dos capilares, que não possuem células do músculo liso, mas sim pericitos dispersos pelo endotélio (Figura nº 4).



Figura nº 1.4 - Estrutura dos vasos sanguíneos de vertebrados. *In* (Guerreiro).

Ainda se desconhece a via de sinalização que despoleta a especialização das ilhéus sanguíneas e os precursores dos angioblastos para formar os vasos sanguíneos. Estudos em galinha sugeriram que o factor de crescimento de fibroblastos (FGF) é um factor importante para a especialização dos angioblastos (Cox and Poole, 2000). Estudos em ratinhos demonstraram a importância da sinalização Indian Hedgehog da endoderme primitiva na determinação do destino celular das células hematopoiéticas e vasculares (Byrd *et al.*, 2002; Dyer, Farrington, Mohn, Munday & Baron, 2001). No entanto, sabe-se que as principais vias conhecidas até ao momento que determinam o desenvolvimento

vascular são a de VEGF, a das Angiopoietinas (Carmeliet, 2000; Conway, Collen & Carmeliet, 2001; Yancopoulos *et al.*, 2000), a das Efrinas, a de TGF- β , a de PDGF e a de Notch (Rossant and Howard, 2002). Existem ainda outras moléculas que regulam positivamente a angiogénese, como factores de crescimento de fibroblastos (FGFa e FGFb), factor de crescimento de hepatócitos (HGF), factor de necrose tumoral (TNF α), angiogenina, interleucina-8. No entanto, nem todas têm especificidade para as células endoteliais e apenas algumas são capazes de influenciar directamente estas células *in vitro* (Karamysheva, 2008).

Sinalização intrínseca

i. Sinalização via VEGF

O VEGF foi o primeiro factor de crescimento específico do sistema vascular a ser caracterizado, considerando-se ainda hoje como o factor mais crítico tanto na vasculogénese como em processos angiogénicos embrionários e no adulto (Yancopoulos *et al.*, 2000).

A família VEGF, um grupo de glicoproteínas homodiméricas secretadas, é composta por factores de crescimento VEGFA, B, C e D e o factor de crescimento placentário (PlGF) nos humanos e ratinhos (Neufeld, Cohen, Gengrinovitch & Poltorak, 1999; Petrova, Makinen & Alitalo, 1999). No homem existem pelo menos quatro isoformas de VEGF, de 121, 165, 189 e 206 aminoácidos (Houck *et al.*, 1991; Tischer *et al.*, 1991). As isoformas maiores têm a capacidade de se ligarem à heparina e acumularem-se na matriz extracelular, enquanto as isoformas mais pequenas se difundem livremente (Robinson and Stringer, 2001). O VEGF₁₆₅ é a isoforma mais comum e, apesar de poder ser difundida, a maior parte desta proteína permanece ligada à superfície celular e à matriz extracelular (Houck, Leung, Rowland, Winer & Ferrara, 1992; Park, Keller & Ferrara, 1993). As isoformas de VEGF associadas à matriz extracelular servem como reservatório e, quando necessário, são libertadas através da clivagem da região C-terminal pela plasmina (Karamysheva, 2008). Os receptores transmembranares dos ligandos VEGF são o VEGFR1 (ou Flt1), o VEGFR2 (ou Flk1) e o VEGFR3 (ou Flt4) (Neufeld *et al.*, 1999), existindo ainda os receptores acessórios, as Neuropilinas (Nrp) (Neufeld *et al.*, 2002; Soker, Takashima, Miao, Neufeld & Klagsbrun, 1998).

Os receptores VEGFR são compostos por sete domínios semelhantes à imunoglobulina, essenciais para a interacção com os ligandos, e por um domínio intracelular cinase de tirosina. A interacção receptor-ligando induz a homodimerização do receptor e a posterior trans/autofosforilação dos resíduos de tirosina do domínio intracelular, que determinam a activação da cascata de sinalização a jusante. O VEGFR2 liga-se a VEGFA, C, D enquanto o VEGFR1 liga-se a VEGFA e B (Gale and Yancopoulos, 1999) e a PlGF (Clauss *et al.*, 1996; Sawano, Takahashi, Yamaguchi, Aonuma & Shibuya, 1996). Deste modo, o VEGFR1, através da sua ligação a PlGF (Clauss *et al.*, 1996), parece estar também implicado na sinalização que modula a linhagem dos monócitos. O VEGFR1 tem dez vezes maior afinidade para o VEGF que o VEGFR2 (Petrova *et al.*, 1999). O VEGFR3 liga-se a VEGF C (Joukov *et al.*, 1996) e a VEGF D (Achen *et al.*, 1998). Os três receptores VEGF são expressos

especificamente nas linhagens endotelial e linfática, embora exista evidência da acção de VEGFR2 noutros tecidos, como no sistema nervoso (Meirer, Gurunluoglu & Siemionow, 2001; Ogunshola *et al.*, 2002; Yang & Cepko, 1996).

O VEGFR2 é o primeiro marcador do desenvolvimento da linhagem endotelial durante a vasculogénese, (Millauer *et al.*, 1993; Yamaguchi, Dumont, Conlon, Breitman & Rossant, 1993) sendo expresso nos hemangioblastos (Yamaguchi *et al.*, 1993; Eichmann *et al.*, 1997; Kabrun *et al.*, 1997; Choi, Kennedy, Kazarov, Papadimitriou & Keller, 1998). Em estudos efectuados com embriões *VEGFR2^{-/-}*, verificou-se que estes morriam entre o E (dia embrionário) 8,5 e o E9,5 sem desenvolvimento de vasos sanguíneos ou células hematopoiéticas (Shalaby *et al.*, 1995). Posteriormente, soube-se que VEGFR2 actua apenas na linhagem endotelial e está associado aos precursores endoteliais no embrião e nas regiões extra-embriónicas (Yamashita *et al.*, 2000). A activação de VEGFR2 estimula assim diversas vias de sinalização que determinam a mitogénese, migração e sobrevivência das células endoteliais sendo o principal mediador da acção mitogénica e angiogénica de VEGFA. (Meyer *et al.*, 1999; Millauer, Shawver, Plate, Risau & Ullrich, 1994; Millauer *et al.*, 1993; Skobe, Rockwell, Goldstein, Vosseler & Fusenig, 1997; Wise *et al.*, 1999). A interacção de VEGFA com o receptor VEGFR parece também promover a permeabilidade vascular (Stacker and Achen, 1999). Os VEGFC e D ligam-se a VEGFR2 com menor afinidade que o VEGFA e a eficiência da activação das vias dependentes de VEGF também é mais fraca (Karamysheva, 2008). Sabe-se também que o VEGFD promove a migração das células endoteliais, mas não a sua proliferação (Karamysheva, 2008).

Ratinhos mutantes *VEGFR1^{-/-}* apresentam mortalidade embrionária precoce, não se devendo ao subdesenvolvimento do sistema vascular, uma vez que apresentam vasos sanguíneos, embora desorganizados, malformados e aumentados (Fong *et al.*, 1995), mas sim ao desenvolvimento excessivo das células endoteliais (Fong *et al.*, 1999). É correntemente aceite que o VEGFR1 é um regulador negativo da sinalização embrionária de VEGF, modulando os níveis de VEGF através do sequestro de VEGFA, impedindo a sua interacção com VEGFR2. VEGFB e PlGF podem competir com VEGFA para se ligarem a VEGFR1, aumentando a quantidade de moléculas de VEGFA que se podem ligar a VEGFR2. O VEGFR3 é expresso em todos os vasos primordiais, tornando-se posteriormente específico dos vasos linfáticos em desenvolvimento (Kaipainen *et al.*, 1995; Kukk *et al.*, 1996) (mutantes *VEGFR3^{-/-}* morrem antes do início do desenvolvimento dos vasos linfáticos e apresentam vasos sanguíneos desorganizados (Dumont *et al.*, 1998)). No adulto, é expresso principalmente no endotélio dos vasos linfáticos. Os ligandos VEGFC e D antes de sofrerem a maturação proteica apenas se podem ligar ao receptor VEGFR3 e quando maduros podem ligar-se também a VEGFR2. Portanto, estes podem activar a angiogénese e a linfoangiogénese, consoante o receptor ao qual estão ligados (Karamysheva, 2008).

Na vasculogénese da retina, ratinhos sem a isoforma VEGF₁₆₄ apresentaram alterações na formação das arteríolas, enquanto as vénulas se apresentavam normais (Stalmans *et al.*, 2002). Adicionalmente,

sabe-se que o receptor *VEGFR2* é expresso nas artérias e nas veias, enquanto *Nrp1* tem expressão somente nas artérias e *Nrp2* exclusivamente nas veias e vasos linfáticos (Karpanen *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2002). Uma vez que *Nrp1* tem maior afinidade para $VEGF_{164}$, o complexo $VEGF_{164}/Nrp1/VEGFR2$ parece ser importante para a formação do sistema arterial.

Sabe-se ainda que a via VEGF tem a capacidade de promover a angiogénese *in vitro* e *in vivo*. Portanto pensa-se que esta via, para além de ser essencial para a vasculogénese, esteja implicada também na angiogénese, embora não se conheça o seu papel preciso (Rossant and Howard, 2002). A hipóxia parece ser um dos factores mais importantes na indução da expressão de VEGF para promover a angiogénese fisiológica e patológica. Outros determinantes da sua expressão são o factor de crescimento epidérmico (EGF), factores de crescimento transformantes ($TGF\alpha$ e β), factor de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1), factores de crescimento de fibroblastos (FGF) e factores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) (Karamysheva, 2008).

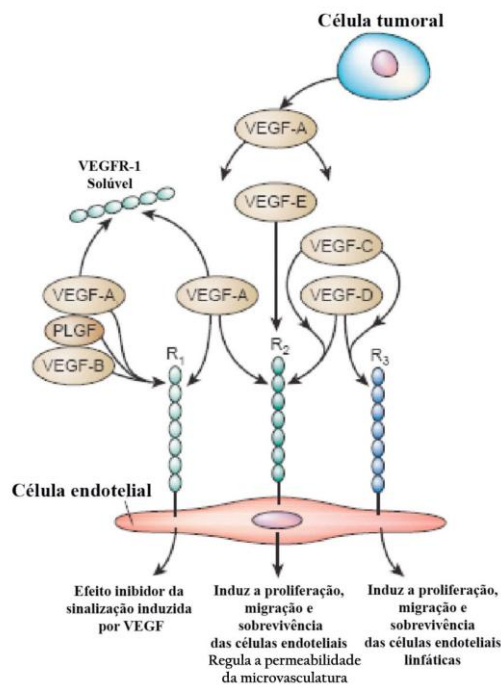


Figura nº 1.5 - Funções dos diferentes receptores e ligandos VEGF. Adaptado (Ferrara *et al.*, 2003).

Os processos de remodelação e estabilização vasculares dependem de múltiplas vias de sinalização, sendo a via Angiopietina/Tie uma das mais importantes.

Os dois receptores Tie, 1 e 2 (Tek), são receptores transmembranares com especificidade endotelial constituídos por um domínio cinase de tirosina (Dumont, Yamaguchi, Conlon, Rossant & Breitman, 1992; Korhonen, Polvi, Partanen & Alitalo, 1994; Sato, Qin, Kozak & Audus, 1993; Schnurch & Risau, 1993) e por um complexo domínio extracelular formado por repetições semelhantes a EGF, semelhantes a fibronectina e de imunoglobulinas. Ambos os receptores iniciam a sua expressão num estágio precoce do desenvolvimento do sistema vascular e mantêm a sua especificidade endotelial ao

longo do desenvolvimento embrionário e no adulto (Dumont *et al.*, 1995). Os ligandos de Tie2 são as Angiopietinas Ang1-4. Ang2 e 3 são fracos activadores do receptor e parecem antagonizar a activação de Tie2 por Ang1 (Maisonpierre *et al.*, 1997). No entanto, a acção de Ang2 depende de VEGF, promovendo a regressão vascular quando VEGF está presente e estimulando a angiogénese quando está ausente (Maisonpierre *et al.*, 1997).

Ang1 pode agir como homotrímero e Ang2 como homodímero. O receptor Tie2 ao interagir com o ligando forma homodímeros, sofre autofosforilação e interage com uma série de proteínas, nomeadamente com Dok-R (*dok-related protein* ou *docking protein 2*) (Jones *et al.*, 1999), Grb2 (*growth factor receptor binding protein 2*), Grb7, Grb14, p85 (*85kD protein*) e Shp2 (*sarcoma homology 2-containing tyrosine phosphatase*) (Jones and Dumont, 2000). A ligação de Ang1, secretada pelas células de suporte vasculares (Ramsauer and D'Amore, 2002), ao receptor Tie2 promove uma cascata de sinalização que determina a associação de pericitos ao endotélio, diminui a permeabilidade vascular e exhibe acção anti-inflamatória (Armulik, Abramsson & Betsholtz, 2005; Eklund & Olsen, 2006; Thurston, 2003). Mutações no receptor *Tie2*, assim como no seu ligando *Ang1*, não afectam a formação inicial dos vasos sanguíneos, mas os embriões morrem a meio da gestação com grandes defeitos na remodelação e estabilidade vasculares (Dumont *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1995; Suri *et al.*, 1996). Nestes mutantes, os vasos apresentam-se aumentados, com menor número de ramificações e as células endoteliais têm forma arredondada, separam-se das células de suporte e da matriz extracelular e sofrem apoptose. Adicionalmente, a sobre-expressão de *Ang1* no adulto leva a hipervascularização, com a formação de um elevado número de vasos maduros e estáveis (Suri *et al.*, 1998). Este facto contrasta com os efeitos da sobre-expressão de VEGF, que também provoca hipervascularização, mas, neste caso, os vasos são tubos endoteliais simples aumentados de tamanho, sem células de suporte e permeáveis (Drake & Little, 1995).

A partir de estudos *in vitro* e *in vivo* chegou-se à conclusão de que a via Ang-Tie age nas células endoteliais, nomeadamente na quimiotaxia, sobrevivência/protecção contra a apoptose, interacções com os componentes da matriz extracelular e estimulação da organização e ramificação vasculares. Esta via tem, deste modo, um papel fulcral no complexo processo de remodelação vascular (Loughna and Sato, 2001).

A sinalização via PDGF parece ser crucial para a proliferação e migração de células musculares lisas e de pericitos para a parede vascular em desenvolvimento (Lindahl and Betsholtz, 1998), um processo que requer interacções recíprocas entre o endotélio e as células de suporte (Drake *et al.*, 1998). As células endoteliais de capilares e artérias, sobretudo as células da ponta, secretam PDGFB devido à acção de VEGF, enquanto as células do músculo liso e pericitos expressam o receptor, *PDGFR-β* (Betsholtz *et al.*, 2001). Através de estudos em embriões mutantes descobriu-se que as células do músculo liso e os pericitos inicialmente vão-se diferenciando ao redor dos vasos, mas à medida que os vasos vão aumentando de tamanho e se vão ramificando, a sinalização PDGF é necessária para a co-migração e proliferação das células de suporte (Hellstrom, Kalen, Lindahl, Abramsson & Betsholtz,

1999). Além disso, julga-se que o efeito da Angiopietina na maturação dos vasos se deve, em parte, à acção desta sobre as células endoteliais para produzirem PDGFB (Rossant and Howard, 2002).

ii. Sinalização via TGF- β

A superfamília TGF- β é constituída por factores de crescimento transformantes, activinas e proteínas morfogenéticas do osso (Miyazono, 2001; Mummery, 2001). O ligando TGF- β está envolvido na regulação da proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência de muitos tipos celulares (Lebrin et al., 2005). Existem três isoformas do ligando TGF- β (1-3), dos quais TGF- β 1 parece ser essencial para o desenvolvimento vascular (Pepper, 1997). TGF- β liga-se a um receptor de tipo II (T β RII), que depois recruta e fosforila um dos receptores de tipo I (Alk1 ou 5) (Hoodless and Wrana, 1998). O receptor T β RII activado também pode interagir com Alk1, que se expressa apenas nas células endoteliais (Panchenko, Williams, Brody & Yu, 1996; Roelen, van Rooijen & Mummery, 1997). Através de numerosos estudos demonstrou-se que TGF- β parece ter uma acção bifásica, que resulta do balanço entre a sinalização de Alk1 e a de Alk5 nas células endoteliais. Deste modo, geralmente inibe a proliferação e migração endotelial e promove a produção da matriz extracelular e de inibidores de proteases e o recrutamento de células de suporte. No entanto, sob certas condições leva a um aumento da invasão e proliferação endotelial (Rossant and Howard, 2002). Assim, pensa-se que TGF- β associado à via Alk5, actua junto com outros factores angiogénicos para promover a fase de activação da angiogénese e que associado à via Alk1, promova a fase de resolução (Rossant and Howard, 2002). Além disso, nos mutantes de perda-de-função de *Alk1* também foram observadas malformações arterio-venosas, como anastomoses, e defeitos na diferenciação entre artérias e veias, com diminuição da expressão do marcador específico arterial EfrinaB2 (descrito na secção seguinte) (Urness *et al.*, 2000). No homem, as mutações em *Alk1* e em *endogлина* causam Telangiectasia hemorrágica hereditária (HHT) (Azuma, 2000), doença caracterizada por anastomoses arterio-venosas, fragilidade vascular e tendência para hemorragias. Tal sugere que a via TGF- β , através de Alk1, tenha um papel importante no estabelecimento da identidade arterial e venosa.

iii. Sinalização por Efrinas

A família Eph é constituída por receptores transmembranares, com um domínio cinase de tirosina, que interagem com os ligandos Efrinas (Flanagan & Vanderhaeghen, 1998; Xu & Wilkinson, 1997). Estes receptores e ligandos dividem-se em dois tipos, A e B, baseado na forma como os ligandos se fixam à membrana celular. As Efrinas-A (Efrina-A1-6) ligam-se através de uma âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI) e as Efrinas-B (Efrina-B1-3) têm um domínio transmembranar (Davis *et al.*, 1994). Estas últimas podem ter actividade sinalizadora, tal como os receptores, permitindo sinalização bidireccional (Henkemeyer *et al.*, 1996; Holland *et al.*, 1996). De um modo geral, os receptores EphA (EphA1-8) ligam-se às Efrinas-A e os EphB (EphB1-6) às B, mas existe pelo menos um receptor EphA (EphA4) que se liga a Efrinas-A e B (Gale et al., 1996). Inicialmente, estes

ligandos foram descritos como sendo determinantes no direccionamento dos axónios e na manutenção das fronteiras celulares no Sistema Nervoso Central (Gale & Yancopoulos, 1997; Orioli & Klein, 1997), assim como na migração das células da crista neural (Holder and Klein, 1999). Mais tarde, descobriu-se terem também um importante papel no estabelecimento da identidade endotelial arterial e venosa (Cheng et al., 2002). A *EfrinaB2* é especificamente expressa no endotélio das artérias em desenvolvimento e também em algumas células mesenquimatosas, enquanto o receptor *EphB4* é expresso no endotélio venoso (Wang et al., 1998). Outros membros da via Efrina/Eph também têm expressão vascular, mas a sua função não está bem estudada (Cheng et al., 2002). Mutantes de perda-de-função de *EfrinaB2* (Wang et al., 1998) ou *EphB4* (Gerety et al., 1999) morrem cerca do E10,5 com defeitos graves na remodelação vascular no saco vitelino e no embrião próprio. Alguns destes defeitos podem resultar de erros na interacção entre as artérias e veias em desenvolvimento.

A sinalização Efrina/Eph é despoletada pelas vias que estabelecem inicialmente a identidade arterial ou venosa dos precursores endoteliais, como Notch e VEGF. As proteínas Efrina/Eph estão envolvidas na formação de fronteiras de tecidos, através da sua capacidade de inibir o movimento ou a adesão celular (Wilkinson, 2000). No sistema vascular, esta via estabelece a repulsão bidireccional entre células endoteliais arteriais e venosas nas zonas fronteira para promover o correcto desenvolvimento do sistema arterial e venoso (Adams et al., 1999; Wang et al., 1998).

iv. Sinalização Notch

A via Notch tem um papel determinante no estabelecimento do destino arterial a jusante de VEGF. Diversos componentes desta via são expressos na vasculatura arterial. Assim, Notch1 e 4, Dll4 e Jagged2 são expressos no endotélio arterial (Del Amo et al., 1992; Shutter et al., 2000; Uyttendaele et al., 1996; Villa et al., 2001), Jagged1 no endotélio arterial e nas células do músculo liso (Loomes et al., 1999; Myat et al., 1996; Villa et al., 2001) e Notch3 apenas nas últimas (Joutel et al., 2000; Villa et al., 2001). Notch4 e Dll4 são os únicos componentes da via Notch cuja expressão no desenvolvimento vascular embrionário precoce parece ser totalmente restrita ao endotélio, incluindo o dos capilares em desenvolvimento (Shirayoshi et al., 1997; Shutter et al., 2000; Uyttendaele et al., 1996).

Embriões de ratinho *Notch1*^{-/-} morrem aproximadamente a E11 com graves defeitos na remodelação vascular e alguma degeneração vascular, apresentando anomalias na aorta e noutros grandes vasos (Krebs et al., 2000). Mutações de perda-de-função em *Notch4* não provocam alterações, mas duplos mutantes de perda-de-função de *Notch1* e *4* apresentam maiores defeitos vasculares do que os mutantes apenas de *Notch1* (Krebs et al., 2000). Nos casos mais graves, a veia cardinal anterior encontra-se ausente e a aorta dorsal colapsada. O facto de os embriões *Notch4*^{-/-} desenvolverem-se normalmente pode ser explicado pela existência de redundância funcional com Notch1. Os mutantes de perda-de-função de *Dll1* apresentam extensas hemorragias (Hrabe de Angelis et al., 1997), que podem ser devidas a defeitos na somitogénese ou na formação do Sistema Nervoso. Mutantes

Jagged1^{-/-} morrem a E10 com defeitos na remodelação vascular, permanecendo o plexo capilar primário inalterado (Xue et al., 1999).

Por outro lado, a sobre-expressão de *Notch* durante o desenvolvimento vascular também se traduz numa desorganização da vasculatura (Uyttendaele et al., 2001), com vasos dilatados e pouco ramificados. Estes mutantes também apresentam anastomoses arterio-venosas, expressão ectópica do marcador arterial *EfrinaB2* no sistema venoso e aumento do número de células de músculo liso a envolver os vasos (Carlson et al., 2005).

Graças à caracterização de algumas doenças genéticas raras ou mutações no homem, surgiram mais pistas sobre a função de Notch no desenvolvimento vascular (Joutel and Tournier-Lasserre, 1998). Assim, mutações pontuais no receptor *Notch1* resultam em Leucemia linfoblástica aguda de células T (Ellisen et al., 1991), mutações no ligando *Jagged1* causam a síndrome Alagille (Li et al., 1997; Oda et al., 1997) e a deficiência em *Notch3* provoca a síndrome arteriopatia cerebral autossómica dominante com enfartes subcorticais e leucoencefalopatia (CADASIL) (Joutel et al., 1996). A síndrome Alagille provoca lesões hepáticas, redução do número de ductos biliares, defeitos esqueléticos, deformação dos vasos sanguíneos, estenose arterial e doença cardíaca. A síndrome CADASIL causa enfartes, encefalopatia e demência progressiva (Ruchoux and Maurage, 1997). A nível histológico estes pacientes exibem degenerescência da camada muscular das artérias do cérebro e das arteríolas da pele.

Relativamente aos genes efectores da sinalização Notch, ainda não se sabe ao certo a sua função no sistema cardiovascular. Sabe-se que a perda-de-função de *Hey2* causa defeitos no desenvolvimento do coração e mortalidade na primeira semana de vida em ratinhos (Donovan et al., 2002; Gessler et al., 2002). A perda-de-função de *Hey1* não causa qualquer defeito aparente no desenvolvimento vascular, no entanto a perda-de-função combinada de *Hey1* e *Hey2* causa defeitos vasculares muito semelhantes aos da perda-de-função dos receptores *Notch*, morrendo os embriões a E10,5 (Fischer et al., 2004).

Constatou-se assim, que Notch tem um papel crucial na remodelação do plexo vascular primário apesar de não influenciar a sua formação inicial. Pensa-se que poderá regular a ramificação da vasculatura em desenvolvimento (Krebs et al., 2000; Xue et al., 1999). Adicionalmente, Notch parece ser fulcral na determinação do destino das células do músculo liso no embrião e na manutenção destas na vasculatura do adulto. Estudos sugerem haver um precursor comum das células endoteliais e das células do músculo liso (Yamashita et al., 2000) e que Notch esteja implicado na diferenciação desse precursor para uma ou para a outra linhagem. Possivelmente os defeitos observados nos mutantes anteriormente descritos devem-se a uma alteração no rácio entre células endoteliais e células do músculo liso (Rossant and Howard, 2002).

A sinalização Notch também regula a determinação do destino celular endotelial arterial *versus* venoso, provavelmente a montante da sinalização Efrina/Eph. Factos que suportam esta teoria são, por exemplo, a observação de que nos mutantes de ganho e perda-de-função de *Notch* existe apenas uma das duas identidades endoteliais possíveis. Além disso, é relevante constatar que Notch1 e 4, Dll4,

Jagged1 e 2 se encontram em níveis mais elevados nas artérias do que nas veias (Villa et al., 2001). Estudos em peixe-zebra injectados com uma forma dominante-negativa da proteína *Suppressor of Hairless* (homólogo de RBP-J_k) (Lawson et al., 2001; Zhong et al., 2001) demonstraram que Notch é necessário para suprimir a identidade venosa nas artérias em desenvolvimento.

Por outro lado, alguns investigadores sugerem que Notch3 possa antagonizar a sinalização de Notch1 e 4 em determinadas situações (Beatus et al., 1999). Este receptor parece modular a expressão de mediadores da apoptose e assim permitir a sobrevivência das células do músculo liso (Wang et al., 2002).

v. *Delta-like 4*

O gene *Dll4* encontra-se no cromossoma 15q14 no homem (cromossoma 2 no ratinho) e codifica uma proteína transmembranar tipo I de 685 aminoácidos. O seu domínio extracelular contém 8 repetições EGF-like, quatro locais de glicosilação e um domínio DSL com 45 aminoácidos, que são necessários para a interacção e activação de Notch1 e 4 (Sainson and Harris, 2007). O homem e o ratinho partilham 87% de homologia na sequência proteica de Dll4 (Sainson and Harris, 2007). No ratinho, a expressão de *Dll4* inicia-se a E7,5 apenas no tecido extra-embriónico, incluindo a membrana de Reicherts e as células gigantes do trofoblasto (Duarte et al., 2004; Mailhos et al., 2001). Posteriormente, tem expressão no endocárdio e nos grandes vasos arteriais, incluindo a aorta, as artérias dos arcos branquiais, as artérias umbilical e mesentérica e os vasos inter-somáticos (Duarte et al., 2004; Mailhos et al., 2001).

Entre os E9,5 e os E13 encontra-se expresso também numa pequena faixa de células dispersas no tubo neural ventral e aos E12,5 em células dispersas na retina neural. Pensa-se que Dll4 tenha por função gerar diversidade entre os neurónios recém-diferenciados. (Benedito & Duarte, 2005; Mailhos et al., 2001; (Rocha et al., 2009). A partir deste momento a sua expressão nos grandes vasos e no coração começa a desaparecer, mantendo-se apenas nos pequenos vasos arteriais e nos capilares (Benedito and Duarte, 2005). No embrião em desenvolvimento, *Dll4* é expresso também no timo, no epitélio pulmonar, no córtex adrenal, no baço, nos nódulos linfáticos, assim como, no intestino, sistema olfactivo e nos glomérulos renais (Benedito & Duarte, 2005; Mailhos et al., 2001; Shutter et al., 2000). Experiências *in vivo* demonstraram que os ratinhos heterozigóticos para *Dll4* morriam a cerca do E10,5 devido a defeitos vasculares, incluindo o estreitamento e constrição das aortas dorsais, uma ramificação vascular defeituosa, a regressão de artérias, o alargamento do saco pericárdico e a falta de remodelação da vasculatura do saco vitelino. Estes mutantes também apresentavam ausência de expressão de marcadores arteriais (Benedito et al., 2008; Duarte et al., 2004). O fenótipo destes mutantes é semelhante ao de mutantes de perda-de-função de Notch1, o que sugere que Notch1 seja o receptor deste ligando no desenvolvimento vascular. Passando esta mutação para o genótipo ICR ou CD1, com fundo genético aleatório, verificou-se que alguns embriões conseguiam chegar ao termo da gestação. Os ratinhos *Dll4*^{-/-} morriam antes do E10,5 com defeitos vasculares semelhantes, mas mais

acentuados, aos dos animais haploinsuficientes para *Dll4* (Benedito et al., 2008). Por outro lado, no estudo de mutantes com sobre-expressão de *Dll4*, verificou-se que os animais morriam antes do E10,5, apresentando um alargamento das aortas dorsais, anastomoses arterio-venosas, expressão ectópica de marcadores arteriais no sistema venoso e redução da ramificação vascular e da proliferação e migração de células endoteliais (Trindade et al., 2008). Estes estudos em mutantes com perda e ganho-de-função, confirmam o papel fulcral de *Dll4* no desenvolvimento da identidade arterial e na regulação da angiogénese, apresentando um efeito estreitamente dependente dos níveis e da localização da sua expressão.

Para se compreender melhor o papel de *Dll4* no desenvolvimento e diferenciação vascular realizaram-se estudos na retina de ratinho, onde o desenvolvimento da vasculatura só tem início após o nascimento e encontra-se bem caracterizado permitindo a sua manipulação a nível experimental. Assim, descobriu-se que a expressão de *Dll4* na vasculatura da retina depende dos níveis de VEGF, o principal factor indutor do crescimento vascular nesta (Lobov et al., 2007). Ratinhos haploinsuficientes para *Dll4* e animais submetidos ao bloqueio farmacológico da via *Dll4*/Notch a nível ocular apresentaram um aumento da ramificação vascular e da proliferação das células endoteliais, formando um plexo capilar superficial muito denso com numerosos vasos interligados (Lobov et al., 2007). Deste modo, *Dll4* parece ter um papel regulador evitando a excessiva ramificação vascular e promovendo a formação de um plexo vascular bem diferenciado (Lobov et al., 2007).

No adulto, *Dll4* é expresso principalmente no rim, no pulmão, no coração, no ovário, nos testículos, no intestino e no endotélio vascular (Mailhos et al., 2001; Shutter et al., 2000). Neste último, o ligando encontra-se apenas nas pequenas artérias e capilares e parece actuar como factor anti-angiogénico, regulando negativamente factores pró-angiogénicos, como o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) e regulando positivamente factores de maturação e estabilização vascular, como o factor de crescimento transformante-*beta* (TGF- β) (Benedito et al., 2008). A expressão vascular de *Dll4* no adulto é fraca. Contudo, encontra-se aumentada nos processos onde ocorre neoangiogénese fisiológica (cicatrização de feridas, ciclo menstrual) e patológica (tumores) (Patel et al., 2006). É conhecido que o desenvolvimento tumoral requer geralmente um crescimento paralelo da vasculatura local. O VEGF é o factor melhor caracterizado implicado na activação da angiogénese a nível tumoral. Assim como foi observado noutros tecidos, também no endotélio tumoral, a expressão de *Dll4* parece depender dos níveis de VEGF. O bloqueio de *Dll4* em modelos tumorais xenotransplantados determinou um aumento da densidade vascular tumoral consequente da formação de vasos sanguíneos exacerbadamente ramificados. Paradoxalmente, este elevado desenvolvimento vascular revelou-se não funcional, uma vez que os vasos apresentaram fraca perfusão e o tecido tumoral níveis elevados de hipóxia. Consequentemente, o bloqueio de *Dll4* determinou uma redução significativa do desenvolvimento tumoral, mesmo em tumores resistentes à terapia anti-VEGF (Noguera-Troise et al., 2006).

Para além de VEGF (Liu et al., 2003; Patel et al., 2005; Williams et al., 2006), existem numerosos factores que regulam positivamente a expressão de Dll4, nomeadamente factor de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) (Patel et al., 2005), interleucina-6 (IL-6) (Suzuki et al., 2006), subunidade α do factor de indução de hipóxia 1 (HIF-1 α) (Harris, 2002), proteínas *Forkhead box C* (Foxc) (Seo et al., 2006) e o próprio NICD de Notch1 (Shawber et al., 2003).

Biologia tumoral

As neoplasias ocorrem através de crescimento tecidual novo, constituído por células com origem em tecidos normais, mas que sofreram modificações genéticas transmissíveis à descendência que lhes permitem serem insensíveis aos mecanismos de controlo do crescimento, expandindo-se para além dos seus limites anatómicos (Plank & Sleeman, 2003). A principal causa de aparecimento de tumores primários é a ocorrência e acumulação de mutações genéticas em uma ou mais células, conduzindo a proliferação descontrolada ou a diminuição da taxa de apoptose (Plank and Sleeman, 2003). O processo de transformação de uma célula normal numa célula cancerígena pode incluir a activação de oncogenes, síntese contínua de telomerasas ou indução de aneuploidia. Pode também incluir mutações em genes supressores de tumores ou em genes que promovem a estabilidade genética, como reguladores da apoptose e genes de reparação do DNA (Duesberg et al., 1999; Hahn and Weinberg, 2002; Pelengaris et al., 2002). As células da maioria ou possivelmente de todos os tumores humanos adquirem seis alterações fisiológicas essenciais, que lhes permitem evadir-se dos mecanismos de defesa do organismo e determinam o desenvolvimento do cancro. Estas capacidades adquiridas pelas células cancerígenas são, nomeadamente, a auto-suficiência em sinais de crescimento, a insensibilidade a sinais inibidores do crescimento, a evasão à apoptose, o potencial replicativo ilimitado, a angiogénese sustentada, e a invasão de tecidos e formação de metástases (Hanahan and Weinberg, 2000). O desenvolvimento tumoral envolve uma fase de iniciação induzida pela exposição única a um agente carcinogénico genotóxico que origina uma mutação irreversível num gene. A mutação leva a que a célula tenha maior capacidade de proliferação ou resistência à apoptose. Posteriormente ocorre a fase de promoção, na qual a aplicação repetida de um agente carcinogénico não mutagénico/não genotóxico leva à proliferação das células iniciadas, sendo esta fase reversível. A última fase corresponde à progressão, na qual ocorre a conversão de um tumor benigno em maligno e, numa fase mais avançada, em tumor metastático. Esta fase é irreversível e é induzida frequentemente por novas mutações e por alterações epigenéticas (Plank and Sleeman, 2003)

Modelos tumorais geneticamente alterados

Os modelos tumorais geneticamente modificados são amplamente utilizados. Estes modelos de ratinhos desenvolvem tumores autonomamente, como o caso do *Her2/neu* (Neu/NDL2-5) (Hanahan, 1985). Uma vantagem destes modelos, chamados autóctones, é os tumores se desenvolverem “naturalmente” no hospedeiro e poderem ser monitorizados durante um período de tempo

relativamente longo, simulando adequadamente as diferentes fases do desenvolvimento de tumores equivalentes em humanos. As desvantagens do uso de modelos autóctones prendem-se com o custo de manter e monitorizar os animais durante o período de desenvolvimento do tumor e com o facto de os tumores serem completamente murinos (Teicher, 2006).

i. Modelo transgénico Her2/*neu*

O modelo murino transgénico Her2/*neu* (NeuNDL2-5 ou ErbB-2) tem vindo a ser utilizado no estudo de mecanismos moleculares, e vias da carcinogénese multifásica com o objectivo de compreender o seu envolvimento na progressão do cancro da mama e formação de metástases. Este modelo murino também já foi usado em ensaios terapêuticos de prevenção da progressão das lesões iniciais para a fase angiogénica, de tratamento da fase de crescimento rápido tumoral ou de regressão da carga tumoral estabelecida e resistência às terapias hoje em utilização (Fantozzi and Christofori, 2006; Hutchinson and Muller, 2000; Ursini-Siegel et al., 2007).

Este modelo foi construído tendo como base a sobreexpressão e amplificação do protooncogene *neu* (Her2/c-erbB2/ERBB2), membro da família das cinases de tirosina conhecidas como receptores de factores de crescimento epitelial (*Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR*), associado ao desenvolvimento de cancro primário da mama mais agressivo (Ursini-Siegel et al., 2007), estando sob o controlo do promotor *Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) Long Terminal Repeat (LTR)* (Guy et al., 1992).

Embora a expressão do oncogene tenha início durante o desenvolvimento embrionário, inicialmente a glândula mamária aparenta um aspecto anatómico e histológico normal. Em fêmeas múltiparas, a partir das 18 a 20 semanas de vida, lesões hiperplásicas displásicas começam a surgir, resultando em adenocarcinomas mamários proliferativos e multilocalizados com potencial metastático em 60% das fêmeas analisadas, às 25 semanas de vida.

As fêmeas de ratinho têm cinco pares de glândulas mamárias, com igual potencial tumorigénico neste modelo, morrendo geralmente às trinta semanas de vida devido à elevada carga tumoral (Siegel et al., 1999).

Terapia anti-angiogénica tumoral

Inicialmente os tumores são avasculares e dependem do fenómeno de difusão passiva para a sua sobrevivência e crescimento (Plank and Sleeman, 2003). Quando atingem 0,5mm de diâmetro os tumores entram num estado de dormência (Folkman, 1986). Sabe-se que a activação da angiogénese (*angiogenic switch*) é essencial para o crescimento da maioria dos tumores sólidos a partir de 1-2 mm de diâmetro (Folkman and Hanahan, 1991). A indução da neoangiogénese pode ocorrer como resposta ao aumento da hipóxia no tecido tumoral induzir a expressão de VEGF, o tumor em si adquirir capacidade de expressar VEGF e outros factores pró-angiogénicos ou por o tumor ser capaz de recrutar progenitores endoteliais vindos da medula óssea (Dass, 2004). Quando a angiogénese é

iniciada, as células endoteliais próximas do tumor são activadas, soltam-se das células adjacentes e secretam enzimas proteolíticas que vão degradar a membrana basal. Em seguida, as células endoteliais migram em direcção ao tumor e proliferam de modo a formar novos vasos (Plank and Sleeman, 2003). A vasculatura tumoral caracteriza-se por ser imatura, desorganizada, hemorrágica e extremamente permeável, sendo estas características reguladas por diversas vias de sinalização, entre as quais se destacam VEGF e Ang2. Estas particularidades contribuem para a penetração das células tumorais nos vasos e deste modo, para a sua disseminação no organismo formando metástases (Baluk et al., 2005; Carmeliet and Jain, 2000; Ferrara and Kerbel, 2005; Jain, 2005). Consequentemente, desenvolveram-se fármacos bloqueadores da angiogénese tumoral e, deste modo, inibidores do desenvolvimento dos tumores. Esta modalidade terapêutica pode ser realizada bloqueando factores pró-angiogénicos, tendo como objectivo características específicas ou anomalias dos vasos tumorais ou estimulando a produção de moléculas anti-angiogénicas (Thurston, Noguera-Troise & Yancopoulos, 2007). Supôs-se que uma das vantagens desta forma terapêutica comparativamente com a quimioterapia, seria o facto da estabilidade genética das células endoteliais a nível tumoral diminuir a probabilidade de resistências. Assim, em Fevereiro de 2004 nos Estados Unidos foi aprovado o fármaco Avastin[®], cujo princípio activo é denominado bevacizumab, um anticorpo monoclonal anti-VEGFA. Este medicamento determina um ligeiro aumento da esperança de vida nos casos de cancro colo-rectal metastático, quando em associação com quimioterapia. Sabe-se também que não é eficaz em todos os tipos tumorais e que alguns desenvolvem resistência ao fármaco (Casanovas et al., 2005; Jain et al., 2006; Kerbel et al., 2001). Em Dezembro de 2004 foi também aprovado o fármaco Macugen[®] (princípio activo pegaptanib), um aptâmero que bloqueia a isoforma VEGF165 usado para o tratamento de uma das formas de degenerescência da mácula relacionada com a idade (Gragoudas et al., 2004). Para além destes fármacos, já foram testados inibidores das cinases de tirosina (Nexavan[®], princípio activo sorafenib; Sutent[®], princípio activo sunitinib; Tarceva[®], princípio activo erlonitinib), dos receptores integrina e das metaloproteases, entre outros (Institute, 2008; Ishibe and al, 2011).

Como foi referido anteriormente, a via Notch regula negativamente a sinalização VEGF na angiogénese fisiológica e patológica e parece ser um alvo promissor na terapia anti-angiogénica (Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006). Assim, produziram-se inibidores da *gamma*-secretase, como *N-[N-(3,5-difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine t-butyl ester* (DAPT) e dibenzazepina (DBZ), que bloqueiam a via Notch por completo. Esta forma terapêutica pode causar toxicidade a nível intestinal por provocar o aumento das células caliciformes das criptas e a diminuição das células epiteliais (Fre et al., 2005; Milano et al., 2004; van Es et al., 2005; Wong et al., 2004). No entanto, poderá ser relevante no tratamento dos casos em que a via Notch esteja directamente implicada na oncogénese, como em certos cancros mamários e leucemias linfoblásticas agudas de linfócitos T. Recentemente os estudos têm-se focado no ligando *Dll4*, que tem expressão aumentada no endotélio dos vasos tumorais e, em alguns casos, em células do tumor. Os níveis elevados de *Dll4* podem ser devidos à expressão aumentada de *VEGF*, uma vez que estão directamente

relacionados (Patel et al., 2006). No entanto, pensa-se que Dll4 tem funções na angiogénese que são independentes de VEGF. Assim, desenvolveu-se um anticorpo que neutraliza Dll4 (Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006) e proteínas de fusão solúveis que se ligam aos receptores Notch e impedem a ligação de Dll4 a estes (Noguera-Troise et al., 2006; Schemet et al., 2007). Ao contrário do bloqueio de VEGF, que leva à redução do número de vasos e aparente “normalização” dos vasos remanescentes no tumor, o bloqueio de Dll4 provoca um aumento da densidade vascular. Esta é devida ao aumento no número de ramificações e formação de pequenas intercomunicações entre os vasos. Paradoxalmente, este aumento vascular é acompanhado de redução de 50% a 90% do crescimento do tumor, dependendo do modelo tumoral (Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006; Schemet et al., 2007), mesmo em tumores com elevada resistência ao bloqueio de VEGF (Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006). Além disso, apesar do tamanho reduzido, os tumores apresentam-se mais hipóxicos. Este paradoxo deve-se aos vasos neoformados serem anormais, pouco funcionais, desorganizados e imaturos. Adicionalmente, um número considerável de vasos não tem lúmen (Gerhardt et al., 2003) e a maioria apresenta fraca perfusão e elevada permeabilidade (Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006). Não se observou qualquer toxicidade sistémica. No entanto, são necessários mais estudos para verificar que não tem efeitos adversos, principalmente a nível imunitário e hematopoiético, onde também se observa expressão de *Dll4* (Fung et al., 2007; Suzuki et al., 2006). Adicionalmente, o bloqueio simultâneo de VEGF e Dll4 leva a uma inibição mais potente do desenvolvimento tumoral do que o bloqueio de cada uma destas vias isoladamente (Thurston et al., 2007). Também se sabe que certos tumores resistentes a ambas as vias separadamente, tornam-se sensíveis quando estas são bloqueadas em conjunto (Ridgway et al., 2006).

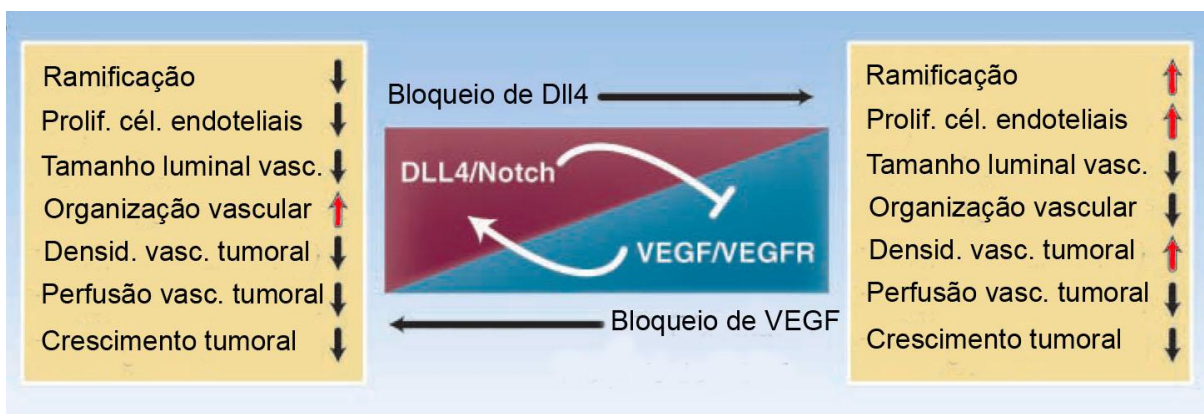


Figura nº 1.6 – Efeitos do bloqueio de VEGF e de Dll4 no desenvolvimento tumoral. Adaptado (Thurston et al., 2007).

Recentemente, também a via EfrinaB2/EphB4 tem vindo a ser alvo de estudo para o desenvolvimento de novos fármacos que inibam o desenvolvimento tumoral, ou mesmo que provoquem a sua regressão.

Este par receptor-ligando que actua a jusante das vias Notch e VEGF, tem um papel fundamental na especificação endotelial artéria-veia. Efrina-B2 é especificamente expressa nos angioblastos arteriais, células endoteliais e células mesenquimais perivasculares, enquanto que EphB4 é expresso nas células endoteliais apenas do sistema venoso. Em embriões em desenvolvimento, verificou-se que o bloqueio de EphB4 e da Efrina B2 resultam em letalidade precoce pelo efeito na angiogénese mas não na vasculogénese (Adams et al., 1999; Gerety and Anderson, 2002; Gerety et al., 1999).

A forma monomérica do domínio extracelular de EphB4 funciona como antagonista da sinalização EphB4-EfrinaB2, bloqueando a migração das células endoteliais e retardando a angiogénese em modelos tumorais (Kertesz et al., 2006). Assim, a fusão desta proteína com albumina no C-terminal (sEphB4) resulta num fármaco com elevado potencial para a inibição do desenvolvimento tumoral, diminuindo o número de tumores e o seu volume em modelos tumorais, como resultado, entre outros efeitos, da diminuição da densidade vascular (Djokovic et al., 2010).

OBJECTIVOS

No seguimento do estudo do efeito terapêutico do bloqueio de Dll4 e combinação com bloqueio da via Efrina B2/EphB4 (Djokovic et al., 2010) na angiogénese tumoral, o presente projecto de investigação teve como principal objecto de estudo avaliar o potencial terapêutico do bloqueio de Dll4 e da via EfrinaB2/EphB4 no desenvolvimento de adenocarcinomas mamários e na formação de metástases pulmonares em ratinhos *Her2/neu*.

Para tal foram estabelecidos os seguintes objectivos:

- Criação de linhas *Her2/neu Dll4^{+/+}* e *Her2/neu Dll4^{+/-}*;
- Análise do desenvolvimento tumoral de adenocarcinomas mamários em ratinhos *Her2/neu Dll4^{+/+}* e *Her2/neu Dll4^{+/-}*;
- Estudo do desenvolvimento vascular dos tumores mamários no que se refere a densidade, maturação e funcionalidade dos vasos recém-formados;
- Observação da formação de metástases em ratinhos *Her2/neu* com perda parcial de Dll4 em comparação com os ratinhos controlo;
- Estudo do envolvimento de vias pró e anti-angiogénicas no desenvolvimento tumoral;
- Análise do efeito terapêutico da proteína solúvel EphB4 no desenvolvimento de tumores mamários e formação de metástases;

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Materiais

2.1.1. Ratinhos Her2/neu

Os ratinhos Her2/neu foram gentilmente cedidos pelo Dr. William Muller, *McGill University, Canada* (Siegel et al., 1999).

A partir da primeira semana de vida, todos os ratinhos foram sujeitos a genotipagem através da extração de DNA genómico da cauda.

Todas as experiências em que foram utilizados animais neste estudo foram aprovadas pelo Comité de Ética e de Bem-Estar animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa.

2.1.2. Reagentes

Reagentes	Fabricante
Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS); Isopropanol; Etanol Absoluto; Agarose; Lâminas adesivas <i>super-frost plus</i> ; Metanol; Peróxido de Hidrogénio	VWR
EDTA; Ácido Clorídrico (HCL); Cloreto de Sódio (NaCL); Cloreto de Magnésio (MgCl ₂); NP40; Paraformaldeído; Sacarose; Gelatina de pele porcina tipo A; Isopentano; Avertin [®] ; Lectina biotinilada de <i>Lycopersicum esculentum</i> ; Hematoxilina; Eosina; Microscopy Entellan [®] Neu; Soro de Cabra; Tween [®] 20; X-Gal; Ferro, Ferri; dNTPs Mix	Sigma-Aldrich
Dodecilsulfato de Sódio (SDS)	MERCK
Proteinase K	NZYTECH
Mini kit RNeasy [®]	ISAZA
Xilol	Panreac
<i>Kit SuperScript[®] III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR</i>	Alfagene
<i>Kit Power SYBR Green PCR Master Mix[®]</i>	BioPortugal
Triton [®] X-100 (<i>polyethylene glycol tert-octylphenylether</i>)	Fluka
Go Flexi Taq Polimerase; Tampão de PCR;	Promega

2.1.3. Soluções

2.1.3.1. Solução de TE

Solução stock

1,21 g de Tris

0,34 g de EDTA

800 ml de água estéril

Acertar o pH com HCl concentrado para 7,5
 Perfazer o volume final de 1 l com água estéril
 Autoclavar

Solução de trabalho

Diluir a solução *stock* 1:10 com água estéril

2.1.3.2. Solução para extração do DNA genômico da cauda de ratinho

Tail Buffer

5,9 g de NaCl

50 ml de Tris 1 M

200 ml de EDTA a 500 mM

100 ml de SDS a 10 %

Perfazer o volume final de 1 l com água estéril.

Autoclavar para esterilizar.

LacZ Wash Buffer

0,8 ml de MgCl₂ 1M

2ml de P40 2%

Perfazer até 200ml com fosfato de sódio a 0,1M

2.1.4. Sequências de Oligonucleótidos iniciadores

2.1.4.1. Oligonucleótidos iniciadores utilizados em PCR

Identificação	Sequência nucleotídica (5' - 3')
<i>her2 Fwd</i>	TTCCGGAACCCACATCAGGCC
<i>her2 Rev</i>	GTTTCCTGCAGCAGCCTACGC

2.1.4.2. Oligonucleótidos iniciadores utilizados em PCR tempo real

Identificação	Sequência nucleotídica (5' - 3')
<i>beta-actin Fwd</i>	GATCCTCACGGAATTCATGG
<i>beta-actin Rev</i>	GGGGTGTGAAGGTCTCAA
<i>Dll4-Fwd</i>	GGAACCTTCTCACTCAACATCC
<i>Dll4-Rev</i>	CTCGTCTGTTCGCCAAATCT
<i>EFRINAB2 F2</i>	TCCCTTTGTGAAGCCAAATC
<i>EFRINAB2 R2</i>	TACTTGAGCAGCAGCAGCACCAC
<i>PDGFR-β Fwd</i>	TGATGAAGGTCTCCCAGAGG
<i>PDGFR-β Rev</i>	AGGAGATGGTGGAGGAAGTG
<i>VEGFR1-Fwd</i>	GACCCTCTTTTGGCTCCTTC
<i>VEGFR1-Rev</i>	CAGTCTCTCCCGTGCAAAT

<i>VEGFR2-Fwd</i>	GGCGGTGGTGACAGTATCTT
<i>VEGFR2-Rev</i>	GAGGCGATGAATGGTGATCT
<i>VEGFR3-Fwd</i>	CGAAGCAGACGCTGATGATA
<i>VEGFR3-Rev</i>	CCCAGGAAAGGACACACAGT
<i>VEGFA-Fwd</i>	GGAGAGCAGAAGTCCCATGA
<i>VEGFA-Rev</i>	ACACAGGACGGCTTGAAGAT
<i>VEGFC-Fwd</i>	CCTGAATCCTGGGAAATGTG
<i>VEGFC-Rev</i>	TCGCACACGGTCTTCTGTAA
<i>PECAM-1 F2</i>	CAAGCAAAGCAGTGAAGCTG
<i>PECAM-1 R2</i>	TCTAACTTCGGCTTGGGAAA
<i>Tie2-Fwd</i>	CCCCTGAACTGTGATGATGA
<i>Tie2-Rev</i>	CTGGGCAAATGATGGTCTCT
<i>Hey2-Fwd</i>	TGCCAAGTTAGAAAAGGCTGA
<i>Hey2-Rev</i>	CACTCTCGGAATCCAATGCT

2.2. Métodos

2.2.1. Extracção do DNA genómico de caudas de ratinhos Her2 (Neu NDL 2-5)

Cortou-se com uma tesoura desinfectada cerca de 3 mm da extremidade da cauda de cada ratinho e colocou-se em *ependorfs*. Cada cauda foi digerida durante a noite com 20 µl de proteinase K (20 mg/ml) e 730 µl de tampão *Tail Buffer* numa estufa a 55 °C. No dia seguinte colocou-se 250 µl de NaCl 5 M em cada *ependorf* e, depois de homogenizados, os *ependorfs* foram centrifugados durante 20 min a 15,7 rcf (Centrífuga *ependorf*, Centrifuge 5415 D). Foram então retirados 800 µl de sobrenadante e colocados num novo *ependorf* com 750 µl de isopropanol. Depois de se homogenizar as soluções, os *ependorfs* foram centrifugados durante 5 min a 15,7 rcf. Rejeitou-se o sobrenadante, adicionou-se 750 µl de etanol a 70% e centrifugou-se de novo durante 5 min a 15,7 rcf. Rejeitou-se o sobrenadante e colocou-se o *pellet* a secar à temperatura ambiente. Quando seco, ressuspendeu-se o *pellet* em 250 µl de tampão TE e guardou-se o tubo num congelador a -20 °C.

2.2.2. Genotipagem de ratinhos Her2/neu

Estes ratinhos foram genotipados através do seguinte protocolo de reacção em cadeia da polimerase (PCR):

1. Mistura de reacção (para 20 µL)

Volume (µL)	Componente	Concentração Stock	Concentração na reacção
4	Tampão de PCR	5x	5x
0,5	dNTPs Mix	10 mM	10 mM
1,6	MgCl ₂	50 mM	25 mM
0,4	Taq DNA polimerase		
0,5	Oligonucleótido iniciador her2 Fw		
0,5	Oligonucleótido iniciador her2 Rev		
11,5	Água _{DEPC} SDW	-	-
1	DNA genómico		

2. Programa de temperaturas

1º ciclo (1x)	Desnaturação inicial	95° C, 2 min
2º ciclo (35x)	Desnaturação	95° C, 30 s
	Hibridação	54° C, 30 s
	Polimerização	72° C, 30 s
36º ciclo (1x)	Polimerização final	72° C, 30 s
37º ciclo (1x)	Repouso	4° C, sem limite de tempo

Tamanho da banda her2: 630 bp

2.2.3. Genotipagem de ratinhos Her2/neu Dll4^{+/-}

Aos ratinhos Her2/neu positivos, para confirmar a perda parcial de Dll4, recorreu-se à técnica baseada na reacção com X-gal, indicativa da expressão da enzima β-galactosidase, codificada pelo gene lacZ, gene reporter associado à perda de um dos alelos de Dll4 (Duarte et al., 2004). Para tal, cortou-se com uma tesoura desinfectada cerca de 3 mm da extremidade da cauda de cada ratinho positivo para her2 e colocaram-se as mesmas em poços de um placa de 96 poços.

Cada cauda foi digerida durante a noite com ferrocianida de potássio, (50x), X-Gal (25x) e LacZ Wash Buffer (1x), numa estufa a 37 °C, durante a noite. No dia seguinte as caudas foram observadas à lupa (Olympus SZX12) de modo a verificar a marcação dos vasos a azul, indicando quais os ratinhos Dll4^{+/-}.

2.2.4. Determinação da concentração de sEphB4

A proteína sEphB4, uma proteína de fusão solúvel formada pelo derivado monomérico do domínio extracelular de EphB4 associado a albumina sérica humana, foi gentilmente cedida pelo colaborador Doutor Parkash S. Gill, *University of Southern California*, EUA.

A concentração da proteína sEphB4 foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Verificou-se que era possível fazer a determinação da proteína a 595 nm, comprimento de onda igual ao indicado para aquele método. Para efectuar a recta de calibração prepararam-se 5 soluções padrão de BSA em PBS. As soluções, variando de 0,2 a 1 mg/ml (em progressão exponencial), foram obtidas por diluições sucessivas. Distribuíram-se 50 µl de cada solução padrão por tubos de hemólise (vidro Normax) e adicionou-se 1,45 ml de reagente de Bradford, diluído a 1:5 em água destilada, a cada tubo. As soluções foram mantidas 5 a 10 min no escuro e de seguida procedeu-se à leitura da absorvância destas a 595 nm, seguido da construção da curva padrão e determinação da equação da respectiva recta de regressão linear (Figura nº 7).

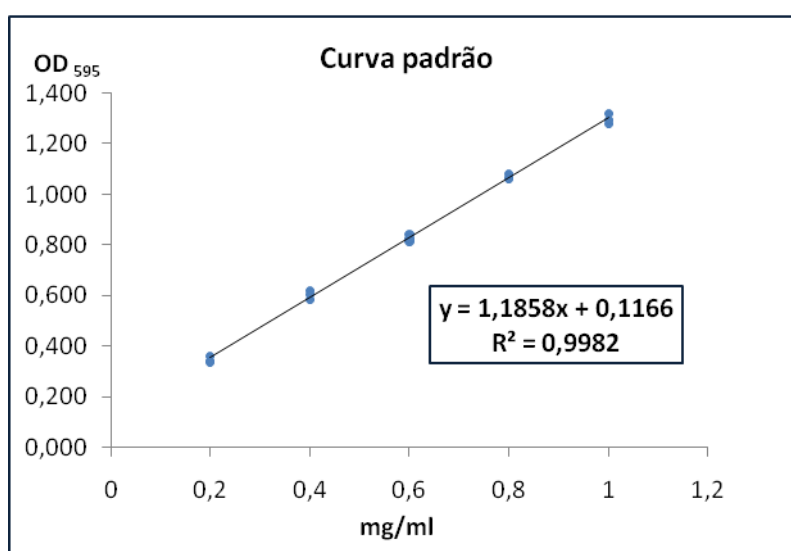


Figura nº 2.7 – Curva padrão para determinação da concentração de proteína pelo método de Bradford.

Quatro alíquotas de 50 µl de cada uma das amostras foram colocadas em tubos de vidro aos quais foi adicionado 1,45 ml de reagente de Bradford. Estas soluções foram então avaliadas por espectrofotometria de acordo com o procedimento acima descrito. A concentração de proteína das amostras foi expressa em mg/ml, representando a média das concentrações calculadas a partir da equação da recta de regressão linear da curva padrão.

2.2.5. Ensaio terapêutico com sEphB4 em ratinhos Her2/neu

Numa primeira experiência, ratinhos Her2/neu com 20 semanas de vida foram separados em dois grupos iguais de dez animais. Após terem sido pesados, verificando-se um peso médio de $35 \text{ g} \pm 5 \text{ g}$ nas fêmeas, um grupo foi tratado com PBS (veículo/controlo) e outro com sEphB4 (15 mg / kg / dia). O administração de sEphB4 foi efectuada por via intraperitoneal, com seringa de insulina (de 1 ml) (PIC indolor, 0805323) e agulha de 26 G x $\frac{1}{2}$ ", 0,45 x 12 mm (B. Braun, 4665457), em dias alternados, 3 vezes por semana, à mesma hora, durante 5 semanas.

2.2.6. Recolha dos adenocarcinomas mamários e metástases pulmonares e processamento dos tecidos

Para as experiências com ratinhos Her2/neu Dll4^{+/-} e com os tratados com sEphB4, o procedimento de recolha e processamento dos adenocarcinomas mamários e metástases pulmonares foi idêntico.

Seis ratinhos de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical no final do tratamento, com 25 semanas de idade, próximo da idade a que os ratinhos com adenocarcinomas mamários morrem devido à elevada carga tumoral. Posteriormente, foram dissecados com uma tesoura e uma pinça de modo a recolher as glândulas mamárias. Os adenocarcinomas mamários foram isolados numa placa de petri com PBS, à lupa e, com uma craveira, mediu-se o diâmetro maior (L) e o diâmetro menor (S) de cada tumor e calculou-se o volume tumoral através da fórmula:

$$V = 0,52 \times L \times S^2$$

Foi medido o número de tumores macroscópicos presentes em cada ratinho assim como os volumes dos mesmos que, somados, indicaram a carga tumoral por animal.

Após a análise macroscópica, os adenocarcinomas foram transferidos, isoladamente, para tubos com 5 ml de solução de 4 % de paraformaldeído e 4 % de sacarose em PBS, onde foram mantidos durante 1 h a 4 °C, de modo a serem fixados. Em seguida, foram transferidos, isoladamente, para um tubo com 5 ml de sacarose a 15 % em PBS, onde permaneceram durante noite a 4 °C de modo a sofrerem desidratação. No dia seguinte, os tumores foram retirados do frio e colocados em banho-maria a 37 °C durante 30min. Preparou-se uma solução com 7,5% de gelatina e 15% de sacarose em PBS e elaborou-se um bloco de gelatina de cada tumor. Estes blocos foram congelados em isopentano a -60 a -80 °C, arrefecido por azoto líquido e colocados no congelador a -80 °C para posterior crioseccionamento e análise por imunofluorescência.

Os outros quatro animais de cada grupo foram anestesiados por via intraperitoneal, utilizando uma agulha de 26 G x $\frac{1}{2}$ ", 0,45 x 12 mm acoplada a uma seringa de insulina (de 1 ml), com 300 µl de Avertin (princípio activo: 2-2-2 tribromoetanol) a 2,5 % em PBS estéril. Em seguida, injectou-se transcardiacamente, com uma seringa de insulina (de 1ml) e uma agulha de 26 G x $\frac{1}{2}$ ", 0,45 x 12 mm, 100 µl de lectina biotinizada (*lectin biotinylated from Lycopersicum esculentum*), um indicador da

perfusão vascular uma vez que se liga à superfície luminal das células endoteliais, preparada em 2 ml de PBS estéril (100 µg de lectina em 100 µl de PBS). Esperou-se 5 min para permitir a sua circulação e efectuou-se perfusão transcardíaca durante 3 min com paraformaldeído a 4 % em PBS estéril.

Para a recolha das metástases pulmonares, nos mesmos ratinhos, foram expostos os pulmões da cavidade torácica e insuflados com paraformaldeído a 4% em PBS estéril para evitar o seu colapso. De seguida foram observados à lupa para contagem e observação das metástases.

2.2.7. Recolha de adenocarcinomas mamários para PCR em tempo real

Os ratinhos foram anestesiados com 300 µl de Avertin[®] a 2,5 % em PBS estéril por via intraperitoneal, tal como foi descrito anteriormente. Com uma tesoura e uma pinça de dissecação serrilhada retirou-se cada adenocarcinoma de todas as glândulas mamárias e, para cada ratinho, colocaram-se tumores mamários num *eppendorf*. Foram então congeladas em azoto líquido e depois colocadas num congelador a -80 °C para posterior extracção de RNA e serem usadas na técnica de PCR em tempo real.

2.2.8. Criosecção dos blocos de gelatina de tumores e recolha dos cortes em lâminas adesivas

Os blocos de gelatina foram cortados num crióstato Leica CM3050S a -29 °C e as criosecções foram colhidos em lâminas adesivas *super-frost plus* de modo a que se obtivessem duas lâminas gêmeas de cada tumor, com cinco criosecções de 20 µm por lâmina, e outras com criosecções de 10 µm . As lâminas com as criosecções foram congeladas a -20 °C.

2.2.9. Imunofluorescência

Descongelou-se uma das lâminas gêmeas de cada amostra (referidas na secção 3.4 Criosecção dos blocos de gelatina de tumores) à temperatura ambiente durante 30 min e desgelatinou-se em PBS em banho-maria a 37 °C (10-30 min). Fez-se duas lavagens em PBS de 5 min cada. Depois colocou-se em metanol com 3 % de peróxido de hidrogénio durante 30 min no escuro. Fez-se de novo duas lavagens em PBS de 5 min cada. Em seguida fez-se duas lavagens em PBS com Triton[®]X-100 a 0,1 % de 10 min cada. As lâminas foram então colocadas numa câmara húmida.

Adicionou-se a cada uma 200 µl de solução de bloqueio constituída por 2 % de albumina sérica de bovino e 5 % de soro de cabra em PBS com Tween[®] 20 a 0,1 % e deixou-se actuar durante 1 h à temperatura ambiente. De seguida colocou-se em cada lâmina 100 µl de anticorpo primário anti-PECAM-1 [*Rat monoclonal antibody to CD31* (MEC 7.46), Abcam, ab7388-50] (0,1 mg/ml), que se liga às células endoteliais (diluído 1:100 em solução de bloqueio), e o anticorpo primário anti- *alpha smooth muscle actin* (α -SMA), nomeadamente o *rabbit policlonal antibody to alpha smooth muscle actin* (Abcam, ab5694-100) (0,2 mg/ml) que marca células de suporte dos vasos, nomeadamente células de músculo liso e pericitos (dilução de 1:400 em solução de bloqueio), tendo-se incubado durante a noite a 4 °C na câmara húmida. No dia seguinte fizeram-se seis lavagens em PBS com

Tween a 0,1 % de 10 min cada. Depois colocou-se em cada lâmina 100 µl de anticorpo secundário *goat anti-rat* IgG Alexa Fluor® 488 (2 mg/ml) (Molecular Probes, A-11006) a 1:300 em solução de bloqueio (para o anti-PECAM-1) e o anticorpo *goat anti-rabbit* IgG Alexa Fluor® 594 (Molecular Probes, A-11058) (2 mg/ml) (1:300 em solução de bloqueio) para o anti-SMA. e incubou-se durante 1 h à temperatura ambiente no escuro. Em seguida fizeram-se quatro lavagens em PBS com Tween a 0,1 % de 10 min cada. Depois colocou-se em PBS com DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride hydrate*, marcador dos núcleos celulares uma vez que se intercala no DNA emitindo fluorescência azul quando exposto a radiação ultravioleta) (Sigma-Aldrich, D8417) a 0,15 % durante 3 min. Procedeu-se então a duas lavagens em PBS de 10 min. Colocou-se 90 µl de Mowiol® 4-88 (Calbiochem, 475904), como meio de montagem, e uma lamela em cada lâmina e guardaram-se as lâminas a 4 °C no escuro.

No processo de incubação com o anticorpo secundário, as lâminas de tumores para estudo da perfusão vascular diferiram das restantes na medida em que foram usados *streptavidin* Alexa Fluor® 488 *conjugate* (Invitrogen, S-32354) (2 mg/ml) (que se liga à biotina e assim à lectina, emitindo fluorescência verde) e *goat anti-rat* IgG Alexa Fluor® 555 (Molecular Probes, A-21115) (2 mg/ml) (que se liga ao anticorpo primário e emite fluorescência vermelha), ambos numa diluição de 1:300 em solução de bloqueio. A incubação, neste caso, foi de 2 h à temperatura ambiente.

2.2.10. Microscopia de fluorescência

As imagens de fluorescência em criosecções foram captadas por uma câmara digital Leica DM340FX acoplada a um microscópio de fluorescência Leica DMR numa ampliação de 100 x e foram processadas no programa Adobe Photoshop 9.0 CS. Para analisar estas imagens recorreu-se ao programa Image J 1.37v (NIH, EUA). A densidade vascular corresponde à área de cada amostra com sinal positivo para PECAM-1 (área de pixéis brancos por campo após transformar as imagens RGB em documentos binários). Para medir a maturidade vascular quantificou-se a percentagem de estruturas das secções de cada amostra com sinal positivo para PECAM-1 e para α -SMA. A perfusão vascular foi quantificada determinando a percentagem de estruturas das secções de cada amostra com sinal positivo para PECAM-1 e para streptavidina ligada à lectina biotinilada.

2.2.11. Extração de RNA utilizando o mini kit RNeasy®

O RNA total (de adenocarcinomas mamários) foi extraído e purificado recorrendo ao *kit* RNeasy® Mini seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

Para se quantificar o RNA extraído utilizou-se um espectrofotómetro Nanodrop (NanoDrop 7200, Thermo Scientific, EUA). Neste aparelho usa-se apenas 1 µl de amostra para obter a quantificação e qualificação do RNA, através da medição do rácio de absorção a 260 nm e 280 nm, que deve ser superior a 1,8 em amostras de RNA puro, que foi o caso de todas as amostras testadas.

2.2.12. Transcrição reversa utilizando o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR

Com o RNA total extraído anteriormente, foi feita a transcrição reversa para obtenção do cDNA seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

2.2.13. PCR em tempo real

As reacções de PCR em tempo real semi-quantitativo foram realizadas com o *kit* Power SYBR Green PCR Master Mix®, segundo as instruções do fabricante. O *SYBR Green* é um agente intercalador, fluorescente quando ligado à dupla cadeia de DNA (Morrison et al., 1998). A reacção de amplificação de DNA é acompanhada, medindo a fluorescência ao fim do passo de extensão. Para cada amostra obtém-se um valor de C_T (*cycle threshold*) inversamente proporcional à quantidade de DNA deste gene, presente na amostra. Usou-se o termociclador em tempo real, *Applied Biosystems 7300* e o programa *7300 System SDS Software*, (Applied Biosystems, EUA). As condições de reacção foram 40 ciclos de 15 s de desnaturação a 95 °C e 1 min de emparelhamento e extensão a 60 °C, precedidos de um passo de desnaturação e activação da polimerase de DNA, *AmpliTaq*. No fim do protocolo seguiu-se um passo de desnaturação sucessiva a temperaturas crescentes, até que, no ponto em que as cadeias se separam, verifica-se uma diminuição brusca da fluorescência. A temperatura a que isto acontece denomina-se temperatura de dissociação (T_m) e está relacionada com o comprimento da molécula de DNA, pelo que moléculas iguais têm T_m iguais. O objectivo da realização desta curva foi verificar se em cada reacção foi amplificado apenas um fragmento e se este foi igual em todas as reacções de amplificação de um determinado gene. Para todas as reacções usou-se o gene *β -Actina* (Suchting et al., 2007) como controlo interno de expressão e avaliou-se a presença de mais do que um produto de amplificação em solução, indicando inespecificidade da reacção. Os resultados apresentados representam reacções em que se formou apenas um produto de amplificação. Os genes testados foram *Dll4*, *EfrinaB2*, *VEGFR1*, *2 e 3*, *VEGFA e C*, *PECAM-1*, *Tie2* e *Hey2* e foram feitos triplicados de cada um destes.

2.2.14. Análise estatística

A análise estatística foi processada nos programas Microsoft Office EXCEL 2007 e SPSS v. 17.0 (*Package for the Social Sciences, version 17.0*). Neste último programa utilizou-se o teste Mann-Whitney-Wilcoxon para calcular a média \pm erro padrão e o nível de significância (p). Considerou-se $p < 0,05$ significativo (indicado nos gráficos com *) e $p < 0,001$ muito significativo (indicado nos gráficos com **).

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação da influência de Dll4 no desenvolvimento de adenocarcinomas mamários e metástases pulmonares em ratinhos *Her2/neu*

Estudos anteriores demonstraram que a terapia anti-Dll4 inibe o desenvolvimento de tumores xenotransplantados, apesar de causar um aumento da sua densidade vascular (Sainson and Harris, 2007). Este efeito paradoxal ocorre porque a maturação dos vasos neoformados é defeituosa, tornando-se os tumores progressivamente mais hipóxicos. Uma vez que Dll4 é um gene haploinsuficiente sendo a sua função sensível e dependente da dose, é fundamental confirmar o papel de Dll4 no desenvolvimento de tumores autóctones, tendo para isso os ratinhos heterozigóticos com perda parcial de função de Dll4 que poderão elucidar sobre o seu efeito no desenvolvimento tumoral, neste caso, de adenocarcinomas mamários e formação de metástases.

Neste estudo avaliou-se assim o desenvolvimento dos adenocarcinomas mamários e metástases pulmonares em ratinhos *Her2/neu* positivos com perda de função parcial de Dll4, *Her2/neu Dll4^{+/-}* e ratinhos *Her2/neu Dll4^{+/+}* (grupo controlo).

Os animais *Her2/neu Dll4^{+/-}* apresentaram uma redução de 73,1% no número médio de tumores por animal, e uma redução de 55% na carga tumoral por animal, quando comparados com os animais controlo *Her2/neu Dll4^{+/+}* (Figura nº 8).

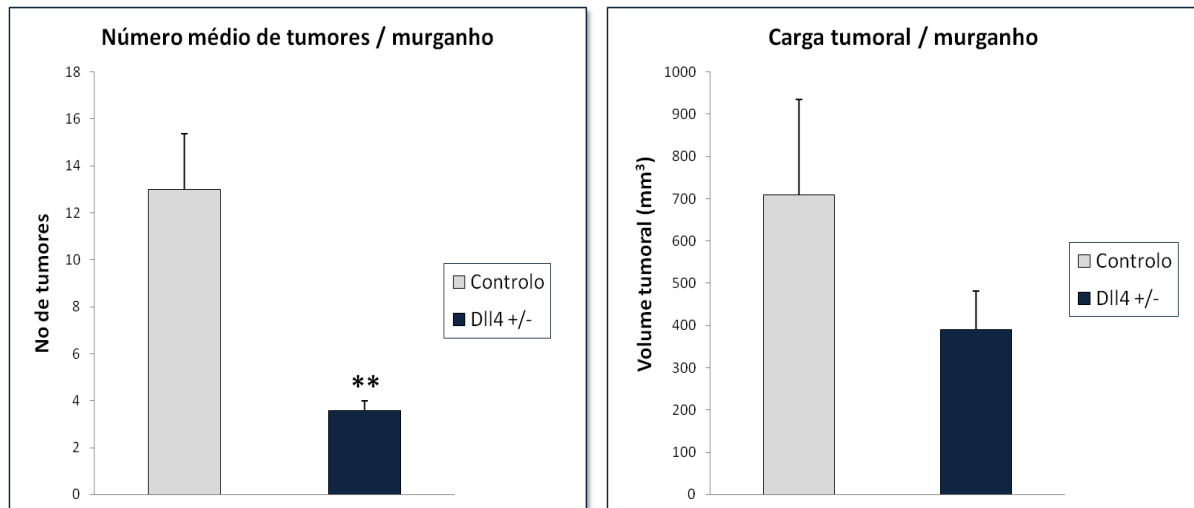


Figura nº 3.8 – Média do número de tumores (A) e carga tumoral (B) por animal \pm erro padrão. Controlo: ratinhos *Her2/neu Dll4^{+/+}*. *Dll4^{+/-}*: ratinhos *Her2/neu Dll4^{+/-}*. **: estatisticamente muito significativo.

Na análise por imunofluorescência anti-PECAM-1 e anti- α SMA, os animais *Her2/neu Dll4^{+/-}* apresentaram um aumento de 48,8% da densidade vascular tumoral relativamente ao controlo (*Her2/neu Dll4^{+/+}*). Relativamente ao número de células de suporte a envolver os vasos nos tumores, verificou-se uma redução de cerca de 33 % (Figura nº 9).

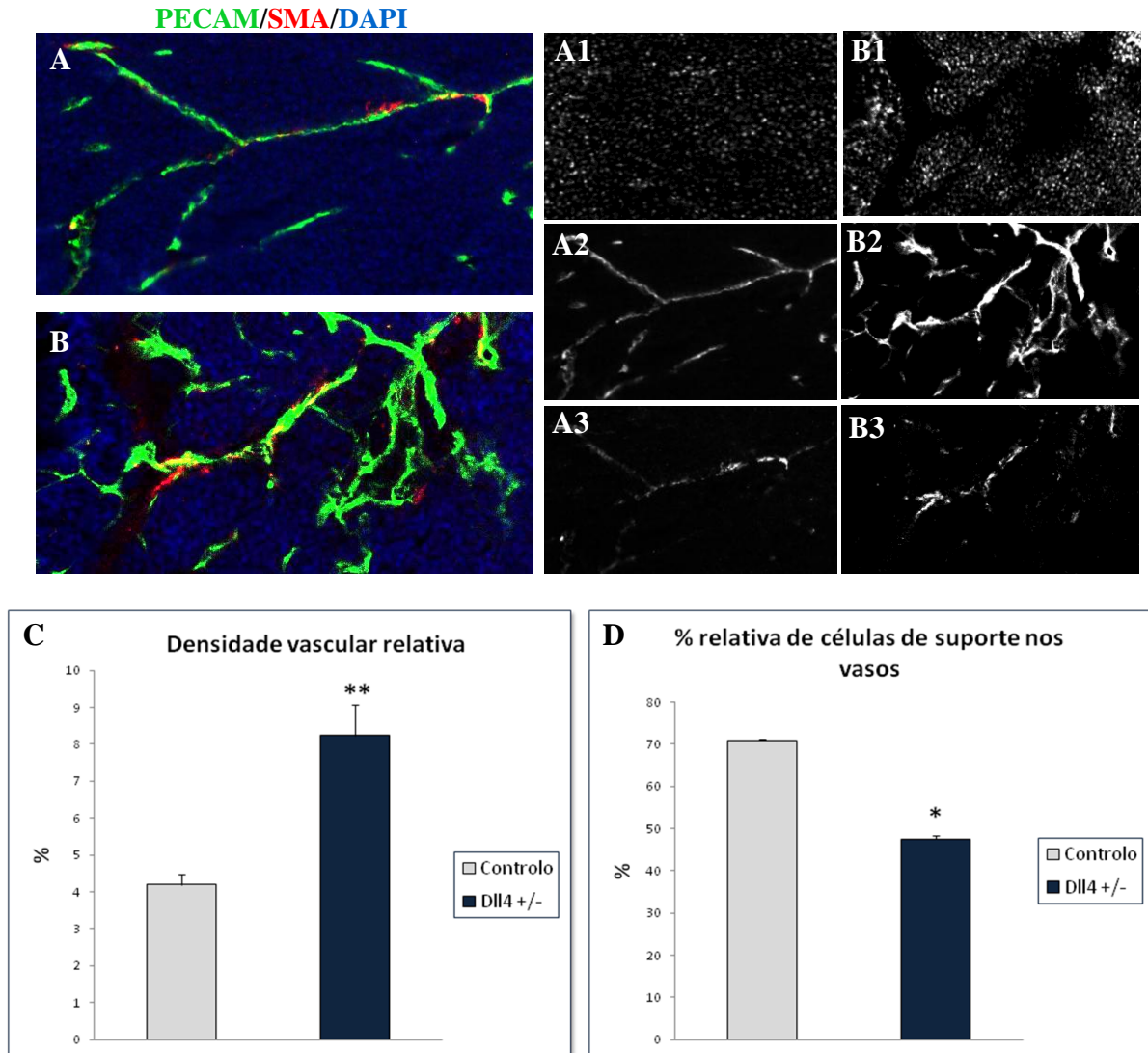


Figura nº 3.9 - Imagens de imunofluorescência relativas à densidade vascular e ao recrutamento de células de suporte a nível vascular nos adenocarcinomas mamários de ratinhos *Her2/neu*. PECAM/SMA/DAPI - A: Imagem RGB representativa da densidade vascular dos tumores de *Her2/neu Dll4^{+/+}*, onde os vasos estão representados a verde, células de suporte a envolverem os vasos a vermelho e núcleos celulares a azul. B: Imagem RGB representativa da densidade vascular dos ratinhos *Her2/neu Dll4^{+/-}*. A1, A2 e A3 correspondem aos canais que mostram os núcleos celulares dos controlos, os vasos dos tumores e as células de suporte, respectivamente. B1, B2 e B3 correspondem aos mesmos canais descritos acima de animais *Her2/neu Dll4^{+/-}*. C e D: Gráficos relativos aos resultados da análise por imunofluorescência da densidade vascular e do recrutamento de células de suporte a nível vascular dos tumores dos animais *Her2/neu Dll4^{+/-}* relativamente à dos controlos \pm erro padrão. *:estatisticamente significativo; **: estatisticamente muito significativo.

Relativamente à perfusão dos vasos neoformados nos tumores, verificou-se que os ratinhos *Her2/neu Dll4^{+/-}* apresentavam uma menor perfusão, 44,7%, comparativamente com os controlos *Her2/neu Dll4^{+/+}* (Figura nº 10).

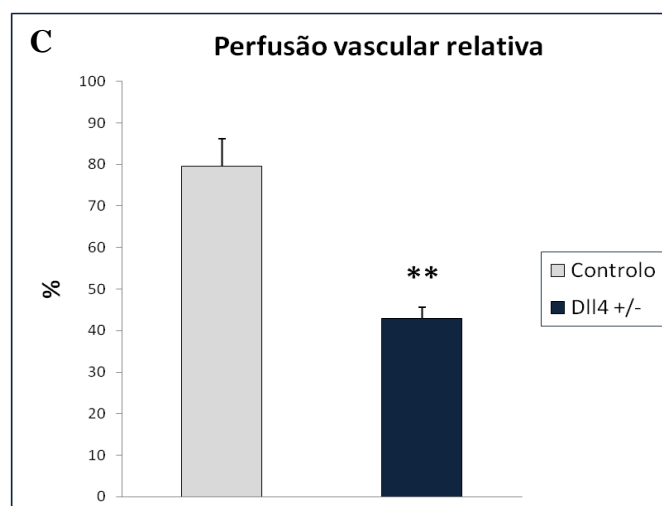
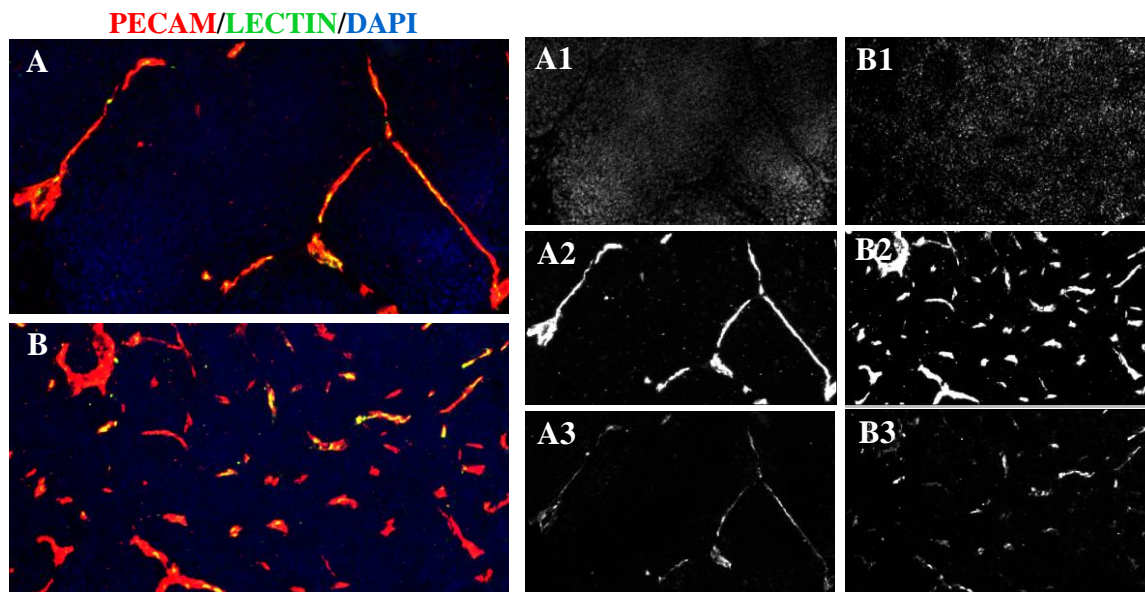


Figura nº 3.10 – Imagens de imunofluorescência relativas à perfusão vascular dos adenocarcinomas mamários de ratinhos Her2. PECAM/LECTIN/DAPI - A: Imagem RGB representativa da perfusão vascular dos tumores dos controlos, onde os vasos (representados a vermelho) com fluorescência verde (streptavidina ligada à lectina biotinilada) sobreposta têm perfusão normal. Núcleos celulares a azul. B: Imagem RGB representativa da perfusão vascular dos tumores dos ratinhos Her2/*neu Dll4*^{+/-}. A1, A2 e A3 correspondem, respectivamente, ao canal que marca os núcleos celulares dos animais controlo, ao canal que marca os vasos, e ao canal que marca os vasos perfundidos. B.1, B.2 e B.3 correspondem aos mesmos canais descritos acima mas dos animais Her2/*neu Dll4*^{+/-}. C: Gráficos relativos aos resultados da análise por imunofluorescência da perfusão vascular dos tumores dos animais Her2/*neu Dll4*^{+/-} relativamente à dos controlos ± erro padrão.**: estatisticamente muito significativo.

No que diz respeito à análise das metástases pulmonares, verificou-se que os ratinhos Her2/*neu Dll4*^{+/-} apresentavam uma redução de 46,8% no número de metástases pulmonares (Figura nº11).

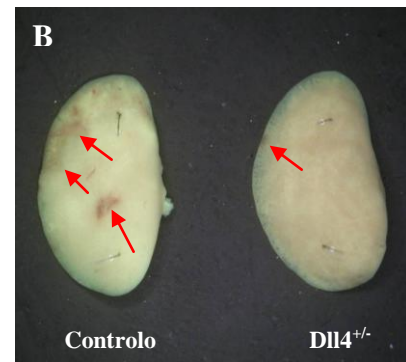
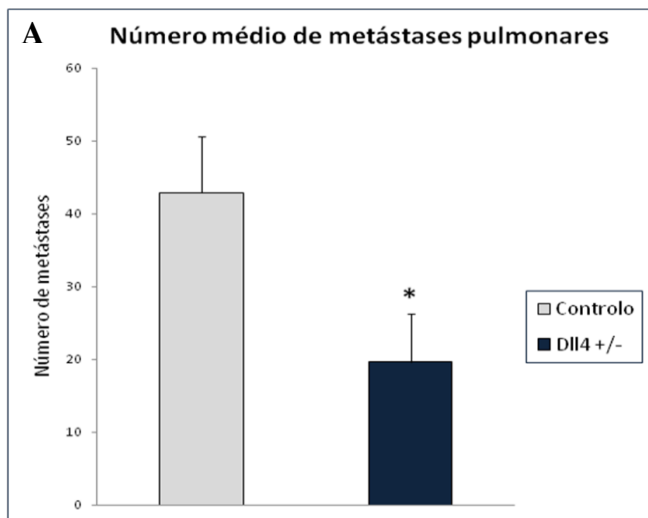


Figura nº 3.11 – Imagens relativas às metástases pulmonares observadas nos ratinhos *Her2/neu Dll4^{+/+}* e *Her2/neu Dll4^{+/-}*. Controlo: ratinhos *Her2/neu Dll4^{+/+}*; *Dll4^{+/-}*: ratinhos *Her2/neu Dll4^{+/-}*. A: Gráfico relativo ao número médio de metástases pulmonares observadas nos ratinhos controlo e ratinhos *Dll4^{+/-}* ± erro padrão. B: Imagens macroscópicas das metástases pulmonares observadas (seta encarnada) nos ratinhos referidos anteriormente.*: estatisticamente significativo.

3.2. Análise do envolvimento da via de sinalização Dll4/Notch na regulação da angiogénese

Através da análise por PCR em tempo real de amostras dos tumores mamários, constatou-se que os animais *Dll4*^{+/-} apresentavam em média uma expressão de *Dll4* de 0,58 relativamente ao normal, isto é, uma expressão 42% inferior à dos animais *Dll4*^{+/+}. Uma vez que Dll4 é um importante regulador de diversas vias de sinalização, avaliou-se a expressão de determinados genes cuja expressão é regulada por Dll4 e comparou-se os resultados com os níveis desses mesmos genes nos animais *Dll4*^{+/-}. Assim, ao diminuir o nível de expressão de *Dll4* ocorreu um aumento do nível de expressão dos receptores *VEGFR2* e *VEGFR3* e uma diminuição de *VEGFR1*.

A expressão de *VEGFC* encontrava-se aumentada nos animais *Dll4*^{+/-}, enquanto a de *VEGFA* variou no mesmo sentido que a expressão de *Dll4*. Por outro lado, verificou-se que os níveis de expressão de *EfrinaB2* e de *Tie2* diminuíram. *Hey2*, um importante gene efector da via de sinalização Notch, apresentou níveis de expressão inferiores nos animais *Dll4*^{+/-}. Quanto a *PECAM-1*, a sua expressão não sofreu variações significativas nos animais testados.

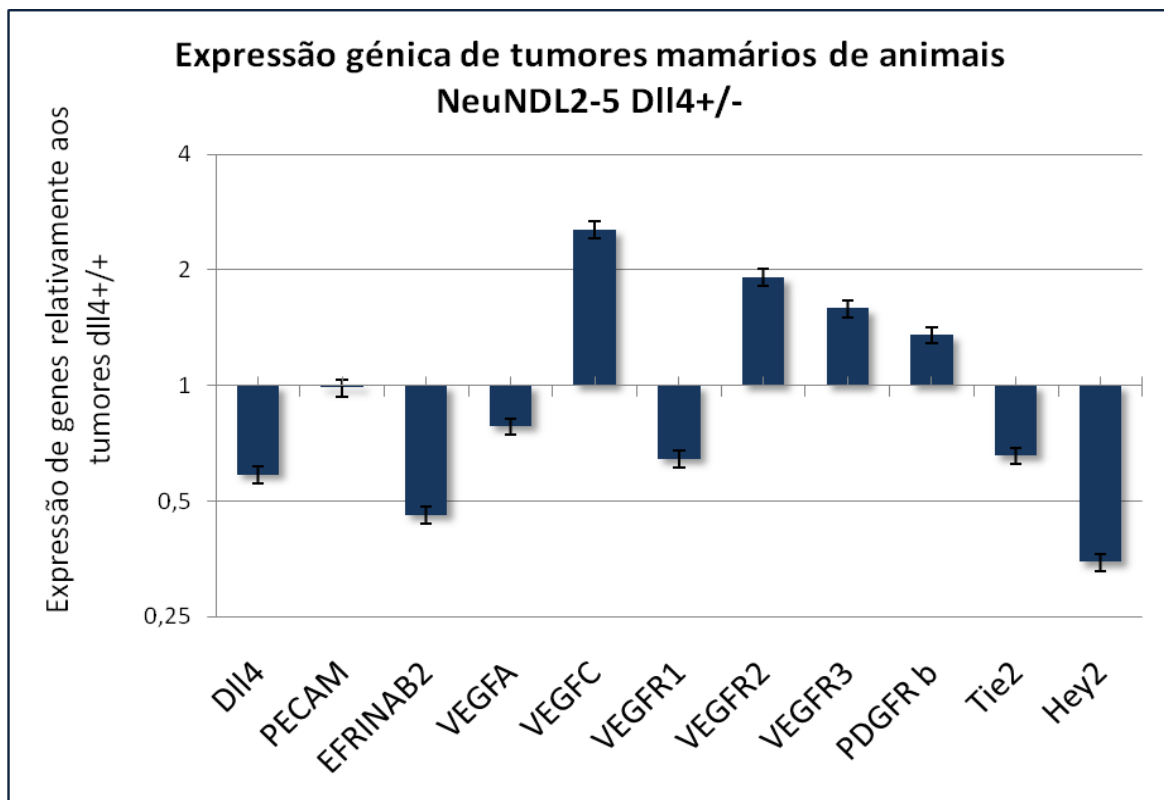


Figura nº 3.12 - Expressão relativa de determinados genes em animais *Her2/neu Dll4*^{+/-} por PCR em tempo real ± erro padrão.

3.3. Análise do efeito terapêutico de sEphB4 no desenvolvimento de adenocarcinomas mamários e metástases pulmonares

Apesar dos estudos terapêuticos com bloqueio da via EfrinaB2/EphB4 já realizados em tumores xenotransplantados e num modelo autóctone, persiste a necessidade de realização dos mesmos em modelos consistentes, que reflectam melhor a interacção hospedeiro/tumor e onde as lesões apareçam e se desenvolvam de forma mais natural. Assim, decidimos realizar ensaios terapêuticos com a proteína sEphB4, seleccionada por múltiplos factores. Um dos motivos foi o facto da proteína influenciar a sinalização Dll4/Notch alterando os níveis de expressão de *Dll4* (Scehnet et al., 2009) e simultaneamente a sua própria expressão ser regulada pela sinalização Dll4/Notch (Duarte et al., 2004; Trindade et al., 2008). Por outro lado, sabe-se que o bloqueio da via EfrinaB2/EphB4 inibe também o desenvolvimento de tumores xenotransplantados (Scehnet et al., 2009), mas actua através de mecanismos diferentes e, em certos aspectos, opostos à terapia anti-Dll4, nomeadamente através da supressão da migração, adesão e proliferação das células endoteliais (Kertesz et al., 2006; Scehnet et al., 2009). Por último, como a terapia com sEphB4 foi só testada em tumores xenotransplantados e apenas num modelo tumoral autóctone (Djokovic, 2010), o seu estudo noutros modelos tumorais autóctones continua relevante. Deste modo, decidiu-se realizar ensaios terapêuticos com o bloqueio da interacção EfrinaB2/EphB4 através da administração de sEphB4 em ratinhos *Her2/neu*, em que o desenvolvimento tumoral mais lento assemelha-se ao verificado em humanos (Siegel et al., 1999).

O ensaio terapêutico com sEphB4, com a duração de 5 semanas, provocou uma redução muito significativa tanto na carga tumoral como no número e volume médio dos tumores mamários em relação ao grupo controlo aos quais foi administrado apenas PBS.

Assim, relativamente aos controlos, os animais tratados com a proteína sEphB4 apresentaram uma diminuição de 87,5% do número médio de tumores por animal, uma redução de cerca de 80% do volume médio tumoral por animal e uma diminuição de 97,7% da carga média tumoral por animal (Figura nº 13).

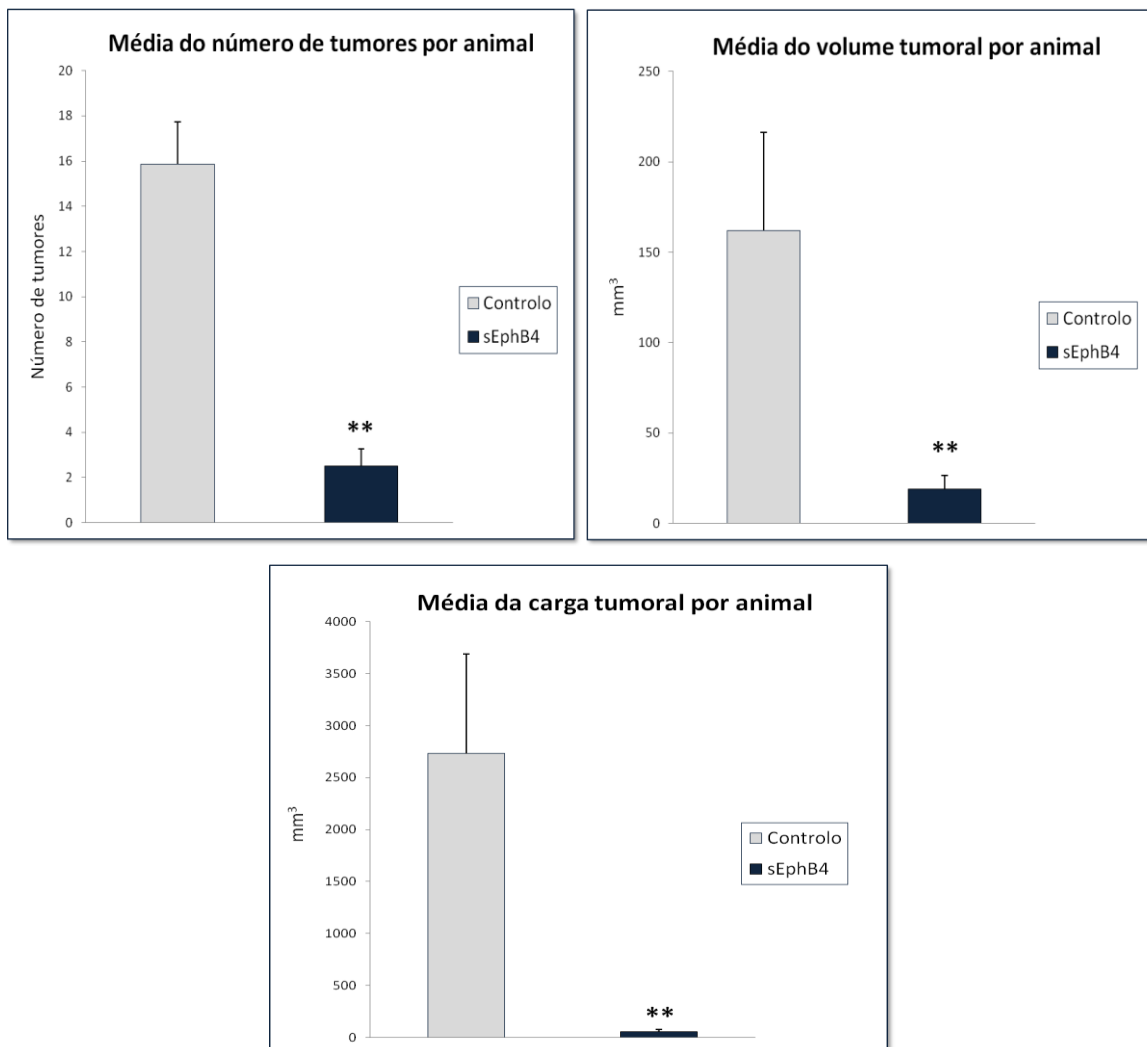


Figura nº 3.13 - Média do número (A), volume (B) e carga tumoral (C) por animal \pm erro padrão. Controlo: ratinhos *Her2/neu* aos quais foi administrado PBS. sEphB4: ratinhos *Her2/neu* aos quais foi administrada a proteína sEphB4. *: estatisticamente significativo **: estatisticamente muito significativo.

Na análise por imunofluorescência anti-PECAM-1 e anti- α SMA, o grupo tratado com sEphB4 apresentou uma diminuição de 44,8% da densidade vascular tumoral, assim como uma redução de cerca de 20% do número de células de suporte a envolver os vasos nos tumores relativamente ao grupo controlo (Figuras nº 14 e 15).

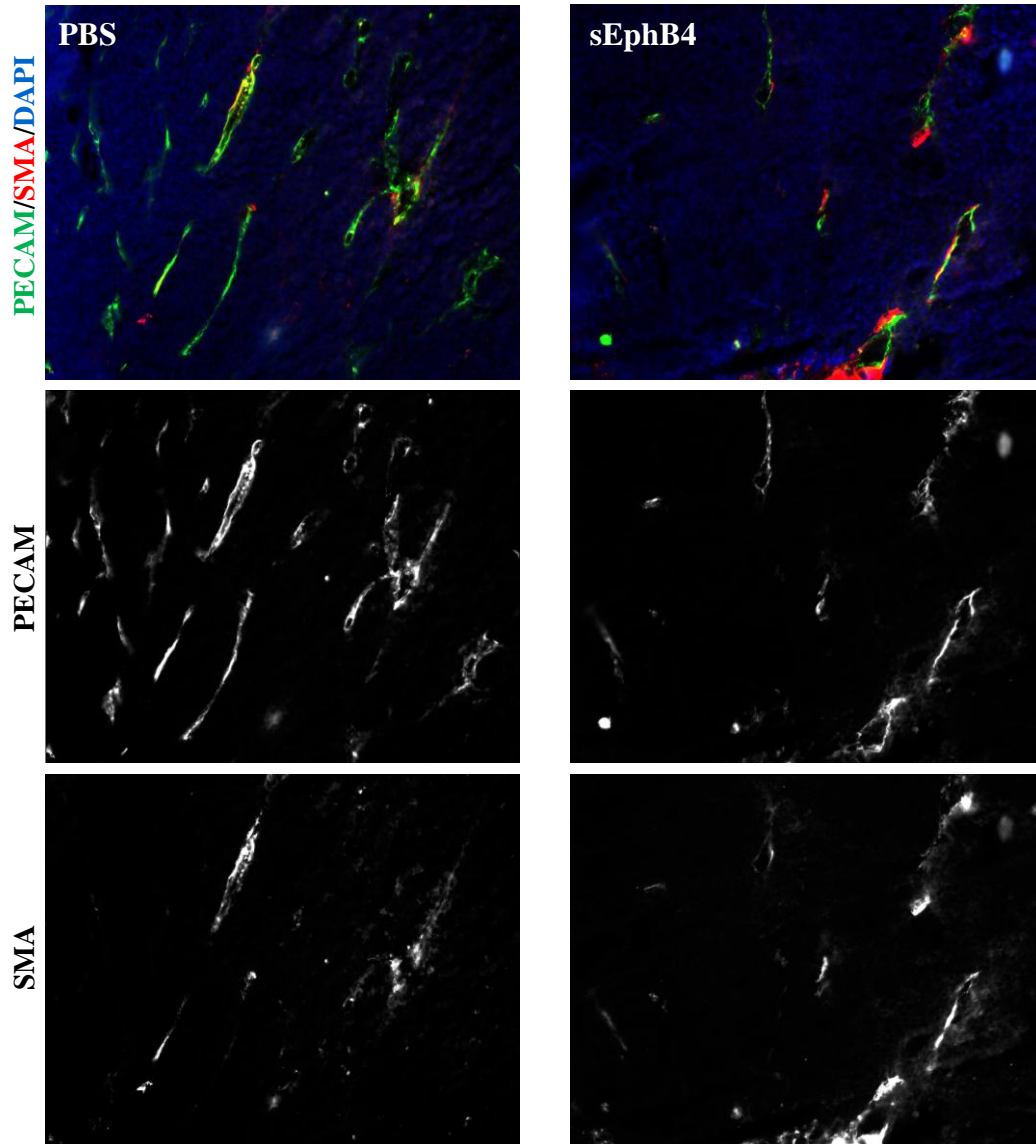


Figura nº 3.14 – Imagens de imunofluorescência relativas à densidade vascular e ao recrutamento de células de suporte a nível vascular nos adenocarcinomas de ratinhos *Her2/neu*.
 PECAM/SMA/DAPI: imagens RGB com núcleos a azul (DAPI), vasos sanguíneos a verde (PECAM-1) e células de suporte a envolverem os vasos a vermelho (α -SMA sobreposto a PECAM-1). SMA: imagens do canal de α -SMA com vasos que contêm células de suporte a branco. PBS: ratinhos *Her2/neu* aos quais foi administrado PBS. sEphB4: ratinhos *Her2/neu* aos quais foi administrada a proteína sEphB4.

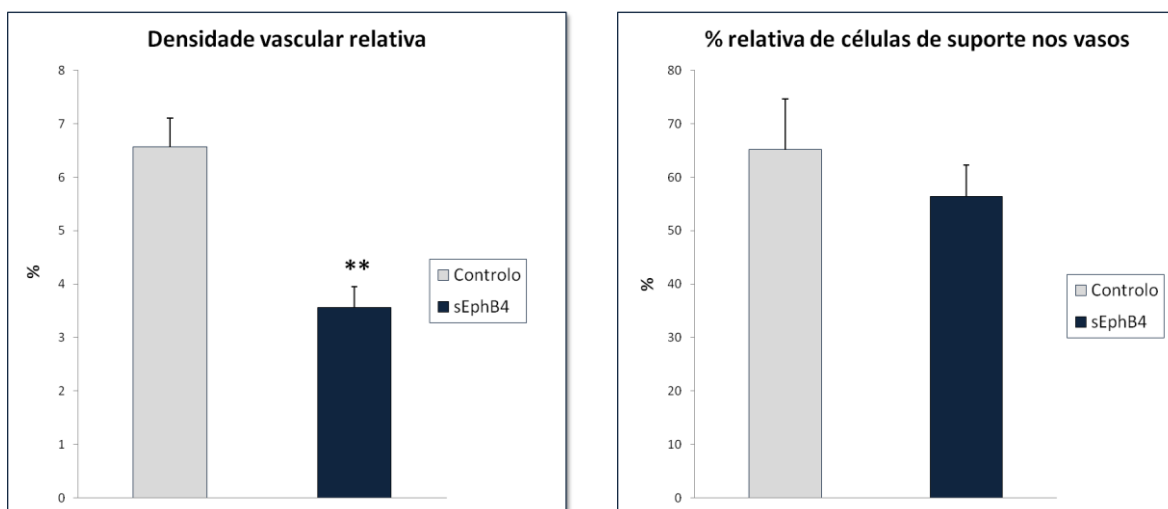


Figura nº 3.15 – Gráficos relativos aos resultados da análise por imunofluorescência da densidade vascular e do recrutamento de células de suporte a nível vascular \pm erro padrão. Controlo: ratinhos *Her2/neu* aos quais foi administrado PBS. sEphB4: ratinhos *Her2/neu* aos quais foi administrada a proteína sEphB4. **: estatisticamente muito significativo.

Relativamente ao grupo controlo, a perfusão vascular tumoral encontrava-se diminuída no grupo tratado com sEphB4 ocorrendo uma redução de 81% (Figuras nºs 16 e 17).

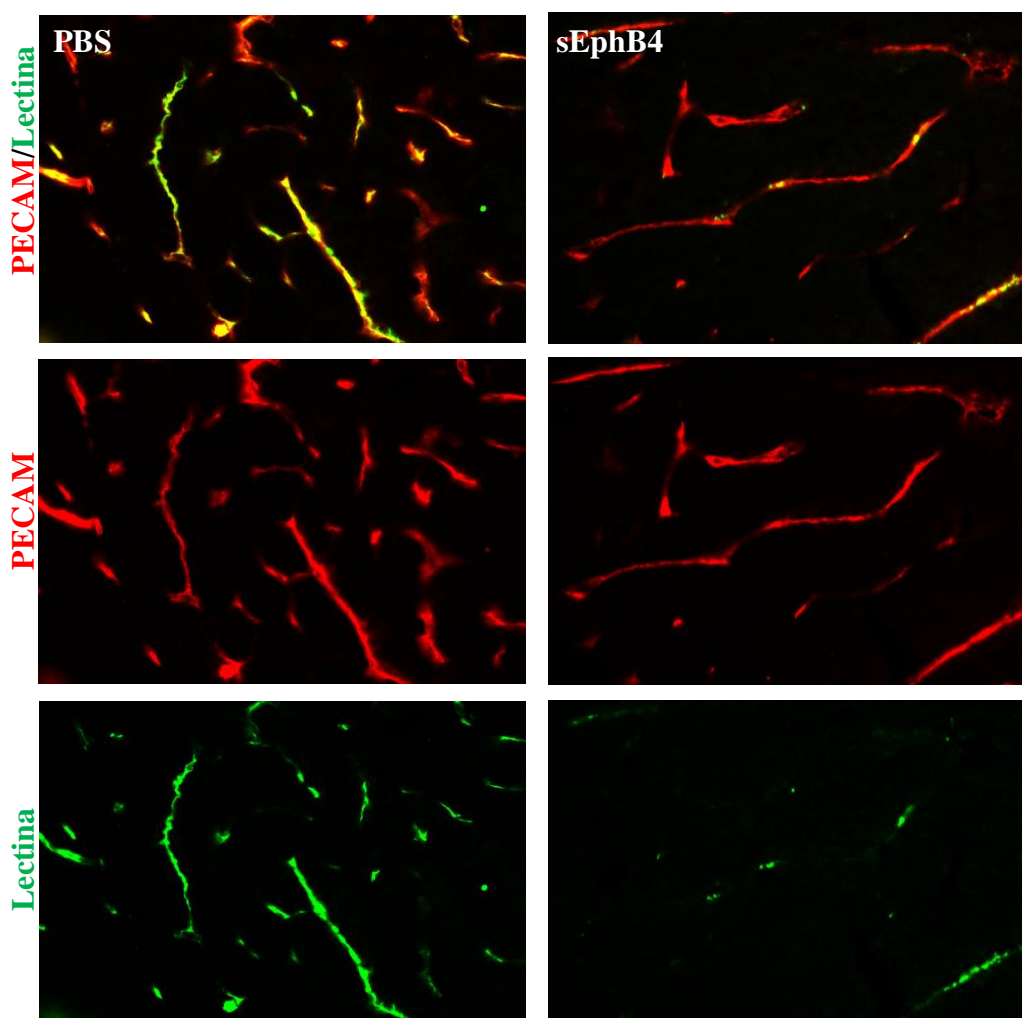


Figura nº 3.16 – Imagens de imunofluorescência relativas à perfusão vascular nos tumores mamários de ratinhos *Her2/neu* PECAM: imagens do canal de PECAM-1 com os vasos sanguíneos a vermelho. Lectina: imagens do canal de lectina com vasos perfundidos a verde. PECAM+Lectina: imagens dos canais de lectina e PECAM-1 sobrepostos com os vasos a vermelho e vasos perfundidos a vermelho e verde simultaneamente (positivos para PECAM-1 e para lectina). PBS: ratinhos *Her2/neu* aos quais foi administrado PBS. sEphB4: ratinhos *Her2/neu* aos quais foi administrada a proteína sEphB4.

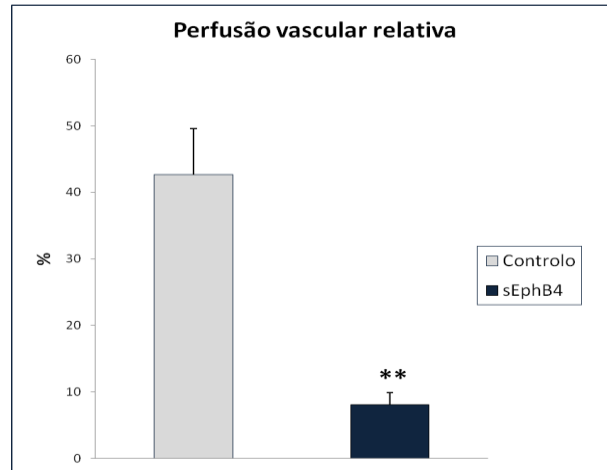


Figura nº 3.17 - Gráfico relativo aos resultados da análise por imunofluorescência da perfusão vascular \pm erro padrão. Controlo: ratinhos *Her2/neu* aos quais foi administrado PBS. sEphB4: ratinhos *Her2/neu* aos quais foi administrada a proteína sEphB4. *: estatisticamente significativo. **: estatisticamente muito significativo.

No que diz respeito à análise das metástases pulmonares, verificou-se que os ratinhos *Her2/neu* tratados com sEphB4 apresentavam uma redução de 87,27% no número médio de metástases pulmonares observadas.

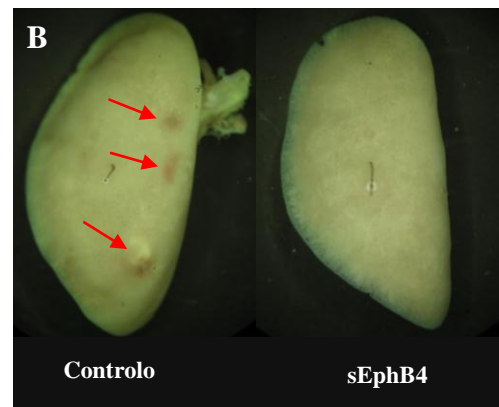
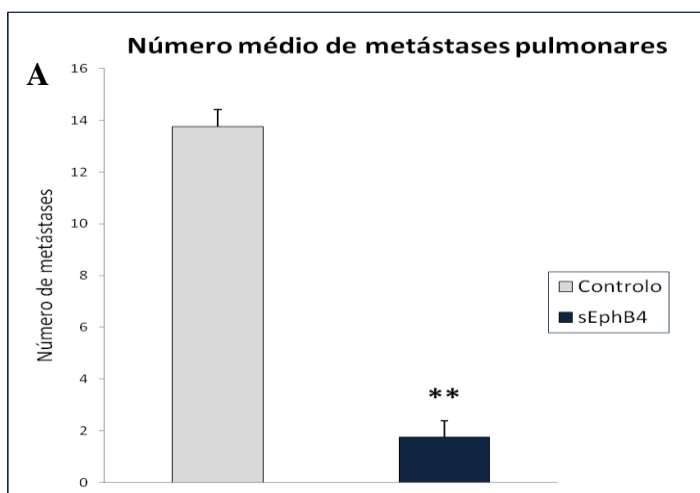


Figura nº 3.18 – Imagens relativas às metástases pulmonares observadas nos ratinhos *Her2/neu* tratados com sEphB4 e ratinhos tratados com PBS. Controlo: ratinhos *Her2/neu* aos quais foi administrado PBS; sEphB4: ratinhos *Her2/neu* aos quais foi administrada a proteína sEphB4. A: Gráfico relativo ao número médio de metástases pulmonares observadas nos ratinhos Controlo e ratinhos tratados com sEphB4 \pm erro padrão. B: Imagens macroscópicas das metástases pulmonares observadas (seta encarnada) nos ratinhos referidos anteriormente. *: estatisticamente significativo.

4. DISCUSSÃO

A importância de Dll4 foi inicialmente descrita relativamente à sua função reguladora da identidade endotelial e da morfogénese vascular no desenvolvimento embrionário (Benedito & Duarte, 2005; Duarte et al, 2004; Mailhos et al, 2001; Trindade *et al.*, 2008). No entanto, estudos recentes demonstraram que Dll4 está também presente no processo de neoangiogénese, tanto fisiológica como patológica (Patel et al, 2006). Dll4 actua como factor anti-angiogénico através de vários mecanismos dos quais se destaca a regulação negativa da sinalização pelo principal factor de crescimento envolvido na vascularização e angiogénese, o VEGF. Deste modo, promove o equilíbrio entre a proliferação vascular e a maturação/quiescência dos vasos (Benedito et al, 2008). A descoberta da sua importante função a nível vascular e o facto da sua expressão estar fortemente aumentada nos tumores conduziu à investigação do seu potencial como alvo terapêutico através da realização, entre outras experiências, de xenotransplantes tumorais em mutantes com perda-de-função de *Dll4*.

Os resultados obtidos indicaram que o bloqueio de Dll4 promove uma redução do desenvolvimento tumoral devido ao aumento do nível hipóxico no tumor. No entanto, simultaneamente ocorre um aumento da densidade vascular no mesmo. Este paradoxo ocorre devido aos vasos terem fraca funcionalidade, sendo irregulares, anormais, excessivamente ramificados, imaturos, com fraca perfusão e excessiva permeabilidade. Deste modo, torna-se fulcral o estudo terapêutico da perda de função Dll4, uma vez que as terapias angiogénicas estão cada vez a ganhar mais importância, aumentando a necessidade de surgirem novos alvos terapêuticos para compensar o surgimento de resistência às terapias já aprovadas. Recentemente, desenvolveram-se anticorpos que neutralizam Dll4 (Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006) e proteínas de fusão contendo o domínio extracelular de Dll4, que se liga aos receptores Notch impedindo a ligação a Dll4 endógeno (Noguera-Troise et al., 2006; Schnet et al., 2007). Realizaram-se estudos com estas formas terapêuticas em ratinhos com tumores xenotransplantados e os resultados foram favoráveis, inclusive em tumores resistentes à terapia anti-VEGF. Apesar da notoriedade desta informação, ensaios clínicos com factores anti-angiogénicos, como inibidores de metaloproteases da matriz extracelular (MMP), demonstraram que os modelos tumorais xenotransplantados ectopicamente podem produzir resultados erróneos relativamente ao efeito real do fármaco na doença no homem (Coussens et al., 2002; Cristofanilli et al., 2002). Por esta razão, neste trabalho pretendeu-se avaliar o potencial terapêutico do bloqueio de *Dll4* num modelo tumoral autóctone, concretamente nos ratinhos *Her2/neu* (NeuNDL2-5). Estes animais desenvolvem adenocarcinomas mamários e metástases pulmonares com perfil de microambiente e estroma, assim como progressão de forma semelhante ao que acontece na condição humana (Siegel et al., 1999).

Através da análise macroscópica e por imunofluorescência, verificou-se que no modelo tumoral *Her2/neu* utilizado neste estudo, os resultados decorrentes do bloqueio de *Dll4* eram semelhantes aos

do bloqueio deste ligando nos tumores xenotransplantados. Os animais com a expressão de Dll4 limitada apenas a um alelo apresentaram uma redução significativa do número médio de tumores por animal assim como da carga média tumoral por animal às 25 semanas de vida. Constatou-se que a perda de Dll4 inibe o desenvolvimento tumoral principalmente reduzindo o volume tumoral por animal. Para se compreender o mecanismo de inibição do crescimento dos tumores procedeu-se à análise de secções de amostras dos tumores mamários por imunofluorescência. Assim, comparando com os controlos, a densidade vascular tumoral nestes animais encontrava-se aumentada e a percentagem de células de suporte a envolver os vasos nos tumores, um indicador da maturidade vascular, havia sofrido uma redução. Relativamente à perfusão vascular tumoral, um indicador da funcionalidade vascular encontrava-se reduzida nos animais *Her2/neu Dll4^{+/-}*. A vasculatura tumoral encontrava-se desorganizada e anormal, com vasos finos, permeáveis, muito ramificados, com deficiência em células de suporte que são necessárias para tornar os vasos estáveis. Todas estas características têm como consequência um deficiente fornecimento de sangue ao tumor, o qual é essencial para o seu desenvolvimento. Assim o tumor torna-se cada vez mais hipóxico, o que por sua vez estimula a produção de VEGF e outros factores pró-angiogénicos promovendo progressivamente uma maior proliferação vascular imatura e pouco funcional.

No que diz respeito à observação de metástases pulmonares, os animais *Dll4^{+/-}* evidenciaram uma clara redução das mesmas demonstrando que a perda parcial de *Dll4* também induz uma redução do potencial metastático destes tumores levando a uma consequente redução na metastização geralmente observada neste modelo animal.

Adicionalmente, neste trabalho avaliou-se a inibição da via EfrinaB2/EphB4 que tem um papel importante na estimulação da maturação e estabilização vascular nos processos angiogénicos. Para tal, administrou-se proteína solúvel EphB4 aos ratinhos *Her2/neu*. Os resultados desta avaliação foram semelhantes aos anteriormente relatados em modelos tumorais xenotransplantados em ratinho (Scehnet et al., 2009). Assim, relativamente aos controlos, os animais tratados com a proteína sEphB4 apresentaram uma notável diminuição do número médio de tumores por animal e uma redução significativa do volume médio tumoral por animal e da carga média tumoral por animal. Constatou-se que, apesar de estar descrito que a inibição de Dll4/Notch provoca uma diminuição da expressão de *EfrinaB2*, a utilização de sEphB4 teve um efeito inibidor do desenvolvimento tumoral levando a uma redução de cerca de 8 vezes comparativamente aos ratinhos controlo *Dll4^{+/+}*. A densidade vascular tumoral nos animais tratados com sEphB4 apresentou-se diminuída, comparado com os controlos. No entanto, a percentagem de células de suporte a envolver os vasos nos tumores, embora mais reduzida, não apresentou diferenças significativas. No que diz respeito à perfusão vascular tumoral relativa, esta encontra-se diminuída, relativamente aos controlos. Através da análise por imunofluorescência, verificou-se que de facto a terapia anti-EphB4 é eficaz, levantando várias hipóteses sobre o seu modo de acção. Com os resultados obtidos, poder-se-ia concluir que tais resultados se devem ao efeito

negativo da proteína solúvel na maturidade e funcionalidade vasculares. Contudo, o aumento excessivo de permeabilidade vascular, ou mesmo a ausência de lúmen nos vasos, são também hipóteses a considerar.

O tratamento com sEphB4 também evidenciou a uma clara diminuição no número de metástases pulmonares encontradas, provavelmente pelo facto do bloqueio desta via diminuir a capacidade metastática das células tumorais destes adenocarcinomas.

Por outro lado, estudos anteriores demonstraram que o bloqueio da via EfrinaB2/EphB4 leva a um aumento da hipóxia e esta, por sua vez, a um aumento dos níveis de VEGF e Dll4 (Scehnet et al., 2009). Este aumento da expressão de VEGF e Dll4 pode despoletar no tumor o desenvolvimento de vasculatura bastante funcional que, se por um lado pode tornar a terapia ineficaz, por outro, uma terapia com anti-EphB4 com doses óptimas e por curtos períodos de tempo, poderá ser vantajosa para evitar que os tumores desenvolvam resistência aos fármacos aplicados (quimioterápicos ou inibidores de desenvolvimento tumoral, entre outros), tal como se verificou nos resultados deste trabalho.

Adicionalmente, não foram encontrados quaisquer efeitos secundários nos animais tratados com a proteína solúvel sEphB4.

Em conclusão, o efeito da perda parcial da função de Dll4, ou o bloqueio genético de Dll4, antagonista de Dll4/Notch, assim como de sEphB4, um antagonista da via EfrinaB2/EphB4, foram avaliados pela primeira vez num modelo tumoral autóctone. Em ambos os casos houve uma redução do desenvolvimento tumoral, e do número de metástases pulmonares, embora por mecanismos diferentes. A inibição de Dll4/Notch provoca um aumento da proliferação vascular no tumor, mas o facto de a vasculatura ser desorganizada, imatura e muito pouco funcional traduz-se numa redução da função vascular e assim na inibição do desenvolvimento tumoral. Por outro lado, a inibição de EfrinaB2/EphB4 parece provocar uma diminuição da proliferação vascular e os vasos neoformados são pouco funcionais. Assim, foi também possível verificar que o aumento da permeabilidade vascular tumoral, provocada pelo bloqueio das vias Dll4/Notch e EfrinaB2/EphB4, diminui a probabilidade de formação de metástases, uma vez que a funcionalidade vascular tumoral se encontra comprometida nos animais tratados. Os resultados obtidos neste trabalho no modelo tumoral *Her2/neu* são favoráveis e consistentes com os resultados obtidos em tumores xenotransplantados, pelo que a terapia tumoral com o bloqueio de Dll4 e com o uso da proteína solúvel sEphB4 parece ter um futuro promissor. No entanto ainda são necessários mais estudos, como ensaios para avaliar a regressão de adenocarcinomas mamários nos animais *Her2/neu*, ensaios terapêuticos associados a quimioterapia e outras formas terapêuticas, assim como noutros modelos tumorais autóctones, incluindo aqueles que progridem para um trabalho metastático. Adicionalmente, seria interessante investigar se o facto da vasculatura tumoral ter fraca perfusão nos animais *Dll4^{+/-}* e sEphB4 poderá afectar o efeito anti-tumoral dos quimioterápicos que são administrados por via intravenosa.

A partir de estudos em mutantes que demonstraram que a acção de *Dll4* depende do nível de expressão do mesmo, uma vez que *Dll4* é haploinsuficiente, pensou-se que a formação de neovasculatura não funcional em tumores tratados com antagonistas de Dll4 provavelmente é devida à elevada dose de bloqueio de Dll4. Assim, considerou-se que através da modulação da dose de Dll4 seria possível obter um espectro completo de efeito pró-angiogénico, variando desde a promoção da formação de uma vasculatura funcional até não funcional. A comprovar-se esta hipótese, seria possível utilizar terapia anti-Dll4 tanto no tratamento de tumores, em dose elevada, como no tratamento de condições onde a formação de neovasculatura é essencial e benéfica, como na isquémia e cicatrização de feridas, em dose baixa.

Através da análise por PCR em tempo real determinou-se a expressão de diversos genes em animais *Her2/neu Dll4^{+/-}* para avaliar as interacções já descritas de Dll4/Notch com outras vias de sinalização. Confirmou-se assim que em animais *Her2/neu Dll4^{+/-}*, a expressão de Dll4 era mais reduzida. Verificou-se que ao diminuir o nível de *Dll4*, havia um aumento do nível de expressão dos receptores *VEGFR2* e *VEGFR3* e uma diminuição do nível do receptor *VEGFR1*. A maior parte dos resultados obtidos em estudos anteriores indicam que *VEGFR2* é, de todos os receptores, o principal mediador da acção de VEGF sobre a proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais. A expressão de *VEGFR3* ocorre sobretudo nas células endoteliais dos vasos linfáticos. No entanto, a interacção entre Notch e *VEGFR3* já foi descrita, em estudos *in vitro* e *in vivo*, na vasculatura sanguínea tumoral e no desenvolvimento vascular da retina. Pensa-se que em situações de *stress*, onde ocorre activação vascular, a expressão de *VEGFR3* é induzida para que *VEGFC* possa sinalizar. Em modelos tumorais e em cultura de células verificou-se que a expressão de *VEGFR3* parece ser inibida pela activação da via Dll4/Notch, assim como a de *VEGFR2*. Os resultados obtidos neste trabalho parecem estar de acordo com esta hipótese.

Assim, uma vez que uma das principais funções de Dll4 consiste em regular negativamente a via VEGF, os níveis de expressão dos receptores *VEGFR2* e *3* variam de forma contrária aos níveis de *Dll4*. *VEGFC*, que é expresso em leucócitos, como macrófagos, e em células tumorais e se liga a *VEGFR3* promovendo a proliferação vascular entre outras acções, encontra-se em níveis aumentados nos ratinhos testados, sendo superior nos ratinhos *Dll4^{+/-}*. Este facto pode explicar, em parte, o aumento da densidade vascular encontrada nestes animais.

Relativamente a *VEGFR1*, apesar de ter expressão diminuída nos animais com perda parcial de função de *Dll4*, sabe-se que este receptor tem uma afinidade para se ligar a VEGF cerca de 10 vezes superior à do receptor *VEGFR2*, mas funciona como sequestrador de VEGF uma vez que a capacidade de sinalização é extremamente fraca.

O facto do ligando *VEGFA* se encontrar em níveis baixos nos animais com expressão reduzida de *Dll4* poderá ser devido à redução dos níveis de *VEGFR1* e ao grande aumento de *VEGFR2* serem suficientes para aumentar de forma significativa a resposta a VEGF por parte das células endoteliais,

promovendo a proliferação vascular e assim o aumento da densidade vascular. Assim, globalmente, estes resultados confirmam a existência de um ciclo regulatório entre a sinalização VEGF e a via Dll4/Notch, em que o bloqueio de Dll4/Notch promove uma redução da expressão de *VEGFR1* e o aumento de *VEGFR2* e *VEGFR3*, aumentando a resposta vascular a VEGFA, derivado dos tecidos circundantes, e a VEGFC, proveniente das células imunitárias presentes.

EfrinaB2, expresso no endotélio arterial e nas células de músculo liso, tem expressão diminuída nos animais *Dll4^{+/-}*, o que pode ser explicado pelo facto da via EfrinaB2/EphB4 actuar a jusante da via Notch na regulação do processo angiogénico. Estudos de perda-de-função de *EfrinaB2* demonstraram que as células de músculo liso com deficiência em EfrinaB2 não se agregavam aos vasos sanguíneos. Este resultado pode indicar que a deficiência em *EfrinaB2* nos animais com níveis baixos de *Dll4* seja uma das causas da imaturidade encontrada na neovascultura formada e explica uma das formas como a via Dll4/Notch regula o recrutamento e agregação de células do músculo liso aos vasos sanguíneos promovendo a maturação e quiescência vascular. Outra forma pode ser através da via Ang1/Tie2. O receptor *Tie2* tem especificidade endotelial e o seu ligando *Ang1* é expresso principalmente pelas células de suporte e perivasculares. Estudos de perda-de-função resultaram num fenótipo caracterizado por angiogénese defeituosa e um reduzido número de células de músculo liso e pericitos a envolver os vasos (Armulik et al., 2005).

Os resultados deste trabalho indicaram que os níveis de *Tie2*, como os de *EfrinaB2*, variam no mesmo sentido que os níveis de *Dll4*. *Hey2*, um dos genes efectores da via Notch pertencente à família Hes, também variou no mesmo sentido que os níveis de *Dll4*, como esperado. Os níveis de expressão de *PECAM-1*, uma molécula de adesão endotelial e de plaquetas, foram medidos apenas como controlo, uma vez que se sabe que a sua expressão não sofre alterações ao variar o nível de *Dll4*.

A função do ligando *Dll4* é intimamente dependente da dose do mesmo, uma vez que para responder a vários níveis de exposição a factores de crescimento, tem de responder numa ordem de magnitude semelhante. Para tal, os níveis de *Dll4* têm que aumentar até ao valor necessário para bloquear a sinalização dos factores pró-angiogénicos. Esta plasticidade do seu nível de expressão é essencial para a manutenção do equilíbrio instável entre factores pró-angiogénicos *versus* anti-angiogénicos, sendo este equilíbrio indispensável para uma correcta angiogénese. A partir do conhecimento destes factos tornou-se possível desenvolver uma forma terapêutica que tem como alvo específico a angiogénese do local onde queremos actuar, não afectando a restante vasculatura do organismo, que se encontra em estado quiescente nos adultos, excepto nas fêmeas devido ao ciclo éstrico. No entanto, esta forma terapêutica não parece provocar quaisquer alterações no ciclo éstrico das mesmas.

Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho indicam que a sinalização Notch endotelial via *Dll4* é essencial no desenvolvimento tumoral através da sua acção reguladora da angiogénese, em que

baixas doses promovem uma excessiva proliferação vascular evitando a estabilização e maturação dos vasos, formando uma neovasculatura desorganizada e pouco funcional.

Também o bloqueio da via EfrinaB2/EphB4 evidenciou a sua importância no desenvolvimento tumoral pela diminuição de proliferação vascular formando assim uma neovasculatura organizada mas pouco funcional.

Assim, com este trabalho foram evidenciadas duas vias fundamentais no desenvolvimento tumoral, estabelecendo potenciais alvos terapêuticos no tratamento contra o cancro.

5. BIBLIOGRAFIA

- Adams, R.H., Wilkinson, G.A., Weiss, C., Diella, F., Gale, N.W., Deutsch, U., Risau, W., and Klein, R., 1999. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev* 13, 295-306.
- Ambler, C.A., Nowicki, J.L., Burke, A.C., and Bautch, V.L., 2001. Assembly of trunk and limb blood vessels involves extensive migration and vasculogenesis of somite-derived angioblasts. *Dev Biol* 234, 352-64.
- Arbiser, J.L., 1996. Angiogenesis and the skin: a primer. *J Am Acad Dermatol* 34, 486-97.
- Armulik, A., Abramsson, A., and Betsholtz, C., 2005. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 97, 512-23.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M.E., 1995. Notch signaling. *Science* 268, 225-32.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J., 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-6.
- Azuma, H., 2000. Genetic and molecular pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Med Invest* 47, 81-90.
- Baluk, P., Hashizume, H., and McDonald, D.M., 2005. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 15, 102-11.
- Beatus, P., Lundkvist, J., Oberg, C., and Lendahl, U., 1999. The notch 3 intracellular domain represses notch 1-mediated activation through Hairy/Enhancer of split (HES) promoters. *Development* 126, 3925-35.
- Benedito, R., and Duarte, A., 2005. Expression of Dll4 during mouse embryogenesis suggests multiple developmental roles. *Gene Expr Patterns* 5, 750-5.
- Benedito, R., Trindade, A., Hirashima, M., Henrique, D., da Costa, L.L., Rossant, J., Gill, P.S., and Duarte, A., 2008. Loss of Notch signalling induced by Dll4 causes arterial calibre reduction by increasing endothelial cell response to angiogenic stimuli. *BMC Dev Biol* 8, 117.
- Betsholtz, C., Karlsson, L., and Lindahl, P., 2001. Developmental roles of platelet-derived growth factors. *Bioessays* 23, 494-507.
- Borggreffe, T., and Oswald, F., 2009. The Notch signaling pathway: Transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci*.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- Bray, S., and Furriols, M., 2001. Notch pathway: making sense of suppressor of hairless. *Curr Biol* 11, R217-21.
- Carlson, T.R., Yan, Y., Wu, X., Lam, M.T., Tang, G.L., Beverly, L.J., Messina, L.M., Capobianco, A.J., Werb, Z., and Wang, R., 2005. Endothelial expression of constitutively active Notch4

- elicits reversible arteriovenous malformations in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9884-9.
- Carmeliet, P., 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9, 653-60.
- Carmeliet, P., 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-6.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K., 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-57.
- Casanovas, O., Hicklin, D.J., Bergers, G., and Hanahan, D., 2005. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8, 299-309.
- Cheng, N., Brantley, D.M., and Chen, J., 2002. The ephrins and Eph receptors in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 75-85.
- Cleaver, O., and Krieg, P.A., 1998. VEGF mediates angioblast migration during development of the dorsal aorta in *Xenopus*. *Development* 125, 3905-14.
- Coussens, L.M., Fingleton, B., and Matrisian, L.M., 2002. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295, 2387-92.
- Cox, C.M., and Poole, T.J., 2000. Angioblast differentiation is influenced by the local environment: FGF-2 induces angioblasts and patterns vessel formation in the quail embryo. *Dev Dyn* 218, 371-82.
- Cristofanilli, M., Charnsangavej, C., and Hortobagyi, G.N., 2002. Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches. *Nat Rev Drug Discov* 1, 415-26.
- Dass, C.R., 2004. Tumour angiogenesis, vascular biology and enhanced drug delivery. *J Drug Target* 12, 245-55.
- Del Amo, F.F., Smith, D.E., Swiatek, P.J., Gendron-Maguire, M., Greenspan, R.J., McMahon, A.P., and Gridley, T., 1992. Expression pattern of *Motch*, a mouse homolog of *Drosophila Notch*, suggests an important role in early postimplantation mouse development. *Development* 115, 737-44.
- Djokovic, D., 2010. Combination of Dll4/Notch and Ephrin-B2/EphB4 targeted therapy is highly effective in disrupting tumor angiogenesis. *BMC Cancer* 10.
- Djokovic, D., Trindade, A., Gigante, J., Badenes, M., Silva, L., Liu, R., Li, X., Gong, M., Krasnoperov, V., Gill, P.S., and Duarte, A., 2010. Combination of Dll4/Notch and Ephrin-B2/EphB4 targeted therapy is highly effective in disrupting tumor angiogenesis. *BMC Cancer* 10, 641.
- Doe, C.Q., Kuwada, J.Y., and Goodman, C.S., 1985. From epithelium to neuroblasts to neurons: the role of cell interactions and cell lineage during insect neurogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 312, 67-81.
- Donovan, J., Kordylewska, A., Jan, Y.N., and Utset, M.F., 2002. Tetralogy of fallot and other congenital heart defects in *Hey2* mutant mice. *Curr Biol* 12, 1605-10.

- Drake, C.J., Hungerford, J.E., and Little, C.D., 1998. Morphogenesis of the first blood vessels. *Ann N Y Acad Sci* 857, 155-79.
- Duarte, A., Hirashima, M., Benedito, R., Trindade, A., Diniz, P., Bekman, E., Costa, L., Henrique, D., and Rossant, J., 2004. Dosage-sensitive requirement for mouse *Dll4* in artery development. *Genes Dev* 18, 2474-8.
- Duesberg, P., Rasnick, D., Li, R., Winters, L., Rausch, C., and Hehlmann, R., 1999. How aneuploidy may cause cancer and genetic instability. *Anticancer Res* 19, 4887-906.
- Dufraine, J., Funahashi, Y., and Kitajewski, J., 2008. Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms. *Oncogene* 27, 5132-7.
- Ellisen, L.W., Bird, J., West, D.C., Soreng, A.L., Reynolds, T.C., Smith, S.D., and Sklar, J., 1991. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66, 649-61.
- Fantozzi, A., and Christofori, G., 2006. Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res* 8, 212.
- Ferrara, N., and Kerbel, R.S., 2005. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438, 967-74.
- Ferrara, N., Gerber, H.P., and LeCouter, J., 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9, 669-76.
- Fischer, A., Schumacher, N., Maier, M., Sendtner, M., and Gessler, M., 2004. The Notch target genes *Hey1* and *Hey2* are required for embryonic vascular development. *Genes Dev* 18, 901-11.
- Fleming, R.J., 1998. Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Semin Cell Dev Biol* 9, 599-607.
- Folkman, J., 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285, 1182-6.
- Folkman, J., and Hanahan, D., 1991. Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. *Princess Takamatsu Symp* 22, 339-47.
- Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M., and Breitman, M.L., 1995. Role of the *Flt-1* receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376, 66-70.
- Fong, G.H., Zhang, L., Bryce, D.M., and Peng, J., 1999. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in *flt-1* knock-out mice. *Development* 126, 3015-25.
- Fortini, M.E., 2002. Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 673-84.
- Fouquet, B., Weinstein, B.M., Serluca, F.C., and Fishman, M.C., 1997. Vessel patterning in the embryo of the zebrafish: guidance by notochord. *Dev Biol* 183, 37-48.
- Fox, S.B., Gatter, K.C., and Harris, A.L., 1996. Tumour angiogenesis. *J Pathol* 179, 232-7.
- Fraser, H.M., and Lunn, S.F., 2000. Angiogenesis and its control in the female reproductive system. *Br Med Bull* 56, 787-97.

- Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., and Artavanis-Tsakonas, S., 2005. Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* 435, 964-8.
- Fung, E., Tang, S.M., Canner, J.P., Morishige, K., Arboleda-Velasquez, J.F., Cardoso, A.A., Carlesso, N., Aster, J.C., and Aikawa, M., 2007. Delta-like 4 induces notch signaling in macrophages: implications for inflammation. *Circulation* 115, 2948-56.
- Gale, N.W., and Yancopoulos, G.D., 1999. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* 13, 1055-66.
- Gale, N.W., Holland, S.J., Valenzuela, D.M., Flenniken, A., Pan, L., Ryan, T.E., Henkemeyer, M., Strebhardt, K., Hirai, H., Wilkinson, D.G., Pawson, T., Davis, S., and Yancopoulos, G.D., 1996. Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron* 17, 9-19.
- Gerety, S.S., and Anderson, D.J., 2002. Cardiovascular ephrinB2 function is essential for embryonic angiogenesis. *Development* 129, 1397-410.
- Gerety, S.S., Wang, H.U., Chen, Z.F., and Anderson, D.J., 1999. Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol Cell* 4, 403-14.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., and Betsholtz, C., 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 161, 1163-77.
- Gessler, M., Knobloch, K.P., Helisch, A., Amann, K., Schumacher, N., Rohde, E., Fischer, A., and Leimeister, C., 2002. Mouse gridlock: no aortic coarctation or deficiency, but fatal cardiac defects in *Hey2*^{-/-} mice. *Curr Biol* 12, 1601-4.
- Grabher, C., von Boehmer, H., and Look, A.T., 2006. Notch 1 activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 6, 347-59.
- Gragoudas, E.S., Adamis, A.P., Cunningham, E.T., Jr., Feinsod, M., and Guyer, D.R., 2004. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 351, 2805-16.
- Gridley, T., 1997. Notch signaling in vertebrate development and disease. *Mol Cell Neurosci* 9, 103-8.
- Guerreiro, L., Sistema cardiovascular.
- Guy, C.T., Webster, M.A., Schaller, M., Parsons, T.J., Cardiff, R.D., and Muller, W.J., 1992. Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10578-82.
- Hahn, W.C., and Weinberg, R.A., 2002. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 347, 1593-603.
- Hanahan, D., 1985. Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* 315, 115-22.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

- Harris, A.L., 2002. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2, 38-47.
- Holder, N., and Klein, R., 1999. Eph receptors and ephrins: effectors of morphogenesis. *Development* 126, 2033-44.
- Hoodless, P.A., and Wrana, J.L., 1998. Mechanism and function of signaling by the TGF beta superfamily. *Curr Top Microbiol Immunol* 228, 235-72.
- Hrabe de Angelis, M., McIntyre, J., 2nd, and Gossler, A., 1997. Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue DIII. *Nature* 386, 717-21.
- Hutchinson, J.N., and Muller, W.J., 2000. Transgenic mouse models of human breast cancer. *Oncogene* 19, 6130-7.
- Institute, N.C., Angiogenesis Inhibitors Therapy, 2008.
- Ishibe, N., and al, e., 2011. Use of epidermal growth factor receptor mutation analysis in patients with advanced non-small-cell lung cancer to determine erlotinib use as first-line therapy. *PLoS Currents*.
- Jain, R.K., 2005. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307, 58-62.
- Jain, R.K., Duda, D.G., Clark, J.W., and Loeffler, J.S., 2006. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 3, 24-40.
- Jones, N., and Dumont, D.J., 2000. Tek/Tie2 signaling: new and old partners. *Cancer Metastasis Rev* 19, 13-7.
- Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N., and Alitalo, K., 1996. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *Embo J* 15, 1751.
- Joutel, A., and Tournier-Lasserre, E., 1998. Notch signalling pathway and human diseases. *Semin Cell Dev Biol* 9, 619-25.
- Joutel, A., Andreux, F., Gaulis, S., Domenga, V., Cecillon, M., Battail, N., Piga, N., Chapon, F., Godfrain, C., and Tournier-Lasserre, E., 2000. The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. *J Clin Invest* 105, 597-605.
- Joutel, A., Corpechot, C., Ducros, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Mouton, P., Alamowitch, S., Domenga, V., Cecillion, M., Marechal, E., Maciazek, J., Vayssiere, C., Cruaud, C., Cabanis, E.A., Ruchoux, M.M., Weissenbach, J., Bach, J.F., Bousser, M.G., and Tournier-Lasserre, E., 1996. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 383, 707-10.
- Karamysheva, A.F., 2008. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 73, 751-62.
- Kerbel, R.S., Yu, J., Tran, J., Man, S., Vilorio-Petit, A., Klement, G., Coomber, B.L., and Rak, J., 2001. Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches. *Cancer Metastasis Rev* 20, 79-86.

- Kertesz, N., Krasnoperov, V., Reddy, R., Leshanski, L., Kumar, S.R., Zozulya, S., and Gill, P.S., 2006. The soluble extracellular domain of EphB4 (sEphB4) antagonizes EphB4-EphrinB2 interaction, modulates angiogenesis, and inhibits tumor growth. *Blood* 107, 2330-8.
- Kidd, S., and Lieber, T., 2002. Furin cleavage is not a requirement for Drosophila Notch function. *Mech Dev* 115, 41-51.
- Kimble, J., and Simpson, P., 1997. The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 333-61.
- Krebs, L.T., Xue, Y., Norton, C.R., Shutter, J.R., Maguire, M., Sundberg, J.P., Gallahan, D., Closson, V., Kitajewski, J., Callahan, R., Smith, G.H., Stark, K.L., and Gridley, T., 2000. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev* 14, 1343-52.
- Lawson, N.D., Scheer, N., Pham, V.N., Kim, C.H., Chitnis, A.B., Campos-Ortega, J.A., and Weinstein, B.M., 2001. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* 128, 3675-83.
- Le Borgne, R., Bardin, A., and Schweisguth, F., 2005. The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development* 132, 1751-62.
- Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P., and Ten Dijke, P., 2005. TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res* 65, 599-608.
- Li, L., Krantz, I.D., Deng, Y., Genin, A., Banta, A.B., Collins, C.C., Qi, M., Trask, B.J., Kuo, W.L., Cochran, J., Costa, T., Pierpont, M.E., Rand, E.B., Piccoli, D.A., Hood, L., and Spinner, N.B., 1997. Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat Genet* 16, 243-51.
- Lindahl, P., and Betsholtz, C., 1998. Not all myofibroblasts are alike: revisiting the role of PDGF-A and PDGF-B using PDGF-targeted mice. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7, 21-6.
- Liu, Z.J., Shirakawa, T., Li, Y., Soma, A., Oka, M., Dotto, G.P., Fairman, R.M., Velazquez, O.C., and Herlyn, M., 2003. Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Mol Cell Biol* 23, 14-25.
- Lobov, I.B., Renard, R.A., Papadopoulos, N., Gale, N.W., Thurston, G., Yancopoulos, G.D., and Wiegand, S.J., 2007. Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3219-24.
- Loomes, K.M., Underkoffler, L.A., Morabito, J., Gottlieb, S., Piccoli, D.A., Spinner, N.B., Baldwin, H.S., and Oakey, R.J., 1999. The expression of Jagged1 in the developing mammalian heart correlates with cardiovascular disease in Alagille syndrome. *Hum Mol Genet* 8, 2443-9.
- Loughna, S., and Sato, T.N., 2001. Angiopoietin and Tie signaling pathways in vascular development. *Matrix Biol* 20, 319-25.

- Mailhos, C., Modlich, U., Lewis, J., Harris, A., Bicknell, R., and Ish-Horowicz, D., 2001. Delta4, an endothelial specific notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis. *Differentiation* 69, 135-44.
- Martinez Arias, A., Zecchini, V., and Brennan, K., 2002. CSL-independent Notch signalling: a checkpoint in cell fate decisions during development? *Curr Opin Genet Dev* 12, 524-33.
- Milano, J., McKay, J., Dagenais, C., Foster-Brown, L., Pognan, F., Gadiant, R., Jacobs, R.T., Zacco, A., Greenberg, B., and Ciaccio, P.J., 2004. Modulation of notch processing by gamma-secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation. *Toxicol Sci* 82, 341-58.
- Morrison, T.B., Weis, J.J., and Wittwer, C.T., 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24, 954-8, 960, 962.
- Motifolio, Lateral inhibition mediated by Notch and Delta during nerve cell development in *Drosophila*, 2009.
- Myat, A., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., and Lewis, J., 1996. A chick homologue of Serrate and its relationship with Notch and Delta homologues during central neurogenesis. *Dev Biol* 174, 233-47.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., and Poltorak, Z., 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 13, 9-22.
- Nichols, J.T., Miyamoto, A., Olsen, S.L., D'Souza, B., Yao, C., and Weinmaster, G., 2007. DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur. *J Cell Biol* 176, 445-58.
- Noguera-Troise, I., Daly, C., Papadopoulos, N.J., Coetzee, S., Boland, P., Gale, N.W., Lin, H.C., Yancopoulos, G.D., and Thurston, G., 2006. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* 444, 1032-7.
- Oda, T., Elkahlon, A.G., Pike, B.L., Okajima, K., Krantz, I.D., Genin, A., Piccoli, D.A., Meltzer, P.S., Spinner, N.B., Collins, F.S., and Chandrasekharappa, S.C., 1997. Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat Genet* 16, 235-42.
- Pardanaud, L., Luton, D., Prigent, M., Bourcheix, L.M., Catala, M., and Dieterlen-Lievre, F., 1996. Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis. *Development* 122, 1363-71.
- Patel, N.S., Li, J.L., Generali, D., Poulson, R., Cranston, D.W., and Harris, A.L., 2005. Up-regulation of delta-like 4 ligand in human tumor vasculature and the role of basal expression in endothelial cell function. *Cancer Res* 65, 8690-7.
- Patel, N.S., Dobbie, M.S., Rochester, M., Steers, G., Poulson, R., Le Monnier, K., Cranston, D.W., Li, J.L., and Harris, A.L., 2006. Up-regulation of endothelial delta-like 4 expression correlates with vessel maturation in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 12, 4836-44.

- Pelengaris, S., Khan, M., and Evan, G., 2002. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* 2, 764-76.
- Pepper, M.S., 1997. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 21-43.
- Petrova, T.V., Makinen, T., and Alitalo, K., 1999. Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Exp Cell Res* 253, 117-30.
- Plank, M.J., and Sleeman, B.D., 2003. Tumour-induced Angiogenesis: A Review. *Journal of Theoretical Medicine* 5, 137-153.
- Radtke, F., and Raj, K., 2003. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer* 3, 756-67.
- Ramsauer, M., and D'Amore, P.A., 2002. Getting Tie(2)d up in angiogenesis. *J Clin Invest* 110, 1615-7.
- Ridgway, J., Zhang, G., Wu, Y., Stawicki, S., Liang, W.C., Chantery, Y., Kowalski, J., Watts, R.J., Callahan, C., Kasman, I., Singh, M., Chien, M., Tan, C., Hongo, J.A., de Sauvage, F., Plowman, G., and Yan, M., 2006. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* 444, 1083-7.
- Risau, W., 1995. Differentiation of endothelium. *Faseb J* 9, 926-33.
- Risau, W., 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-4.
- Robb, L., and Elefanty, A.G., 1998. The hemangioblast--an elusive cell captured in culture. *Bioessays* 20, 611-4.
- Robinson, C.J., and Stringer, S.E., 2001. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 114, 853-65.
- Rocha, S.F., Lopes, S.S., Gossler, A., and Henrique, D., 2009. Dll1 and Dll4 function sequentially in the retina and pV2 domain of the spinal cord to regulate neurogenesis and create cell diversity. *Dev Biol* 328, 54-65.
- Rossant, J., and Howard, L., 2002. Signaling pathways in vascular development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 541-73.
- Ruchoux, M.M., and Muraige, C.A., 1997. CADASIL: Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 947-64.
- Sainson, R.C., and Harris, A.L., 2007. Anti-Dll4 therapy: can we block tumour growth by increasing angiogenesis? *Trends Mol Med* 13, 389-95.
- Scehnet, J.S., Ley, E.J., Krasnoperov, V., Liu, R., Manchanda, P.K., Sjoberg, E., Kostecke, A.P., Gupta, S., Kumar, S.R., and Gill, P.S., 2009. The role of Ephs, Ephrins, and growth factors in Kaposi sarcoma and implications of EphrinB2 blockade. *Blood* 113, 254-63.
- Scehnet, J.S., Jiang, W., Kumar, S.R., Krasnoperov, V., Trindade, A., Benedito, R., Djokovic, D., Borges, C., Ley, E.J., Duarte, A., and Gill, P.S., 2007. Inhibition of Dll4 mediated signaling induces proliferation of immature vessels and results in poor tissue perfusion. *Blood*.

- Seo, S., Fujita, H., Nakano, A., Kang, M., Duarte, A., and Kume, T., 2006. The forkhead transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are required for arterial specification and lymphatic sprouting during vascular development. *Dev Biol*.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., and Schuh, A.C., 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62-6.
- Shawber, C.J., Das, I., Francisco, E., and Kitajewski, J., 2003. Notch signaling in primary endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 995, 162-70.
- Shirayoshi, Y., Yuasa, Y., Suzuki, T., Sugaya, K., Kawase, E., Ikemura, T., and Nakatsuji, N., 1997. Proto-oncogene of int-3, a mouse Notch homologue, is expressed in endothelial cells during early embryogenesis. *Genes Cells* 2, 213-24.
- Shutter, J.R., Scully, S., Fan, W., Richards, W.G., Kitajewski, J., Deblandre, G.A., Kintner, C.R., and Stark, K.L., 2000. Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev* 14, 1313-8.
- Siegel, P.M., Ryan, E.D., Cardiff, R.D., and Muller, W.J., 1999. Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer. *EMBO J* 18, 2149-64.
- Stacker, S.A., and Achen, M.G., 1999. The vascular endothelial growth factor family: signalling for vascular development. *Growth Factors* 17, 1-11.
- Suchting, S., Freitas, C., le Noble, F., Benedito, R., Breant, C., Duarte, A., and Eichmann, A., 2007. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Suri, C., McClain, J., Thurston, G., McDonald, D.M., Zhou, H., Oldmixon, E.H., Sato, T.N., and Yancopoulos, G.D., 1998. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* 282, 468-71.
- Suzuki, M., Yamamoto, M., Sugimoto, A., Nakamura, S., Motoda, R., and Orita, K., 2006. Delta-4 expression on a stromal cell line is augmented by interleukin-6 via STAT3 activation. *Exp Hematol* 34, 1143-50.
- Teicher, B.A., 2006. Tumor models for efficacy determination. *Mol Cancer Ther* 5, 2435-43.
- Thurston, G., Noguera-Troise, I., and Yancopoulos, G.D., 2007. The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth. *Nat Rev Cancer* 7, 327-31.
- Trindade, A., Ram Kumar, S., Scehnet, J.S., Lopes-da-Costa, L., Becker, J., Jiang, W., Liu, R., Gill, P.S., and Duarte, A., 2008. Overexpression of delta-like 4 induces arterialization and attenuates vessel formation in developing mouse embryos. *Blood* 112, 1720-9.
- Ursini-Siegel, J., Schade, B., Cardiff, R.D., and Muller, W.J., 2007. Insights from transgenic mouse models of ERBB2-induced breast cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 389-97.

- Uyttendaele, H., Ho, J., Rossant, J., and Kitajewski, J., 2001. Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5643-8.
- Uyttendaele, H., Marazzi, G., Wu, G., Yan, Q., Sassoon, D., and Kitajewski, J., 1996. Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development* 122, 2251-9.
- van Es, J.H., van Gijn, M.E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D.J., Radtke, F., and Clevers, H., 2005. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 435, 959-63.
- Villa, N., Walker, L., Lindsell, C.E., Gasson, J., Iruela-Arispe, M.L., and Weinmaster, G., 2001. Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mech Dev* 108, 161-4.
- Wang, H.U., Chen, Z.F., and Anderson, D.J., 1998. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 93, 741-53.
- Wang, W., Prince, C.Z., Mou, Y., and Pollman, M.J., 2002. Notch3 signaling in vascular smooth muscle cells induces c-FLIP expression via ERK/MAPK activation. Resistance to Fas ligand-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277, 21723-9.
- Wilkinson, D.G., 2000. Eph receptors and ephrins: regulators of guidance and assembly. *Int Rev Cytol* 196, 177-244.
- Williams, C.K., Li, J.L., Murga, M., Harris, A.L., and Tosato, G., 2006. Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function. *Blood* 107, 931-9.
- Wong, G.T., Manfra, D., Poulet, F.M., Zhang, Q., Josien, H., Bara, T., Engstrom, L., Pinzon-Ortiz, M., Fine, J.S., Lee, H.J., Zhang, L., Higgins, G.A., and Parker, E.M., 2004. Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J Biol Chem* 279, 12876-82.
- Xue, Y., Gao, X., Lindsell, C.E., Norton, C.R., Chang, B., Hicks, C., Gendron-Maguire, M., Rand, E.B., Weinmaster, G., and Gridley, T., 1999. Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum Mol Genet* 8, 723-30.
- Yamashita, J., Itoh, H., Hirashima, M., Ogawa, M., Nishikawa, S., Yurugi, T., Naito, M., and Nakao, K., 2000. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408, 92-6.
- Zhong, T.P., Childs, S., Leu, J.P., and Fishman, M.C., 2001. Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature* 414, 216-20.

ANEXOS

Tradução, maturação e activação dos membros da via Notch

Os domínios NICD e NECD são sintetizados como uma única proteína (pré-Notch). A O-fucosiltransferase-1 (OFUT1) funciona como chaperonina e é essencial para o transporte de pré-Notch do retículo endoplasmático (ER) para o Aparelho de Golgi. Também é necessária para a fucosilação, no Aparelho de Golgi, dos resíduos de serina e treonina das repetições *EGF-like* do NECD (Schweisguth, 2004; Xu, Lei & Irvine, 2005) que serão depois glicosiladas. A glicosilação destes resíduos é levada a cabo por membros da família Fringe (Figura nº 1). Alguns autores demonstraram que Fringe, para além de modular a afinidade da interacção entre o ligando e o receptor em *trans* (isto é, dos receptores Notch de uma célula para os ligandos da outra), também pode regular interacções em *cis* (isto é, dentro da própria célula que expressa Notch e Delta/Jagged). Esta interacção em *cis* permite a formação de complexos receptor-ligando que ficam retidos no aparelho de Golgi, inibindo assim a célula de receber sinais do exterior uma vez que Notch não é transportado para a membrana celular (Klein, Brennan & Arias, 1997; Sakamoto *et al.*, 2002).

O receptor Notch é clivado em três locais específicos. A primeira clivagem (S1) ocorre no aparelho de Golgi e é catalizada pela enzima *Furin-like convertase* (Figura nº 1). S1 ocorre pelo menos nos receptores Notch1 e 2 de mamíferos e parece não ocorrer no receptor Notch de *D. melanogaster* (Kidd and Lieber, 2002). A proteína Notch recém traduzida é assim clivada em duas partes, o NECD e a outra que engloba o domínio TM e o NICD (Fortini, 2002). Estas duas porções, mais tarde, ligam-se de forma não covalente formando um heterodímero que é transportado para a membrana celular (Blaumueller, Qi, Zagouras & Artavanis-Tsakonas, 1997; Logeat *et al.*, 1998; Rand *et al.*, 2000) (Figura nº 1). A via é activada através da interacção intercelular entre o receptor Notch e o ligando (Lag-2, Serrate, Delta ou Jagged) (Kimble and Simpson, 1997). A interacção do ligando com o receptor desencadeia as duas outras clivagens proteolíticas (S2 e S3). S2 é catalizada pela enzima conversora de TNF- α (TACE, da família das metaloproteases ADAM) e ocorre no NECD permitindo a sua libertação da membrana celular (Brou *et al.*, 2000; Peschon *et al.*, 1998). Esta clivagem é essencial para que ocorra S3, pois esta só ocorre se o número de resíduos de aminoácidos do NECD for inferior a trinta (Vooijs, Schroeter, Pan, Blandford & Kopan, 2004). S3 é catalizada pelo complexo *gamma*-secretase e induz a libertação do NICD, que é translocado até ao núcleo e actua como coactivador transcricional (Bland, Kimberly & Rand, 2003; De Strooper *et al.*, 1999; Pan & Rubin, 1997). O NICD não se consegue ligar directamente ao DNA. Para tal, forma um heterodímero com a proteína RBP-J_k (também denominada CSL, pois tem um domínio proteico que se encontra presente nas proteínas CBF1 no humano, *Supressor of Hairless* em *D. melanogaster* e LAG-1 em *C. elegans*) (Bray and Furriols, 2001) através da ligação do seu domínio RAM e, em menor grau, das repetições de anquirina à região central da RBP-J_k, isto é, ao domínio *beta-trefoil* (BTD). A ligação

deste complexo ao DNA activa a transcrição de genes com domínios de reconhecimento de RBP-J_k (Figura nº 1).

Embora se pense que RBP-J_k medie a acção de NICD na maior parte dos casos, existem algumas evidências de que a activação dos genes alvo da via Notch nem sempre requer a presença do factor transcricional RBP-J_k (Martinez Arias et al., 2002). Nos mamíferos, MAML (*mastermind-like family*) estabiliza a ligação de RBP-J_k/NICD ao DNA (Petcherski & Kimble, 2000; Wallberg, Pedersen, Lendahl & Roeder, 2002), promovendo a ligação de co-activadores (CoA), como a acetiltransferase de histonas p300. MAML recruta também CyclinC/Cdk8, que determina a fosforilação do NICD e a degradação do seu domínio PEST após ubiquitinação pela ligase de ubiquitina Fbw7/Se110. Este complexo é essencial para a activação de Notch e para a sua renovação. Por outro lado, as E3 ligases de ubiquitina, Mindbomb (Mib) e Neuralized-like (Neur) promovem o *turnover* do ligando e levam à sua endocitose e degradação (Deblandre, Lai & Kintner, 2001; Hicke, 2001; Itoh *et al.*, 2003; Parks, Klueg, Stout & Muskavitch, 2000; Pavlopoulos *et al.*, 2001; Weissman, 2001; Yeh *et al.*, 2001). Segundo estes autores, a endocitose de Delta após a sua ligação a Notch pode facilitar a clivagem S2 de Notch, libertando o NECD, que é transendocitado juntamente com Delta e assim ambos são reciclados (Le Borgne *et al.*, 2005; Parks *et al.*, 2000; Wang & Struhl, 2005). No entanto, outros autores defendem que Delta ao ligar-se ao receptor exerce força provocando a separação das duas partes do receptor heterodimérico (formadas por S1) antes da clivagem S2. Assim, defendem que a transendocitose do NECD do receptor com o ligando é independente de S2 e ocorre apenas devido à força física provocada pela endocitose (Nichols et al., 2007).

Quando a sinalização Notch se encontra activada, as proteínas NRARP (*Notch-regulated ankyrin-repeat protein*) e Deltex têm um papel regulador importante de *feedback* negativo. NRARP e Deltex-1 são genes alvo da via Notch e interactuam com NICD, bloqueando a transactivação mediada por esta via e os seus efeitos no desenvolvimento das células T. Para além dos ligandos acima descritos, alguns resultados apontam para a existência de outras moléculas que podem interagir com Notch e desencadear a sinalização, como as moléculas de adesão F3/*Contactin* ou NB-3 nos processos de diferenciação e maturação dos oligodendrócitos (Cui *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2003).

Quando a RBP-J_k não se encontra ligada ao NICD, bloqueia a transcrição dos genes alvo da via Notch através do recrutamento de complexos co-repressores (CoR), sendo a sua ligação ao NICD essencial para a transcrição bloqueada passar ao estado activado (Figura nº 1). Na ausência de Notch, a proteína RBP-J_k pode interagir directamente com TFIID, um factor transcricional geral, ou recrutar complexos que contêm deacetilases de histonas. Nesta condição, esta proteína interage com um dos complexos co-repressores SMRT/mSin3A/HDAC-1 (SMRT, *silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptor*; HDAC-1, *histone deacetylase-1*), Ncor/mSin3A/HDAC-1 ou CIR/SAP30/HDAC-2 (Chen & Evans, 1995; Horlein *et al.*, 1995; Kao *et al.*, 1998). Recentemente, foi realizada a caracterização do complexo co-repressor RBP-J_k/SHARP/CtBP/CtIP (SHARP, SMRT e HDAC associados; CtBP, terminal C de ligação da proteína;

CtIP, proteína que interage com CtBP). A ligação do NICD à proteína RBP-J_k promove a separação dos CoR e de deacetilases de histonas e a ligação de acetiltransferases de histonas.

Recentemente surgiram evidências de que, tal como os receptores, os ligandos sofrem três clivagens, uma no domínio extracelular catalizada por uma metaloprotease ADAM e duas no domínio transmembranar catalizadas pelo complexo *gamma*-secretase (Bland *et al.*, 2003; LaVoie & Selkoe, 2003; Six *et al.*, 2003). Em cultura de células, estas clivagens determinam a libertação do domínio intracelular, que se dirige para o núcleo (ainda não foi demonstrado *in vivo*). Ao invés dos receptores, nos ligandos estas clivagens parecem ocorrer de forma independente à sinalização (Six *et al.*, 2003). Contudo, ainda resta a possibilidade do domínio intracelular dos ligandos poder regular a expressão génica, permitindo, nesse caso, existir uma sinalização bi-direccional (Bland *et al.*, 2003; Ikeuchi & Sisodia, 2003; Klueg, Parody & Muskavitch, 1998; LaVoie & Selkoe, 2003; Mishra-Gorur, Rand, Perez-Villamil & Artavanis-Tsakonas, 2002; Pintar, De Biasio, Popovic, Ivanova & Pongor, 2007; Qi *et al.*, 1999; Sapir, Assa-Kunik, Tsruya, Schejter & Shilo, 2005; Six *et al.*, 2003).

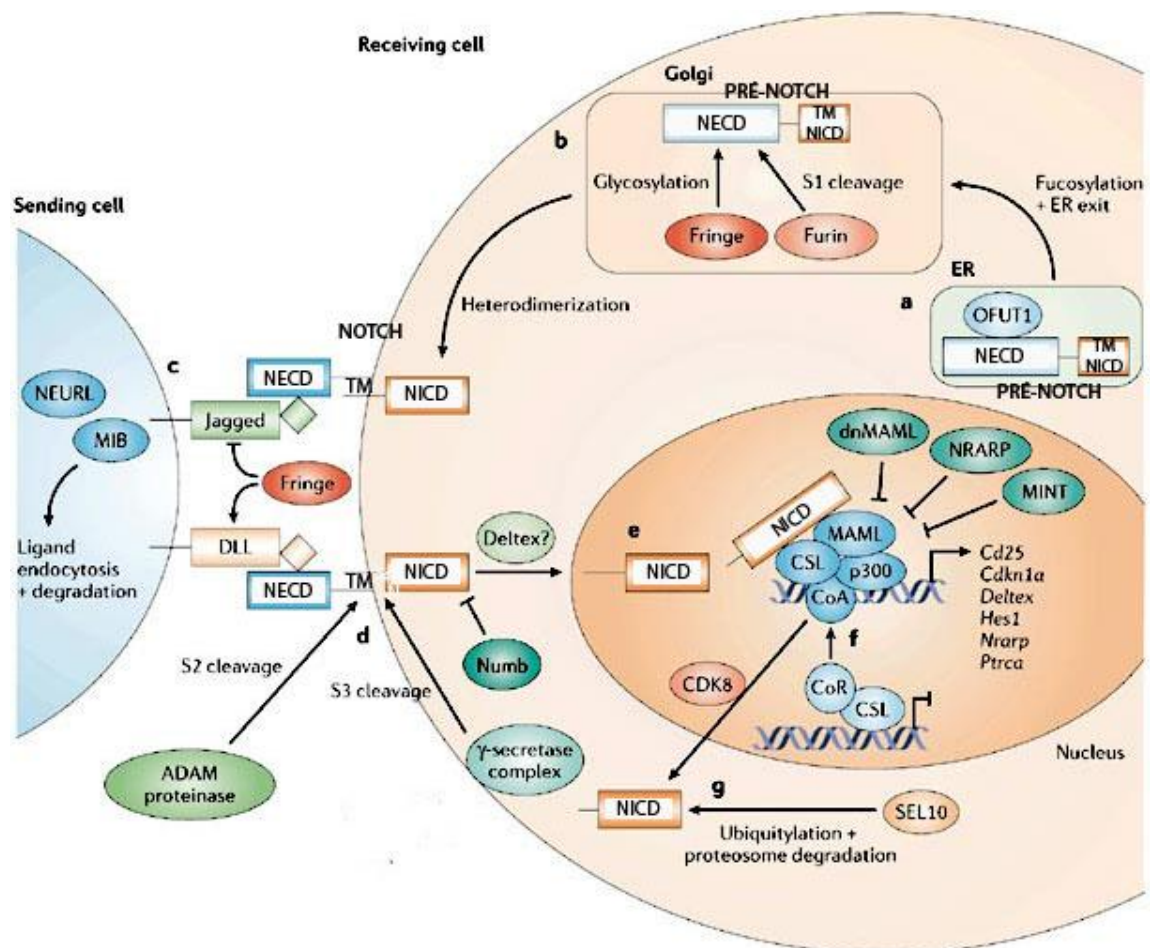


Figura nº A.19 – Formação e mecanismo da sinalização Notch (a-g determina a ordem do processo). Adaptado (Grabher *et al.*, 2006).