



Universidade Nova de Lisboa

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE DLL4 NA NEO-
ANGIOGÉNESE TUMORAL EM MODELOS MURINOS
DE CANCRO DA PRÓSTATA**

Ana Carina Franco Fernandes

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Abril, 2012



Universidade Nova de Lisboa

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE DLL4 NA NEO-
ANGIOGÉNESE TUMORAL EM MODELOS MURINOS
DE CANCRO DA PRÓSTATA**

Ana Carina Franco Fernandes

ORIENTADOR: Professor Doutor António Duarte

CO-ORIENTADOR: Professor Doutor Celso Cunha

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, realizado sob a orientação científica do Prof. Dr. António Duarte, com a co-orientação do Prof. Dr. Celso Cunha.

Abril, 2012

AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho só foi possível graças à colaboração de várias pessoas, as quais deixo aqui os mais sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, estou profundamente grata ao meu orientador, Professor Doutor António Duarte (Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, Portugal) a oportunidade que me proporcionou na realização deste estágio e a minha integração num projeto tão promissor e num ambiente de equipa altamente profissional e extremamente produtiva.

Ao meu co-orientador de Mestrado, Professor Doutor Celso Cunha (Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Portugal), o seu constante incentivo, disponibilidade, crítica e sugestões durante a revisão desta tese.

Ao Dr. Alexandre Trindade (Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa) agradeço a orientação que me deu durante o meu estágio, pela sua dedicação, disponibilidade e amizade. Quero agradecer também a todos os meus colegas e amigos da Faculdade de Medicina Veterinária, especialmente, à Dr.^a. Ana Teresa Tavares, Rita Pedrosa, Catarina Carvalho, Marina Badenes, Joana Carinhas, Liliana Mendonça, Daniel Murta e ao Dr. Dusan Djokovic, por todos os momentos partilhados no laboratório e no gabinete, todo o apoio e colaboração.

Ao Dr. Greenberg (Clinical Research Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA) pela disponibilização da linha TRAMP utilizada neste trabalho. Ao Dr. Hugo Pissarra (Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa) pela ajuda na caracterização histológica das lesões prostáticas desenvolvidas pelos animais em estudo. E à Dr.^a. Vera Códices (Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa) por me ter cedido algumas horas no microscópio de fluorescência do instituto.

Ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa) e ao Instituto de Higiene e Medicina Tropical pelo apoio logístico e financeiro, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

A todos os meus amigos e família pelo ânimo e carinho que sempre me deram, assim como toda a paciência que tiveram.

Por fim e de uma forma muito especial, gostaria de agradecer aos meus pais por todo o amor e apoio incondicional, essências em todas as etapas da minha vida.

AVALIAÇÃO DO PAPEL DE DLL4 NA NEO-ANGIOGÉNESE TUMORAL EM MODELOS MURINOS DE CANCRO DA PRÓSTATA

Ana Carina Franco Fernandes

RESUMO

O cancro da próstata é hoje em dia um importante problema de saúde pública. Em Portugal, é o tipo de cancro mais frequente no homem, causando cerca de 10% da mortalidade por cancro. A maioria dos homens são diagnosticados em estádios iniciais da doença e nalguns casos é desenvolvida recorrência e, eventualmente, doença metastática. Hoje em dia, a terapia utilizada no tratamento do cancro da próstata, na maioria dos casos, provoca efeitos secundários e não fornece uma cura, surgindo a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias de quimioterapia para o controlo eficaz desta patologia.

A terapia anti-angiogénica tem vindo a ser incorporada em vários protocolos terapêuticos contra o cancro, constituindo uma abordagem promissora como adjuvante da quimioterapia convencional. Contudo, sabe-se que os tumores tratados com fármacos bloqueadores do fator de crescimento vascular endotelial A (VEGFA), desenvolvem resistência ao tratamento e nem todos os tipos de tumores são sensíveis a esta terapia. Deste modo, surge a necessidade do desenvolvimento de terapias anti-angiogénicas alternativas para complementar os tratamentos existentes, melhorando-as e impedindo o desenvolvimento de resistências.

Recentemente, a sinalização Delta-like 4 (Dll4)/Notch tem sido identificada como um novo e promissor alvo na angiogénese tumoral. O bloqueio da função de Dll4 tem demonstrado ter um efeito pró-angiogénico nos tumores, promovendo um aumento da neo-vasculatura tumoral. Paradoxalmente, este bloqueio inibe o desenvolvimento tumoral devido à formação de vasos imaturos e não-funcionais, com subsequente aumento do nível de hipoxia no tumor. Contudo, apesar da notoriedade destas informações, é fundamental a realização de mais estudos, nomeadamente, utilizando-se modelos de tumores autóctones, de forma a ser feita uma avaliação mais fiável da eficácia de terapias anti-angiogénicas baseadas no bloqueio de Dll4. Neste sentido, o trabalho de investigação desenvolvido tem como objetivo a caracterização da expressão alterada de *Dll4* no desenvolvimento de tumores prostáticos. Para isso recorreu-se à análise de uma linha de murganhos TRAMP (*TRansgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate*), que desenvolve adenocarcinoma da próstata, com sobre-expressão ou deleção de *Dll4*, no endotélio.

A caracterização fenotípica dos mutantes com ganho-de-função endotelial de *Dll4* revelou uma diminuição do crescimento tumoral, devido ao efeito anti-angiogénico de Dll4, impedindo a resposta das células endoteliais aos estímulos pró-angiogénicos. Simultaneamente verificou-se que o aumento dos níveis de expressão de *Dll4* promove a estabilização dos vasos já existentes, através do recrutamento de células de suporte.

Por outro lado, confirmou-se os resultados anteriormente referidos em outros modelos animais, em relação aos mutantes com perda-de-função endotelial de *Dll4*.

No seu conjunto os resultados mostram que o gene *Dll4* desempenha um papel fulcral como regulador negativo do crescimento vascular angiogénico e, ao mesmo tempo, como regulador positivo dos fatores de normalização da vasculatura tumoral. Estes fatos sustentam a hipótese do controlo do funcionamento de Dll4 apresentar potencial terapêutico na luta contra o cancro da próstata, como agonista ou antagonista, dependendo do tipo tumoral e do resultado da avaliação de segurança e eficácia destas terapias que deverão ser feitos, especialmente quando combinada com outros fármacos.

Palavras-chave: Angiogénese tumoral; sinalização Dll4/Notch; TRAMP; desenvolvimento e maturação vascular.

IMPORTANCE OF DLL4 IN TUMOR NEOANGIOGENESES USING A MURINE MODEL OF PROSTATE CANCER

Ana Carina Franco Fernandes

ABSTRACT

Prostate cancer is an important public health problem. In Portugal, this is the most common type in humans, causing about 10% of cancer mortality. Most patients are diagnosed at early stages of the disease and in some cases develop recurrence and metastatic disease. Current treatments for prostate cancer are mainly associated with side effects and fail to provide a cure. The anti-angiogenic therapy has been incorporated in various cancer therapeutic protocols and it is a promising approach as an adjuvant to conventional chemotherapy. However, it is known that tumors treated with the currently approved anti-angiogenic VEGF-targeting drug can develop resistance and not all tumor types are sensitive to such therapy. Therefore, alternative angiogenesis-based therapies are required to complement the existing treatments, improve them and prevent the development of resistance.

Recently, the Delta 4 (Dll4) / Notch signaling has been identified as a promising new target in tumor angiogenesis. The inhibition of Dll4 in tumors has revealed a pro-angiogenic effect, which leads to an increase in tumor neo-vasculature. Paradoxically, this blockage inhibits the tumor growth due to the formation of immature and non-functional vessels, with subsequent increased levels of tumor hypoxia. However, further studies using autochthonous tumor models are needed for a more reliable evaluation the efficacy of Dll4-based anti-angiogenic therapies. In this work were carried out trials to characterize the altered expression of Dll4 in prostatic tumor development. For this we used the animal model TRAMP (TRansgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate), which develops prostate adenocarcinoma with *Dll4* overexpression or *Dll4* deletion in the endothelium.

Phenotypic characterization of mutants with gain-of-function endothelial *Dll4* showed a decrease of tumor growth due to an anti-angiogenic effect of Dll4, preventing the endothelial cell's response to pro-angiogenic stimuli. Simultaneously, the increased expression of *Dll4* promoted the stabilization of existing vessels through the recruitment of support cells. Moreover, the results previously described in other animal models with *Dll4* endothelial loss-of-function were confirmed.

Taken together, these results show that the *Dll4* gene plays an important role in prostatic tumor angiogenesis, both as a negative regulator of vascular growth and as a positive regulator of pro-maturation and vascular normalization factors. These observations support the hypothesis that controlling the function of Dll4 may represent an effective therapeutic approach for the treatment of solid tumors. The use of Dll4 agonists or antagonists will probably depend on the tumor type as well as on further toxicity and efficacy analyses, especially when combined with other drugs.

Keywords: Tumor angiogenesis; signaling Dll4/Notch; TRAMP mice; vascular development and maturation.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract.....	iv
Índice Geral.....	
Índice de Figuras	iii
Índice de tabelas	vi
Lista de Abreviaturas.....	vii
I. INTRODUÇÃO.....	2
1. Biologia Tumoral.....	2
1.1. Vasculatura tumoral.....	4
2. Angiogénese tumoral	6
2.1. Mecanismos da angiogénese	7
2.2. Reguladores da angiogénese tumoral	9
2.2.2. Sinalização Angiopoietina/Tie.....	11
2.2.3.Sinalização PDGF	12
2.2.4. Sinalização por efrinas	12
3. Via Notch	13
3.1. Componentes moleculares da via Notch.....	14
3.2.1. Sinalização Dll4/Notch	16
3.2.1.1. Sinalização Dll4/Notch na angiogénese tumoral.....	17
4. Terapia anti-angiogénica tumoral	19
5. Modelos tumorais em murganhos.....	20

II. MATERIAL E MÉTODOS	25
1. Animais experimentais	25
1.1. Extração do ADN genómico	26
1.2. Genotipagem por PCR.....	27
2. Recolha e fixação dos tumores prostáticos	27
2.1. Recolha da próstata dos murganhos	27
2.2. Processamento dos tecidos.....	29
2.3. Criosecção dos blocos de gelatina das próstatas dos murganhos.....	29
3. Análise histológica.....	29
3.1. Coloração Hematoxilina-Eosina (H&E).....	29
3.2. Imunofluorescência indireta.....	30
3.3. Microscopia.....	31
4. Análise da expressão genética	32
4.1. Processamento dos tecidos.....	32
4.2. Extração de ARN.....	32
4.3. Transcrição reversa.....	32
4.4. PCR em tempo real.....	33
5. Análise estatística	34
III. RESULTADOS	36
1. Análise fenotípica de tumores prostáticos em mutantes com ganho-de-função endotelial de <i>Dll4</i>	36
1.1. Análise do crescimento tumoral.....	36
1.2. Caracterização do desenvolvimento vascular tumoral	38
1.3. Análise de expressão génica por PCR em tempo real	44
2. Análise fenotípica de tumores prostáticos em mutantes com perda-de-função endotelial de <i>Dll4</i>	45

2.1. Análise do crescimento tumoral	46
2.2. Caracterização do desenvolvimento vascular tumoral	47
2.3. Análise de expressão génica por PCR em tempo real	53
IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	55
V. BIBLIOGRAFIA.....	63
ANEXOS	796
ANEXO I	796
1. Modo de preparação das soluções usadas	76
1.1. Tamoxifeno	76
1.2. PBS (<i>phosphate-buffered saline</i>)	76
1.3. Solução de <i>Tail Buffer</i>	76
1.4. Solução de TE (tris-EDTA)	77
1.5. Tampão de eletroforese: TAE (tris-acetato-EDTA)	77
1.6. Avertina	77
1.7. DAPI.....	78
1.8. Mowiol.....	78
ANEXO II	79
1. Protocolos de PCR.....	79
1.1. Linha transgénica TRAMP	79
1.2. Linha transgénica TetO7-Dll4 e VE-Cadherin-CreER ^{T2}	80
1.3. Linha transgénica Tie2-rtTA.....	81
1.4. Linha transgénica <i>Dll4</i> ^{lox/lox}	82
2. Protocolo PCR em tempo real.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático de: a) tumor benigno, b) tumor maligno	3
Figura 2. Processos de formação dos vasos sanguíneos.....	5
Figura 3. Mecanismo da angiogénese: seleção de uma célula de ponta	8
Figura 4. Mecanismo da angiogénese: alongamento do novo vaso	9
Figura 5. Mecanismos da sinalização Notch	15
Figura 6. Efeito da inibição da sinalização Dll4/Notch na angiogénese tumoral	18
Figura 7. Fases do desenvolvimento do cancro da Próstata em modelos TRAMP	22
Figura 8. Trato urogenital de um murgancho adulto masculino.....	28
Figura 9. Comparação do aumento do peso da próstata em murganchos $T^{+/+}$ eDll4OE e $T^{+/+}$ CtrlOE, relativamente ao peso apresentado pelos murganchos C57BL/6, às 18 e 24 semanas de idade.	37
Figura 10. Secções histológicas do lóbulo dorsal da próstata dos murganchos $T^{+/+}$ CtrlOE e $T^{+/+}$ eDll4OE, às 18 e 24 semanas de idade (ampliação 20x).. ..	38
Figura 11. Imunofluorescência indireta para deteção da densidade vascular e do recrutamento de células de suporte, em criosecções da próstata dos murganchos $T^{+/+}$ CtrlOE e $T^{+/+}$ eDll4OE, às 18 e 24 semanas de idade.....	39
Figura 12. Análise dos resultados obtidos por imunofluorescência da (a) densidade vascular relativa e do (b) recrutamento de células de suporte dos tumores prostáticos \pm desvia padrão, em murganchos TRAMP $^{+/+}$ controlos e $T^{+/+}$ eDll4OE, às 18 e 24 semanas de idade.....	40
Figura 13. Imunofluorescência indireta para detetar a perfusão vascular em criosecções da próstata dos murganchos $T^{+/+}$ CtrlOE e $T^{+/+}$ eDll4OE, às 18 e 24 semanas de idade...41	41

Figura 14. Análise dos resultados obtidos por imunofluorescência da perfusão vascular relativa \pm erro padrão, em tumores prostáticos de ganho-de-função endotelial em *Dll4* relativamente aos controlos, em animais com 18 e 24 semanas de idade..42

Figura 15. Imunofluorescência indireta para detetar a extravasação vascular em murganhos $T^{+/+}$ CtrlOE e $T^{+/+}$ eDll4OE, às 18 e 24 semanas de idade.....43

Figura 16. Análise dos resultados obtidos por imunofluorescência da extravasação vascular relativa \pm erro padrão, em tumores prostáticos de ganho-de-função endotelial em *Dll4* em relação aos controlos, em animais com 18 e 24 semanas de idade.44

Figura 17. Expressão relativa de genes envolvidos na neo-angiogénese tumoral em murganhos TRAMP^{+/+} com ganho-de-função endotelial em *Dll4* em comparação com os controlos.45

Figura 18. Comparação do aumento do peso da próstata em murganhos $T^{+/+}$ eDll4LOF e $T^{+/+}$ CtrlLOF, relativamente ao peso apresentado pelos murganhos C57BL/6, às 18 e 24 semanas de idade.46

Figura 19. Secções histológicas do lóbulo dorsal da próstata dos murganhos $T^{+/+}$ CtrlLOF e $T^{+/+}$ eDll4LOF, às 18 e 24 semanas de idade (ampliação 20x).....47

Figura 20. Imunofluorescência indireta para deteção da densidade vascular e do recrutamento de células de suporte, em criosecções da próstata dos murganhos $T^{+/+}$ CtrlLOF e $T^{+/+}$ eDll4LOF, às 18 e 24 semanas de idade.48

Figura 21. Análise dos resultados obtidos por imunofluorescência da (a) densidade vascular relativa e do (b) recrutamento de células de suporte dos tumores prostáticos \pm desvia padrão, em murganhos $T^{+/+}$ eDll4LOF e $T^{+/+}$ CtrlLOF, às 18 e 24 semanas de idade.49

Figura 22. Imunofluorescência indireta para detetar a perfusão vascular em criosecções da próstata dos murganhos $T^{+/+}$ CtrlLOF e $T^{+/+}$ eDll4LOF, às 18 e 24 semanas de idade..50

Figura 23. Análise dos resultados obtidos por imunofluorescência da perfusão vascular relativa \pm erro padrão, em tumores prostáticos de perda-de-função endotelial em *Dll4* relativamente aos controlos, em animais com 18 e 24 semanas de idade..51

Figura 24. Análise dos resultados obtidos por imunofluorescência da extravasação vascular relativa \pm erro padrão, em tumores prostáticos de perda-de-função endotelial em *Dll4* em relação aos controlos, em animais com 18 e 24 semanas de idade..51

Figura 25. Imunofluorescência indireta para detetar a extravasação vascular em murganhos $T^{+/+}$ CtrlLOF e $T^{+/+}$ eDll4LOF, às 18 e 24 semanas de idade..52

Figura 26. Expressão relativa de genes envolvidos na neo-angiogénese tumoral em murganhos TRAMP^{+/+} com perda-de-função endotelial em *Dll4* em comparação com os controlos.53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Sequências de oligonucleótidos iniciadores (<i>primers</i>) usados na reação de PCR.	79
Tabela 2. Mistura de reação de PCR.	79
Tabela 3. Programa de termociclador.	80
Tabela 4. Sequências de oligonucleótidos iniciadores (<i>primers</i>) usados na reação de PCR, para TetO7-Dll4.	80
Tabela 5. Sequências de oligonucleótidos iniciadores (<i>primers</i>) usados na reação de PCR, para VE-cadherin-CreER ^{T2}	80
Tabela 6. Mistura de reação de PCR para ambas as linhas.	81
Tabela 7. Programa de termociclador.	81
Tabela 8. Sequências de oligonucleótidos iniciadores (<i>primers</i>) usados na reação de PCR, para Tie2-rtTA.	81
Tabela 9. Mistura de reação de PCR.	82
Tabela 10. Programa de termociclador.	82
Tabela 11. Sequências de oligonucleótidos iniciadores (<i>primers</i>) usados na reação de PCR, para <i>Dll4</i> ^{lox/lox}	82
Tabela 12. Mistura de reação de PCR.	83
Tabela 13. Programa de termociclador.	83
Tabela 14. Sequências de oligonucleótidos iniciadores (<i>primers</i>) usados na reação de PCR em tempo real.	84
Tabela 15. Mistura de reação de PCR em tempo real para as amostras em triplicado. ...	85
Tabela 16. Mistura de reação de PCR em tempo real – controlo negativo.	85
Tabela 17. Programa de termociclador em tempo real.	85

LISTA DE ABREVIATURAS

'	Minutos
''	Segundos
+/-	Heterozigotia
+/+	Homozigotia
µg	Micrograma
µL	Microlitro
ADAM	“A Desintegrin And Metalloproteinase”
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementar
Ang	“Angiopoietin”
AP	“Anterior Prostate”
ARN	Ácido ribonucleico
BL	“Bladder”
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CBF	“Cp-Binding Factor”
Cre	”Cyclization recombination”
CSL	Domínio proteico presente em CBF1, “Supressor of hairless e LAG-1”
C _T	“Cycle Threshold”
DAPI	4,6-diamino-2-fenil indol
Dll	“Delta-like”
dNTPs	desoxirribonucleótidos

ECM	“ExtraCellular Matrix”
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EGF	“Epidermal Growth Factor”
EPC	“Endothelium Progenitor Cells”
FDA	“Food and Drug Administration”
FGF	“Fibroblast Growth Factor”
Flk	“Flt related tyrosine kinase”
Flt	“Fms-like tyrosine kinase ”
H&E	Coloração hematoxilina-eosina
Hes	“Hairy and Enhancer of Split”
Hey	”Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif”
HIF	“Hypoxia Inducible Factor”
IgG	Imunoglobulina G
IL6	InterLeucina-6
Jag	Ligando Jagged
K ₂ HPO ₄	Monohidrogenofosfato de potássio
Kb	Kilobites
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Kilogramas
KH ₂ PO ₄	Dihidrogenofosfato de potássio
LoxP	”Locus of X-over P1”
LP	“Lateral Prostate”
mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio

min	Minutos
mL	Militros
mm	Milímetros
MMP	“Matrix MetalloProteinase”
Na ₂ HPO ₄	Monohidrogenofosfato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	Dihidrogenofosfato de sódio
NaHCO ₃	Hidrogenocarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NECD	“Notch ExtraCelular Domain”
ng	Nanogramas
NICD	“Notch IntraCelular Domain”
nm	Nanómetros
°C	Graus Celsius
p	Nível de significância
p53	Proteína supressora de tumor p53
PB	“minimal Rat Probasin”
PBS	“Phosphate buffered saline”
PBSW	”Phosphate buffered saline-Tween-20”
PCR	”Polymerase Chain Reaction”
PDGF	”Platelet Derived Growth Factor”
PDGFBR β	“Platelet Derived Growth Factor Receptor <i>beta</i> ”
PECAM	“Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule”
PIN	“Prostatic intraepithelial neoplasia”
PIGF	“Placental Growth Factor “

PP2A	“Protein Phosphatase 2 ^a ”
Rb	Proteína supressora de tumor do retinoblastoma
RBP-J _k	“Recombination signal sequence-Binding Protein J _k ”
RGB	“Red Green Blue”
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	“Real-time-Polymerase Chain Reaction”
<i>rtTA</i>	“Reverse tetracycline-controlled transactivator”
SDS	”Sodium dodecyl phosphate”
SDW	“Sterile Distilled Water”
SMA	”Smooth Muscle Actin”
SV	“Seminal Vesicles”
T ^{+/+} CtrlLOF	murganhos TRAMP sem a recombinase Cre e não injetados com tamoxifeno
T ^{+/+} CtrlOE	murganhos TRAMP com o sistema indutível <i>tet-on</i> , não induzidos com doxiciclina
T ^{+/+} eDII4LOF	murganhos TRAMP com deleção endotelial de <i>Dll4</i>
T ^{+/+} eDII4OE	murganhos TRAMP com sobre-expressão endotelial de <i>Dll4</i>
TACE	“TNF-Alpha Converting Enzyme”
TAE	Tris-acetato-EDTA
Taq	Polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
Tet	“Tetracycline resistance protein”
tetO	operador do sistema Tet
Tie	“Tyrosine kinase receptor”
TM	“Notch TransMembranar domain”
TNF- <i>alfa</i>	“Transforming Necrotic Factor <i>alfa</i> ”

TRAMP	“TRansgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate”
Tween	“polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate”
VD	“Vas (ductus) Deferents”
VE-cadherin	“Vascular endothelial cadherin”
VEGF	“Vascular endothelial growth factor”
VEGFR	“Vascular endothelial growth factor receptor “
VP	“Ventral Prostate”
WD	“Well-Differentiated adenocarcinoma”

Capítulo I

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. Biologia Tumoral

O cancro é, atualmente, uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Tal como em outros países desenvolvidos, também em Portugal os cancros representam a segunda causa de morte, a seguir às doenças do aparelho circulatório (Nunes et al., 2010).

O cancro desenvolve-se como consequência da acumulação de mutações nos genes de uma célula, que se transmite à descendência, provocando uma desregulação na taxa de proliferação e morte celular, dando origem a um crescimento anormal das células do organismo (King, 1996, Lodish et al., 2001). Uma célula pode-se tornar cancerígena ou pelo menos iniciar essa transformação, através da inativação de oncogenes, síntese contínua de telomerasas ou indução de aneuploidia (Bergers and Benjamin, 2003). Além disso, podem também ocorrer mutações em genes supressores de tumores ou genes que promovem a estabilidade genética, como reguladores de apoptose e genes de reparação do ADN (Duesberg et al., 1999, Pelengaris et al., 2002, Hahn and Weinberg, 2002).

O crescimento tumoral ocorre através de três etapas distintas, hiperplasia, displasia e anaplasia. A fase hiperplásica caracteriza-se pela hiperproliferação celular de células que ainda mantêm uma morfologia normal. A fase displásica resulta no crescimento contínuo, acompanhado de alterações morfológicas nas células envolvidas. E por último, na fase anaplásica, as células tumorais têm um aspeto ainda mais anormal, atingindo um fenótipo cada vez mais invasivo (Bergers and Benjamin, 2003, Alberts et al., 1994).

Os tumores, ou neoplasias, podem ser classificados como benignos e malignos, consoante as suas características microscópicas e macroscópicas. Quando as células tumorais se mantêm agregadas, com fronteira bem definida para as células vizinhas saudáveis, as neoplasias são classificadas como benignas (figura 1a). Por outro lado, se

as células tumorais estão misturadas com as células normais, não existindo uma fronteira clara, estamos perante uma neoplasia maligna (figura 1b). Neste caso, as células neoplásicas que constituem o tumor primário têm tendência a invadir a corrente sanguínea e os vasos linfáticos, podendo ser transportadas para uma zona distante do organismo e dar origem a um tumor secundário, processo denominado por metastização. Apenas os tumores malignos são denominados cancro (Lodish et al., 2001, Ruddon, 2007, Plank and Sleeman, 2003).

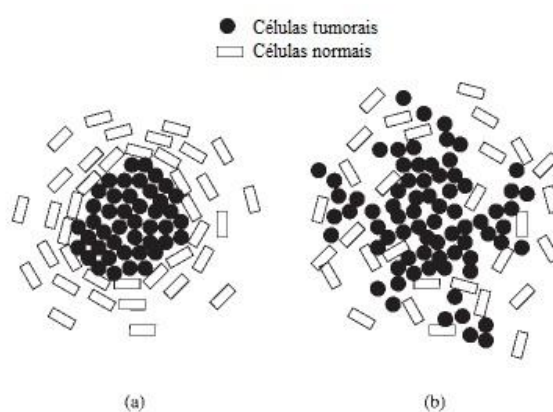


Figura 1. Diagrama esquemático de: a) tumor benigno, b) tumor maligno

(Adaptado de Plank and Sleeman, 2003).

Os cancros podem também serem classificados consoante o tipo de tecido que sofreu transformação neoplásica. A maior parte dos tumores são carcinomas desenvolvidos a partir das células epiteliais (células que cobrem a parte externa da superfície do corpo e revestem as cavidades internas). Os sarcomas desenvolvem-se a partir das células musculares ou conjuntivas e as leucemias são de origem hematopoiética. Adicionalmente, os tumores podem ser categorizados pela sua origem, sendo que cancros originados em tecidos diferentes, tendem a comportar-se de maneira muito diferente. Por exemplo, os tumores epiteliais podem ter aparência ou origem glandular, denominando-se os benignos de adenomas e os malignos de adenocarcinomas.

Na realidade, o cancro não pode ser encarado como uma doença, mas sim como uma classe de doenças com as características comuns de proliferação aumentada e invasão de tecidos circundantes (Alberts et al., 1994, King, 1996).

1.1. Vasculatura tumoral

Toda a vasculatura, tanto a tumoral como a dos tecidos normais, é composta por uma monocamada de células endoteliais, ou endotélio. Estas células são estruturas organizadas em mosaico à volta do lúmen central, no qual circula a corrente sanguínea, e encontram-se revestidas por uma membrana basal, que separa o endotélio do tecido circundante, e por células de suporte periendothelias (perícitos, no caso dos capilares e células de músculo liso, nos vasos maiores). Tanto os perícitos como as células do músculo liso, desempenham um papel importante na maturação e estabilização dos vasos sanguíneos, assim como no controlo da perfusão (Plank and Sleeman, 2003, Roy Bicknell et al., 1997).

A rede vascular nos tumores é composta por microvasos irregulares, dilatados e tortuosos. Pode apresentar regiões necróticas, razão pela qual não se podem classificar em arteríolas, vénulas ou capilares, como no caso dos vasos sanguíneos normais do organismo (McDonald and Baluk, 2002, Bergers and Benjamin, 2003). Estes vasos têm um revestimento endotelial parcial e uma membrana basal fragmentada, o que lhes confere uma elevada permeabilidade (Eichhorn et al., 2007).

Atualmente, são conhecidas duas estratégias para a formação dos vasos sanguíneos, tanto em tecidos normais como em tumores: a vasculogénese e a angiogénese. A vasculogénese ocorre tanto no desenvolvimento embrionário, como nos tumores (vasculogénese pós-natal). Nestes últimos, este processo ocorre através da mobilização de células progenitoras endoteliais com origem na medula óssea que se diferenciam em células endoteliais, sendo estas últimas transportadas para a corrente sanguínea de forma, a serem incorporadas nas paredes dos vasos sanguíneos em crescimento (figura 2a) (Yancopoulos et al., 2000). Conhecem-se alguns tumores dependentes principalmente deste processo, como é o caso do sarcoma de Ewing (Yu et al., 2010). A angiogénese envolve vários eventos morfológicos, como a ramificação, vasodilatação, permeabilidade celular, suporte periendothelial, proliferação, migração,

lumenização, sobrevivência, diferenciação e remodelação (figura 2b) (Carmeliet and Jain, 2000). Este processo ocorre no embrião em desenvolvimento e no adulto (neo-angiogénese) em situações de feridas, isquémia, funções reprodutoras femininas e em determinadas patologias, como o caso dos tumores (Oklu et al., 2010, Sainson and Harris, 2007, Sainson and Harris, 2008, Fraser and Lunn, 2000).

No caso dos tumores a angiogénese pode, alternativamente, ocorrer por divisão longitudinal de um vaso pré-existente, processo conhecido por intussusceção (figura 2c) (Papetti and Herman, 2002, Carmeliet and Jain, 2000, Hanahan and Weinberg, 2011, Carmeliet and Jain, 2011). A intussusceção angiogénica é um processo mais rápido e eficiente comparativamente com o processo de ramificação angiogénica em si, devido a este precisar apenas da reorganização das células endoteliais existentes e não depender da proliferação e migração endotelial (Burri et al., 2004). No entanto, além destes dois mecanismos, têm sido descobertas outras estratégias que permitem aos tumores tornarem-se vasculares, como o mimetismo vascular, no qual as células tumorais formam elas próprias os vasos sanguíneos, ou ainda a partir de células endoteliais que têm anomalias nos cromossomas que se diferenciam a partir de células estaminais tumorais (Carmeliet and Jain, 2011, Tortora et al., 2004).

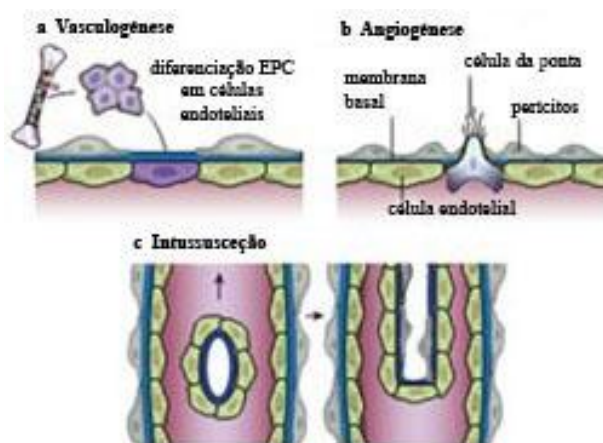


Figura 2. Processos de formação dos vasos sanguíneos

(Adaptado de Carmeliet and Jain, 2011).

De todos os processos referidos, os tumores induzem principalmente a neo-vascularização via ramificação angiogénica e por norma aumentam o número de vasos pelo processo de intussusceção (Burri et al., 2004). Além disso, a angiogénese tumoral é considerada uma das seis alterações fisiológicas essenciais no desenvolvimento do cancro (Hanahan and Weinberg, 2000, Hanahan and Weinberg, 2011).

2. Angiogénese tumoral

Como em todos os tecidos, os tumores dependem de um fornecimento adequado de oxigénio e nutrientes, e necessitam de remover eficazmente os produtos de excreção, para a sua sobrevivência. Assim, a capacidade do tumor aceder ao sistema vascular do organismo e formar uma vasculatura própria é essencial para a tumorigénese (Roy Bicknell et al., 1997, Bergers and Benjamin, 2003).

Inicialmente, os tumores são avasculares (hiperplásicos) e dependem do fenómeno de difusão passiva para a sua sobrevivência e crescimento (Plank and Sleeman, 2003). Quando atingem 0,5 mm de diâmetro, entram num estado de dormência. Este estado não significa que as células tumorais sejam incapazes de proliferar, mas sim que existe um balanço perfeito entre as células proliferativas e a taxa de apoptose. O estado de dormência pode durar vários anos e só alguns tumores passam para a fase vascular (neoplásica) (Roy Bicknell et al., 1997, Eichhorn et al., 2007, Plank and Sleeman, 2003). A fase vascular caracteriza-se pelo crescimento exponencial dos tumores, ou seja, quando estes crescem além de 1 – 2 mm (Folkman and Hanahan, 1991, Bergers and Benjamin, 2003).

A transição entre a fase avascular (hiperplasia) e a fase vascular (neoplasia) nos tumores, ocorre quando se dá o denominado “*angiogenic switch*”, ou seja, quando existe uma alteração no balanço entre os fatores de crescimento angiogénicos (fatores pró-angiogénicos) e os inibidores endógenos da angiogénese (fatores anti-angiogénicos) (Hanahan and Folkman, 1996, Plank and Sleeman, 2003). O “*angiogenic switch*” corresponde, assim, ao ponto de início da neo-vascularização tumoral, a partir do qual

ocorre o crescimento exponencial e progressão do tumor (Eichhorn et al., 2007, Folkman, 1990).

O mecanismo de ação de cada um dos fatores pró- e anti-angiogénicos é diferente, assim como a sua origem e os estímulos para a sua produção. Estes fatores podem ser provenientes das células tumorais e do microambiente do tumor, incluindo as células do estroma (células endoteliais, perícitos, células de músculo liso, fibroblastos, entre outras) e as células inflamatórias que infiltram os tumores (como macrófagos, linfócitos T e B, células dendríticas, entre outras) (Pelengaris et al., 2002, Plank and Sleeman, 2003, Coussens and Werb, 2001). Adicionalmente, as mudanças de expressão dos fatores angiogénicos pode dever-se à ativação de oncogenes ou deleção em genes supressores tumorais que controlam a produção destes reguladores ou ainda como resposta ao *stress* metabólico, que se pode apresentar na forma de hipoxia, hipoglicémia, formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), pH baixo ou deficiência de ferro (Bergers and Benjamin, 2003, Eichhorn et al., 2007, Pandya et al., 2006, Carmeliet and Jain, 2000).

2.1. Mecanismos da angiogénese

Os estádios iniciais da angiogénese tumoral são definidos por uma vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular dos capilares pré-existentes, em resposta ao estímulo angiogénico (Bergers and Benjamin, 2003). Isto permite o extravasamento de proteínas plasmáticas que estabelecem uma matriz provisória, no qual as células endoteliais são ativadas e iniciam o processo de migração em direção ao tumor (figura 3a). Simultaneamente, os perícitos separam-se da parede dos vasos, pela ação de Angiopietina-2 (Ang2), e libertam-se da membrana basal por degradação proteolítica (Carmeliet and Jain, 2011, Bergers and Benjamin, 2003).

Em seguida, as células endoteliais iniciam o processo de migração em direção ao tumor, ocorrendo a seleção de uma célula endotelial específica, denominada de célula da ponta (*tip cell*). Esta seleção ocorre na presença de alguns fatores como os recetores de VEGF e os ligandos da sinalização Notch (Delta-like 4 – Dll4 e Jagged1) (figura 3) (Carmeliet and Jain, 2011, Plank and Sleeman, 2003).

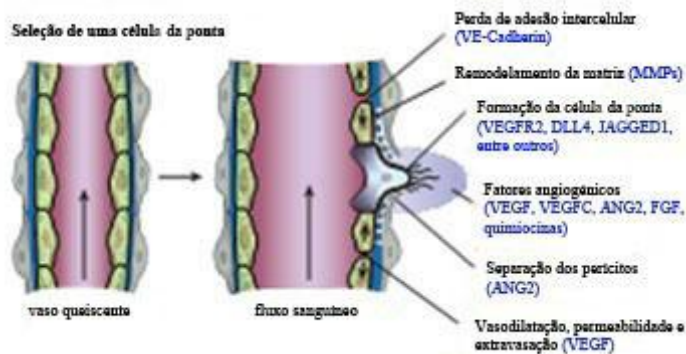


Figura 3. Mecanismo da angiogênese: seleção de uma célula da ponta

(Adaptado de Carmeliet and Jain, 2011).

O alongamento do novo vaso inicia-se através da proliferação e migração de células vizinhas das células da ponta, as células do tronco vascular (*stalk cells*), que são estimuladas pela via de sinalização Notch, entre outras (figura 4) (Carmeliet and Jain, 2011). As células da ponta desenvolvem filopódios que são orientados por sinais compostos por proteínas da família das efrinas, e as células do tronco vascular libertam moléculas que lhes permitem adquirir informação espacial acerca da posição das células vizinhas, permitindo a formação do novo broto vascular (Carmeliet and Jain, 2011, Herbert and Stainier, 2011). As células mielóides ajudam a fusão do novo vaso com os vasos já existentes (processo denominado de anastomose), permitindo o desenvolvimento do lúmen e iniciando o fluxo sanguíneo (Carmeliet and Jain, 2011). O subsequente contacto entre as células da ponta promove a paragem da migração destas e permite a formação de interações intercelulares altamente adesivas nos locais de contacto. Esta adesão é promovida por certas proteínas transmembranares, como a caderina endotelial vascular (VE-cadherin) e a molécula de adesão de células endoteliais de plaquetas do tipo 1 (Pecam-1) (Carmeliet and Jain, 2011).

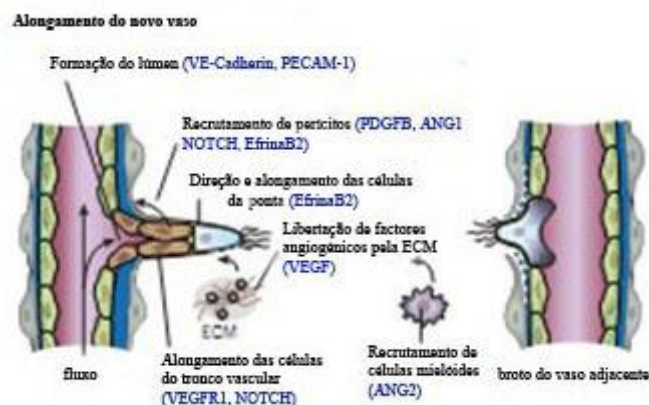


Figura 4. Mecanismo da angiogênese: alongamento do novo vaso

(Adaptado de Carmeliet and Jain, 2011).

Por fim, para um vaso se tornar funcional e o processo angiogênico terminar é necessário que ocorra a sua maturação e estabilização. Estes eventos são mediados por diversos sinais, como os do fator de crescimento derivado de plaquetas B (PDGFB), Angiopietina-1 (Ang1), efrinaB2 e Notch (Herbert and Stainier, 2011).

2.2. Reguladores da angiogênese tumoral

A maioria das moléculas envolvidas na capacidade de indução do crescimento de novos vasos sanguíneos pelos tumores, também regula a angiogênese fisiológica, sugerindo que a angiogênese tumoral resulta do desregulamento dos processos angiogênicos fisiológicos. Entre as vias de sinalização com influência no processo angiogênico, nomeadamente, no estabelecimento, maturação e estabilização da vasculatura, conhecem-se as vias VEGF, Angiopietinas, PDGF, Efrinas, Notch, entre outras (Rossant and Howard, 2002).

2.2.1. Sinalização VEGF

VEGFA frequentemente designado por VEGF, é um ligando que pertence à família VEGF, que codificam glicoproteínas homodiméricas. Para além do gene *VEGFA* a família VEGF é constituída também pelos genes *VEGFB*, *-C*, *-D* e pelo fator de crescimento placentário (*PlGF*) (Neufeld et al., 1999, Rossant and Howard, 2002).

VEGFA é considerado o principal regulador da angiogénese tumoral. A sua expressão encontra-se aumentada na maioria dos tumores humanos, sendo correlacionada com a densidade microvascular aumentada nestes e com um mau prognóstico, como foi inicialmente demonstrado em pacientes com cancro da mama (Ferrara, 1999, Toi et al., 1996). Analogamente aos processos fisiológicos, a produção deste fator nas neoplasias é predominantemente desencadeada pela hipoxia, através dos fatores de indução de hipoxia (HIFs), subunidade 1 e 2 *alpha* (Semenza, 2003). No entanto, existem outros determinantes da sua expressão como por exemplo, o PDGF (Pandya et al., 2006). VEGFA pode ser secretado pelas células tumorais, nomeadamente as do cancro da próstata, e por células mesenquimais do microambiente tumoral mas também por macrófagos (Li and Cozzi, 2010, Liang et al., 2006).

A capacidade de resposta endotelial para VEGFA é regulada pelas interações com os recetores transmembranares, com domínio de cinase de tirosina, VEGFR1 (ou *Flt1*) e VEGFR2 (ou *Flk1*), os quais, quando ativados fosforilam uma grande diversidade de proteínas que determinam a ativação de cascatas de sinalização a jusante (Veikkola et al., 2000, Neufeld et al., 1999). Ambos os recetores são expressos no endotélio, e no caso do VEGFR2, existem estudos que demonstram a sua expressão e possível função noutros tecidos, como o sistema nervoso central (Rossant and Howard, 2002)

Atualmente, sabe-se que o recetor VEGFR2 é o principal mediador da ação de VEGFA, estimulando diversas vias envolvidas na mitogénese, migração e sobrevivência das células endoteliais, além de promover a permeabilidade vascular (Ferrara et al., 2003, Risau and Flamme, 1995, Gale and Yancopoulos, 1999). Contrariamente, quando VEGFA se liga a VEGFR1, os efeitos do ligando são minimizados, uma vez que o recetor apesar de apresentar uma afinidade cerca de dez vezes superior para o ligando que VEGFR2, tem uma atividade de cinase de tirosina extremamente fraca (Waltenberger et al., 1994). Adicionalmente, é conhecido que o gene *VEGFR1* também pode ser transcrito numa forma solúvel da proteína, com alta afinidade para VEGFA, atuando como dissipador deste (Shibuya et al., 1990, Kendall and Thomas, 1993). Assim, VEGFR1 parece funcionar como um regulador negativo da angiogénese, ao sequestrar VEGFA impedindo-o de se ligar a VEGFR2 (Veikkola et al., 2000). Sabe-se também, que este recetor interage com os ligandos VEGFB e PlGF, sendo o único

recetor que se liga a este último fator de crescimento. Este facto revela a existência de uma competição na interação de VEGFR1 com PIGF e VEGFA, originando um aumento da quantidade de moléculas disponíveis de VEGFA que se podem ligar a VEGFR2 (Rossant and Howard, 2002, Oklu et al., 2010). PIGF através da ligação a VEGFR1 parece estar implicado na sinalização que modula a linhagem dos monócitos e uma vez que a expressão de *VEGFR1* também ocorre por macrófagos, este recetor tem um papel importante na estimulação da angiogénese de uma forma reduzida através destes fenómenos (Shibuya, 2006).

2.2.2. Sinalização Angiopietina/Tie

A via de sinalização Angiopietina/Tie desempenha um papel crítico no crescimento angiogénico, em particular na manutenção do equilíbrio entre um endotélio quiescente e um endotélio ativo em resposta à angiogénese, quer fisiológica quer patológica (Plank and Sleeman, 2003). As glicoproteínas solúveis *Ang1* e *Ang2* encontram-se sobre-expressos em diversos tumores humanos, como no cancro da próstata (Li and Cozzi, 2010).

Ang1 é secretada pelas células de suporte e estimula o crescimento tumoral através da sua ligação ao recetor transmembranar de cinase de tirosina *Tie2*, específico do endotélio, ativando a sua fosforilação e consequente cascata de sinalização (Currie et al., 2001, Karamysheva, 2008). Esta interação ligando-recetor promove a associação de perícitos ao endotélio, diminui a permeabilidade vascular, ao manter as interações que existem entre o endotélio e a membrana basal, promovendo assim a estabilidade e maturação dos vasos sanguíneos recém-formados (Carmeliet and Jain, 2011, Currie et al., 2001, Folkman, 1990). No entanto, este ligando inibe a extravasação das células tumorais e mantém a integridade dos vasos sanguíneos saudáveis dos tumores (Carmeliet and Jain, 2011, Currie et al., 2001). Estudos de perda-de-função de *Tie2* e *Ang1* demonstraram um fenótipo caracterizado por uma angiogénese defeituosa e uma diminuição do recrutamento das células perivasculares. Reciprocamente, a sobre-expressão de *Ang1* demonstrou estar associada a uma estabilização e expansão vascular, assim como, a uma permeabilidade vascular inferior (Armulik et al., 2005).

Relativamente à *Ang2*, expresso essencialmente nas células endoteliais, atua como um antagonista de *Ang1*, uma vez que tem a mesma afinidade para o recetor *Tie2*, provocando a inibição do fornecimento de células de suporte aos vasos e a perda de perícitos, ocorrendo assim a destabilização dos vasos (Maisonpierre et al., 1997).

2.2.3. Sinalização PDGF

A via de sinalização PDGFB/PDGFR β na angiogénese é crucial para a proliferação e migração de células do músculo liso e de perícitos durante a formação da parede vascular, sendo este um processo que requer interações recíprocas entre o endotélio e as células de suporte (Lindhahl and Betsholtz, 1998).

Dentro do tumor as células endoteliais, sobretudo as células da ponta, secretam PDGFB, e nalguns casos as próprias células tumorais também elas conseguem secretar este fator (Abramsson et al., 2003, Betsholtz et al., 2001). Assim, com o aumento dos níveis de expressão do fator de crescimento, gera-se um aumento do seu gradiente de concentração, que por sua vez estimula a expressão do recetor *PDGFR β* , pelas células do músculo liso e perícitos (Karamysheva, 2008, Battegay et al., 1994). Adicionalmente, sabe-se que PDGF é capaz de aumentar a expressão de *VEGF* e *VEGFR2* nas células endoteliais (Betsholtz et al., 2001).

Alguns estudos genéticos e farmacológicos desenvolvidos sugerem que os altos níveis de PDGF nos tumores podem ser pelo menos em parte, a razão pela qual existe uma disfunção aparente dos perícitos nos vasos tumorais (Abramsson et al., 2003).

2.2.4. Sinalização por efrinas

A família Eph é constituída por recetores transmembranares com domínio de cinase de tirosina, que interagem com os ligandos efrinas (Flanagan & Vanderhaeghen, 1998; Q. Xu & Wilkinson, 1997). A via das efrinas tem sido implicada em diversos processos biológicos, incluindo a angiogénese, segregação celular, adesão celular e mobilidade. Como se sabe, alguns destes processos não funcionam corretamente durante a tumorigénese e mestastização, sendo por isso esta via implicada em diversos

tipos de cânceros humanos, como o cancro da mama, dos pulmões, da próstata, entre outros (Surawska et al., 2004).

Os recetores Eph constituem a maior família de recetores de cinase de tirosina, que interagem com as proteínas transmembranares efrinas (Xu and Wilkinson, 1997). Wang e seus colaboradores descobriram que o ligando *efrinaB2* é expresso no endotélio das artérias e o seu recetor *EphB4* expresso no endotélio venoso, estão envolvidos na repulsão bidirecional entre células endoteliais arteriais e venosas (Wang et al., 1998). Adicionalmente, sabe-se que esta via de sinalização pode ser induzida pelas vias que estabelecem inicialmente a identidade arterial ou venosa dos precursores endoteliais, como a via de sinalização Notch e VEGF (Wang et al., 2010).

Recentemente, tem sido demonstrado que o recetor EphB4 é amplamente expresso nas células tumorais e a sua abundância tem sido correlacionada com a progressão tumoral, ao promover a angiogénese (Noren et al., 2004). Inversamente, quando se inibe a via efrinaB2/EphB4 com fármacos tem sido demonstrado que ocorre uma redução da densidade de vasos sanguíneos, do recrutamento de perícitos e da perfusão dos vasos, assim como um aumento da hipoxia, com um aumento associado da expressão de *VEGF* e *Dll4* (Scehnet et al., 2009, Djokovic et al., 2010). Djokovic e colaboradores provaram que a terapia combinada de efrinaB2/EphB4 com Dll4/Notch possui uma eficácia cumulativa na diminuição de tumores autóctones de murganhos, sem provocar efeitos secundários (Djokovic et al., 2010).

3. Via Notch

A via Notch é uma via de sinalização intercelular altamente conservada que regula diversos processos nos tecidos nos quais é expressa, tais como a modulação da diferenciação celular e destino celular, a proliferação, apoptose e sobrevivência (Artavanis-Tsakonas et al., 1999, Bray, 2006, Fiuza and Arias, 2007).

Assim como a via VEGF, muitos dos recetores Notch e seus ligandos são necessários no controlo da morfogénese vascular durante o desenvolvimento e

angiogénese tumoral, estando a sua sinalização implicada no controlo de múltiplos aspetos da especificação das células endoteliais.

3.1. Componentes moleculares da via Notch

Nos vertebrados, os recetores Notch (Notch 1-4) interatuam canonicamente com os ligandos *Delta-like* 1 (Dll1), *Delta-like* 3 (Dll3) e *Delta-like* 4 (Dll4), homólogos de Delta, e ainda Jagged-1 (Jag1) e Jagged-2 (Jag2), homólogos de Serrate (Gridley, 1997, Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Tanto os recetores como os ligandos Notch são expressos em diferentes combinações, na maioria, se não em todos, os tipos celulares (Li and von Boehmer, 2011).

Recetores e ligandos Notch são proteínas transmembranares, contendo um longo domínio extracelular, constituído por várias repetições do domínio semelhante ao fator de crescimento epidérmico (*EGF-like*). As duas famílias de ligandos Delta e Jagged diferem no facto destes últimos terem um maior número de repetições *EGF-like* e um domínio rico em cisteína próximo do domínio transmembranar (Fleming, 1998).

Os recetores Notch funcionam como recetores de membrana celular e como reguladores transcricionais no núcleo da célula. Estes são sintetizados como uma única proteína, a qual é proteoliticamente clivada no aparelho de Golgi por uma *secretase semelhante-a-furina*. Esta clivagem é designada por S1 e separa o domínio extracelular (NECD), do domínio transmembranar (TM) e do domínio intracelular (NICD), não sendo dependente da ligação a um ligando. O TM e o NICD ligam-se não covalentemente e formam um recetor heterodimérico, a principal forma detetada à superfície celular (figura 5) (Blaumueller et al., 1997).

A ativação da via de sinalização Notch ocorre através da interação entre os ligandos Notch, expressos à superfície de uma célula (célula sinalizadora) e os recetores Notch, expressos na superfície celular de uma célula vizinha (célula recetora), processo denominado de inibição lateral. Esta interação promove duas clivagens proteolíticas no recetor Notch, a primeira (S2) catalizada pela ação da desintegrina/metaloprotease TACE (enzima conversora de TNF-*alfa*, da família das metaloproteases ADAM), que liberta o NICD da membrana celular, e a segunda catalizada pelo complexo *gamma*-secretase, que liberta o NICD para o citosol. Subsequentemente, NICD é translocado

para o núcleo, onde interatua com o fator de transcrição CSL (CBF1 ou RBP-J_k em mamíferos, Su(H) em *Drosophila melanogaster* e LAG-1 em *Caenorhabditis elegans*), promovendo a transcrição de genes alvo, nomeadamente os genes *Hes* e *Hey*, da família de proteínas com domínios básicos hélice-ansa-hélice, entre outros (Thurston and Kitajewski, 2008).

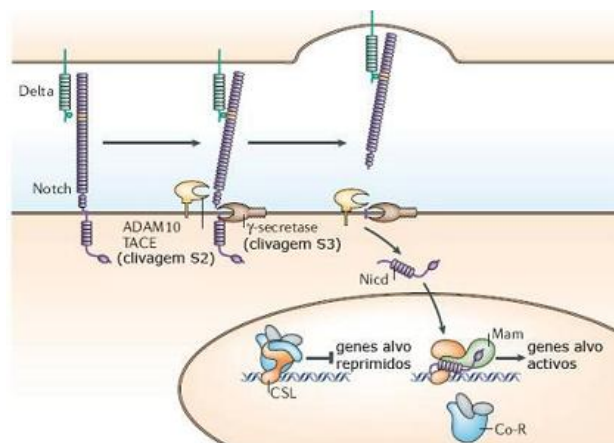


Figura 5. Mecanismos da sinalização Notch (Adaptado de Bray, 2006).

3.2. Sinalização Notch

Vários componentes da via Notch estão presentes na vasculatura, tanto no endotélio (Notch1 e 4, Jag1 e 2, Dll1 e 4, Hes1, Hey1 e 2), como nas células de músculo liso (Notch3) (Villa et al., 2001, Kume, 2009, Sainson and Harris, 2007). Além disso, *Jag1* também é expresso nas células de músculo liso que rodeiam as artérias, exercendo uma função na maturação destas (Liu et al., 2009, Kume, 2009, Sainson and Harris, 2007).

Estudos de perda de função de recetores, ligandos e genes alvo da via de sinalização Notch realizados em murganhos, permitiram demonstrar a importância desta via na remodelação vascular por meio da angiogénese, no desenvolvimento embrionário, e no processo angiogénico que ocorre nos tumores. Além disso, sabe-se que os ligandos Notch encontram-se envolvidos na angiogénese tumoral, uma vez que podem ser expressos pelo endotélio tumoral, pelas células tumorais ou ainda pelas células inflamatórias, sendo o mais notável desta classe o ligando Dll4 (Dufraine et al., 2008).

3.2.1. Sinalização Dll4/Notch

A expressão do gene *Dll4* ocorre especialmente no endotélio arterial (nas pequenas artérias e capilares) embora também seja detetada em células específicas em vários órgãos e tecidos, como o timo, a retina, o cérebro, o tubo neural e as células hematopoiéticas, o que demonstra o seu carácter pleiotrópico (Mailhos et al., 2001, Benedito and Duarte, 2005). Sabe-se também que a sua expressão ocorre durante a especificação arterial e na seleção das células da ponta durante a ramificação dos vasos (Hellstrom et al., 2007). No adulto, a expressão de *Dll4* é fraca, encontrando-se aumentada nos processos onde ocorre neo-angiogénese fisiológica e patológica (Patel et al., 2006).

Estudos de perda e ganho de função de *Dll4* confirmam o importante papel do ligando no desenvolvimento da identidade arterial e na regulação da angiogénese, apresentando um efeito estreitamente dependente dos níveis e da localização da sua expressão (Benedito et al., 2008, Krebs et al., 2004, Trindade et al., 2008). A dose de *Dll4* e a sua localização são críticos na formação adequada dos vasos sanguíneos, uma vez que o ganho- ou perda-de-função originam profundos defeitos vasculares (Trindade et al., 2008, Benedito et al., 2008, Duarte et al., 2004). Além disso, o efeito biológico de *Dll4* parece ser uma consequência da ativação da sinalização de Notch1 e Notch4, dado que os mutantes de perda-de-função apresentam semelhanças aos mutantes de perda-de-função de *Notch1* e *Notch4* (Iso et al., 2003).

Adicionalmente, estudos posteriores, em embriões de murganhos, peixes-zebra, bem como em retinas de murganho recém-nascido, têm clarificado a função de *Dll4* durante a morfogénese vascular. Nomeadamente, estes estudos demonstraram que *Dll4* é um regulador na especificação das células da ponta endoteliais e das células do tronco vascular durante a ramificação angiogénica (Suchting et al., 2007, Lobov et al., 2007). A indução de *Dll4* pelas células de ponta surge em resposta aos níveis elevados de VEGF, que por sua vez ativa a expressão de Notch nas células do tronco vascular adjacentes (Lobov et al., 2007, Siekmann and Lawson, 2007). Por exemplo, a perda de expressão de *Dll4* origina um aumento da ramificação e brotamento dos capilares, como resultado da formação excessiva de células da ponta e da proliferação endotelial (Suchting et al., 2007, Lobov et al., 2007, Hellstrom et al., 2007). Este facto, sugere a

função da via de sinalização Dll4/Notch como regulador da angiogênese a jusante de VEGF, ou seja, Dll4 parece atuar como fator anti-angiogénico, regulando negativamente fatores pró-angiogénicos e regulando positivamente fatores de maturação e estabilização vascular (Benedito et al., 2008, Dufraigne et al., 2008). No entanto, existem vários fatores que regulam positivamente a expressão de *Dll4*, para além de *VEGF*, nomeadamente, o fator de crescimento de fibroblastos básico (*bFGF*), *interleucina-6 (IL6)*, *HIF1 α* , entre outros (Sainson and Harris, 2007)

3.2.1.1. Sinalização Dll4/Notch na angiogénese tumoral

No homem, a expressão de *Dll4* foi analisada em tumores dos rins, bexiga, cólon, cérebro e da mama (Kuhnert et al., 2011, Mailhos et al., 2001). Estudos em humanos e murganhos têm demonstrado que *Dll4* é fortemente expresso nos vasos sanguíneos tumorais, comparativamente com os vasos normais adjacentes (Ridgway et al., 2006, Mailhos et al., 2001). Paralelamente, nestes estudos tem-se verificado que esta expressão é diretamente regulada pelos níveis de expressão de *VEGFA*. Ao bloquear a expressão de *Vegfa* em murganhos com tumores verifica-se uma rápida e profunda redução da expressão de *Dll4* pelos vasos sanguíneos tumorais. Inversamente, níveis altos de expressão de *Dll4* nos tumores estão associados a níveis elevados de expressão de *Vegfa* assim como, o estímulo de *VEGFA* em cultura de células endoteliais aumenta a expressão de *Dll4* (Noguera-Troise et al., 2006, Patel et al., 2005, Patel et al., 2006).

Recentemente, tem sido investigado o efeito da inibição da via de sinalização Dll4/Notch na angiogénese tumoral e no crescimento de tumores. Para tal, foram desenvolvidos anticorpos que neutralizam Dll4 e uma proteína de fusão solúvel que se liga aos recetores Notch e impede a ligação de Dll4 a estes (Noguera-Troise et al., 2006, Schemet et al., 2007). Surpreendentemente, verificou-se que o tratamento sistémico de murganhos com inibidores da via Dll4/Notch reduz significativamente o crescimento tumoral, com pouca ou nenhuma toxicidade sistémica. O bloqueio de Dll4 foi testado em várias linhas de células tumorais humanas e administrado subcutaneamente em murganhos, apresentando uma redução do crescimento do tumor de 50% a 90%, dependendo do modelo tumoral (Noguera-Troise et al., 2006, Schemet et al., 2007). Este crescimento reduzido foi associado a um aumento da densidade vascular nos tumores,

devido a um aumento do número de ramificações e da formação de pequenas intercomunicações entre os vasos. Contudo, esta vascularização é não-funcional, contendo vasos imaturos e desorganizados, a maioria não apresentando lúmen, nem recrutamento de perícitos (Ridgway et al., 2006, Betsholtz et al., 2001). Deste modo, os tumores apresentam-se mais hipóxicos e os seus vasos possuem uma fraca perfusão e elevada permeabilidade (Scehnet et al., 2007, Jubb et al., 2009). Este efeito é contrário ao que se verifica com o bloqueio de VEGF, que resulta numa diminuição do número de vasos (Noguera-Troise et al., 2006, Scehnet et al., 2007, Thurston et al., 2007). Embora a sinalização Dll4/Notch seja claramente induzida e regulada por VEGF, existem evidências que este ligando Notch possa ter funções na angiogénese independentes de VEGF (Thurston and Kitajewski, 2008).

Porém, apesar da evidência acumulada, é necessária a realização de mais estudos, de forma a verificar se existem efeitos adversos, principalmente a nível imunitário e hematopoiético, onde também se observa a expressão de *Dll4* (Suzuki et al., 2006, Fung et al., 2007). Além disso, é necessário saber se a terapia anti-Dll4 é mais eficaz quando combinada com quimioterapia, radioterapia ou outros fármacos anti-angiogénicos (Kerbel, 2008).

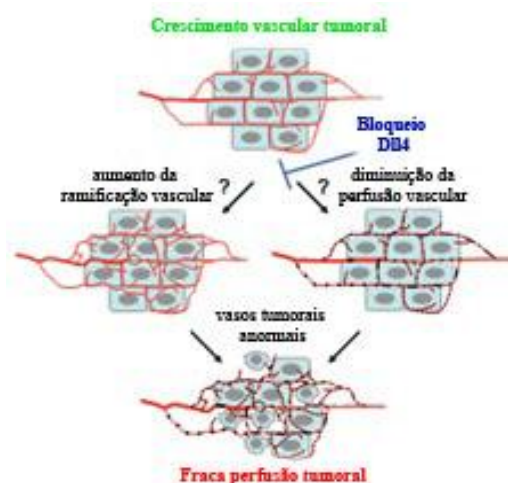


Figura 6. Efeito da inibição da sinalização Dll4/Notch na angiogénese tumoral

(Adaptado de Kuhnert et al., 2011)

4. Terapia anti-angiogénica tumoral

A área atual de pesquisa das terapias anti-angiogénicas teve início em 1971, quando Folkman propôs que o crescimento e progressão do tumor, até à formação de metástases seria um processo angiogénico-dependente e, portanto, o bloqueio da angiogénese poderia ser uma estratégia para deter o crescimento tumoral, nomeadamente, o cancro da próstata (Folkman, 1971, Li and Cozzi, 2010). A partir desse momento, deu-se início a vários estudos na procura de fatores pró- e anti-angiogénicos e à descoberta de vários reguladores angiogénicos, alguns dos quais foram usados como alvos terapêuticos.

Contrariamente às terapias convencionais, que destroem as células tumorais diretamente, a terapia anti-angiogénica é dirigida especificamente contra as células endoteliais microvasculares que foram recrutadas para a rede capilar tumoral (Li and Cozzi, 2010). Esta modalidade terapêutica pode ser realizada estimulando a produção de moléculas anti-angiogénicas que impeçam a degradação da membrana basal ou da matriz extracelular ou, bloqueando a ação de fatores pró-angiogénicos, tendo como objetivo características específicas ou anomalias dos vasos tumorais (Li and Cozzi, 2010). Desta forma, supôs-se que uma das vantagens existentes, comparativamente com a quimioterapia, seria o facto da estabilidade genética das células endoteliais a nível tumoral diminuir a probabilidade do desenvolvimento de resistências (Li and Cozzi, 2010). Neste sentido, a terapia anti-angiogénica é um adjuvante promissor para as terapias convencionais que poderá ajudar a superar as suas limitações atuais e a melhorar os seus efeitos anti-tumorais (Li and Cozzi, 2010). Adicionalmente, algumas teorias sugerem que este tipo de terapia poderá melhorar os efeitos da quimioterapia ao provocar a “normalização da vasculatura do tumor” (Kerbel, 2008). Contudo, o mecanismo exato pelo qual a inibição da angiogénese melhora os resultados clínicos ainda não é totalmente conhecido (Li and Cozzi, 2010).

Nos últimos anos, já foram aprovados vários fármacos anti-angiogénicos para uso clínico (Kerbel, 2008, Folkman, 2007). Por exemplo, em Fevereiro de 2004 foi aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*), o fármaco Avastin[®], cujo princípio ativo é denominado bevacizumab, um anticorpo monoclonal anti-VEGFA. Este medicamento determina um ligeiro aumento da esperança de vida em casos de

cancro colo-rectal, quando associado com quimioterapia. Contudo, este fármaco demonstrou não ser eficaz em todos os tipos tumorais e, nalguns casos, foi inclusivamente observada o desenvolvimento de resistência ao fármaco (Casanovas et al., 2005, Jain et al., 2006, Kerbel, 2008, Folkman, 2007). Pensa-se que esta resistência resulta do recrutamento adicional de outras vias de sinalização angiogénicas para além da via VEGFA. Assim, é de importância clínica desenvolver terapias anti-angiogénicas alternativas, em distintas vias de sinalização de forma a sinergirem com o bloqueio de VEGF (Yan and Plowman, 2007). As terapias combinatórias poderão ser mais eficazes e possivelmente permitirem a utilização de doses mais baixas, de forma a diminuir a toxicidade.

A via Notch regula negativamente a sinalização VEGF na angiogénese fisiológica e patológica, aparentando ser um alvo promissor na terapia anti-angiogénica, em particular, o ligando Dll4 (Kuhnert et al., 2011). Alguns estudos têm revelado que a inibição de Dll4 é capaz de reduzir o crescimento de tumores que são resistentes a terapias que bloqueiem VEGF. O bloqueio simultâneo de Dll4 e VEGF demonstrou efeitos anti-tumorais mais fortes do que os que se observaram ao se bloquear apenas uma das vias de sinalizações (Thurston et al., 2007).

5. Modelos tumorais em murganhos

O cancro da próstata não ocorre naturalmente em murganhos (*Mus musculus*). Nas últimas décadas, numerosos modelos animais do cancro da próstata têm sido desenvolvidos, estudados e caracterizados (Valkenburg and Williams, 2011). Existem algumas diferenças anatómicas entre a próstata humana e a murina, as quais têm um impacto em determinados aspetos da análise patológica em modelos de murganhos, e das questões da aplicação clínico-patológicas destes no cancro da próstata (Harmelin et al., 2005). Em particular, os murganhos possuem uma próstata dividida em lobos distintos (próstata anterior, próstata dorso-lateral e próstata ventral), separados uns dos outros por tecido conjuntivo adiposo e fibroso. Contrariamente, nos humanos a próstata é uma estrutura lobular única (Harmelin et al., 2005, Abate-Shen and Shen, 2002). No

entanto, a próstata das duas espécies possui certas semelhanças no que se refere aos mecanismos moleculares subjacentes à progressão da doença em murinos e humanos. Deste modo, a utilização de modelos murinos em investigação, permite compreender melhor as principais alterações moleculares que acompanham o desenvolvimento e progressão do cancro da próstata (Abate-Shen and Shen, 2002).

Apesar das diversas preocupações existentes, o murganho de laboratório é um dos melhores sistemas de modelo para investigações *in vivo* na área do cancro. O uso de um organismo de pequeno tamanho e propensão a reproduzir-se em cativeiro, período de gestação e ciclo de vida curtos, diversas semelhanças fisiológicas e moleculares com os seres humanos (cerca de 99% dos genes humanos têm um homólogo no genoma do murganho e 40% destes podem ser alinhados com o genoma do murganho) e um genoma completamente sequenciado, providencia um meio de analisar várias características de doenças humanas (Frese and Tuveson, 2007). Com efeito, modelos de doenças humanas em murganhos de laboratório permitem o desenvolvimento e teste de novas terapêuticas, a identificação de novos marcadores de diagnóstico, novos alvos terapêuticos e a melhoria do conhecimento da biologia *in vivo* e da genética de iniciação, progressão e metastização tumorais.

5.1. Modelo transgénico TRAMP

A linha TRAMP (*TRansgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate*), é um modelo tumoral geneticamente manipulado que desenvolve adenocarcinoma da próstata (Greenberg et al., 1995, Greenberg et al., 1994). Este tipo de modelo autóctone tem como vantagem o crescimento ortotópico dos tumores da próstata no hospedeiro, dentro de um microambiente apropriado, a histologia do tumor e a sua progressão até à formação de metástases, poderem ser monitorizados durante um período de tempo relativamente longo, simulando adequadamente o desenvolvimento de tumores equivalentes em humanos (Teicher, 2006, Kaplan-Lefko et al., 2003). As desvantagens prendem-se com o custo de manter e monitorizar os animais durante o período de desenvolvimento do tumor e, com o facto de ser completamente murino (Teicher, 2006)

O modelo transgénico TRAMP representa uma classe de modelos baseados em elementos regulatórios de genes expressos especificamente ou preferencialmente nas

células epiteliais colunares diferenciadas (Huss et al., 2001). O modelo transgênico foi gerado tendo como base a estirpe consanguínea C57BL/6, por microinjeção de um vetor contendo um elemento regulador – Probosina de rato (PB) que direciona a expressão do transgene SV40 (antígenos T e t; Tag), no epitélio prostático. A estratégia para a construção deste vetor foi concebida para bloquear a expressão de p53 e Rb (genes supressores de tumor) pelo antígeno T e inibir a função da proteína fosfatase 2A (PP2A – implicada numa série de mecanismos celulares) pelo antígeno t (Huss et al., 2001). O transgene é hormonalmente regulado por androgénios, permitindo que a sua expressão temporalmente se correlacione com a maturidade sexual (Kaplan-Lefko et al., 2003, Greenberg et al., 1995, Greenberg et al., 1994). Como consequência da expressão do transgene, os murganhos TRAMP desenvolvem lesões neoplásicas intraepiteliais (PIN), entre as 6 e as 12 semanas de idade, progredindo para adenocarcinoma bem diferenciado (WD), entre as 12 e as 16 semanas, adenocarcinoma displásico, entre as 18 e as 24 semanas de idade, e culminando com a formação de metástases por volta das 30 semanas, primeiramente nos linfonodos pélvicos e para nos pulmões e com menos frequência nos ossos, rins e glândula adrenal (Gingrich and Greenberg, 1996, Greenberg et al., 1995, Kaplan-Lefko et al., 2003, Huss et al., 2001).

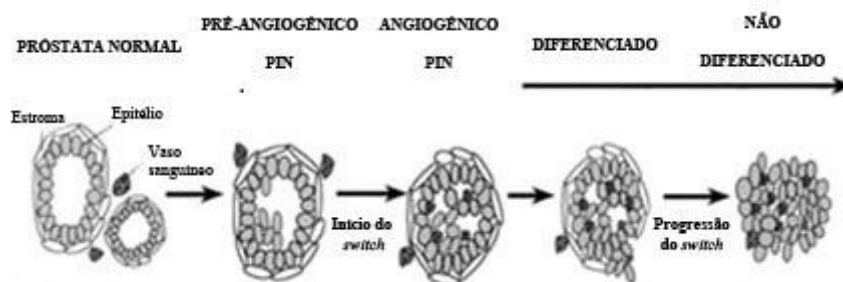


Figura 7. Fases do desenvolvimento do cancro da Próstata em modelos TRAMP

(Adaptado de Huss et al., 2001).

O padrão de restrição temporal e espacial de progressão do cancro da próstata nos murganhos TRAMP, permite uma oportunidade para a investigação dos primeiros eventos moleculares da doença (Huss et al., 2001). Em particular, este modelo de murganho pode apresentar vantagens significativas em estudos sobre os mecanismos

moleculares da carcinogénese da próstata, incluindo estudos de função génica baseados no ganho-de-função e perda-de-função de um determinado gene (Harmelin et al., 2005).

Capítulo II

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais experimentais

Os murganhos heterozigóticos TRAMP com fundo genético C57BL/6, obtidos através do Dr. N. M. Greenberg (Clinical Research Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA), foram cruzados com os modelos de ganho- ou de perda-de-função endotelial de *Dll4* (Tie2-rtTA TetO7-Dll4 ou *Dll4*^{+/-} VE-cadherin-Cre-ER^{T2}, respetivamente), disponíveis no laboratório do Prof. António Duarte (FMV). Os animais nascidos foram genotipados (secção seguinte) e os machos e fêmeas TRAMP^{+/-} Tie2-rtTA TetO7-Dll4 ou TRAMP^{+/-} *Dll4*^{+/-} VE-cadherin-Cre-ER^{T2} foram cruzados individualmente, com murganhos C57BL/6. Determinou-se se o progenitor seria homozigótico ou heterozigótico para TRAMP e, após se obterem um macho e uma fêmea TRAMP^{+/-} Tie2-rtTA TetO7-Dll4 ou TRAMP^{+/-} *Dll4*^{+/-} VE-cadherin-Cre-ER^{T2}, efetuaram-se cruzamentos destes animais, para produção de animais de experiência.

Os mutantes TRAMP^{+/-} Tie2-rtTA⁺ TetO7-Dll4⁺ (T^{+/-} eDll4OE) desenvolvem adenocarcinoma da próstata com sobre-expressão de *Dll4*, através do promotor endotelial Tie2-rtTA, com administração de um análogo de tetraciclina (doxiciclina - 2mg/mL na água com 2,5% sacarose) (Trindade et al., 2008). A administração foi feita à 8ª semana de idade dos murganhos para a experiência das 18 semanas, e à 12ª semana, para a experiência das 24 semanas de idade. Os animais controlo, murganhos TRAMP^{+/-} Tie2-rtTA⁺ TetO7-Dll4⁺ (T^{+/-} eDll4LOF), não tiveram administração de doxiciclina durante o período experimental.

Por sua vez, os murganhos TRAMP^{+/-} *Dll4*^{+/-} VE-cadherin-Cre⁺ (T^{+/-} eDll4LOF) desenvolvem adenocarcinoma da próstata com perda-de-função endotelial de *Dll4* induzível por tamoxifeno, sob o controlo do promotor endotelial VE-cad (Anexo I – 1.2.) (Koch et al., 2008). O tratamento com tamoxifeno (50mg/Kg de peso vivo) foi feito a partir da 8ª semana de idade dos murganhos, uma vez por dia à mesma hora durante 5 dias. No caso dos murganhos TRAMP^{+/-} *Dll4*^{+/-} VE-cadherin-Cre⁻ (T^{+/-} CtrlLOF), em vez de tamoxifeno foi administrado PBS, durante o mesmo período,

constituindo assim o grupo controlo nesta experiência. A preparação do tamoxifeno e PBS encontram-se descritas no Anexo I – 1.1 e 1.2.

Todos os animais usados foram mantidos individualmente no biotério da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, em gaiolas de propileno ventilado com cama de carolo de milho, numa sala ventilada com controlo de temperatura (22°C-25°C), humidade (50-55%) e ciclo de luz (12/12h). Os murganhos foram alimentados com dieta padrão de laboratório e água *ad libitum*. Todas as experiências realizadas foram aprovadas pelo Comité de Ética e Bem-estar Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e a monitorização dos animais foi regularmente feita, de acordo com as exigências da FELASA.

1.1. Extração do ADN genómico

Os animais nascidos permaneceram com as progenitoras até a altura do desmame, que ocorreu entre a 3^a e a 4^a semana de idade. Nessa altura, foi cortada a cada um dos murganhos uma porção terminal da cauda com cerca de 3mm para extração de ADN genómico. Esta região é boa para fazer recolha de biópsias devido ao seu tamanho e acessibilidade. A digestão das caudas foi feita durante a noite com 20µL de proteinase K (20mg/mL) (NZYTECH, MB01902) e 730µL de tampão *Tail Buffer*, numa estufa a 55°C. No dia seguinte, adicionou-se 250µL de 5M NaCl (Sigma-Aldrich, S3014), homogeneizou-se e centrifugaram-se as amostras, durante 20min a 13000rpm (Centrífuga Eppendorf, Centrifuge 5415D). Retirou-se 800µL de sobrenadante para um novo tubo com 750µL de isopropanol (VWR, 1.09634.2500) e homogeneizou-se suavemente, para que ocorresse precipitação do ADN. As amostras foram centrifugadas, durante 10min a 13200rpm e rejeitou-se o sobrenadante. De seguida, adicionou-se 500µL de etanol a 70% (VWR, 1.009983.1011), para a lavagem do sedimento e centrifugou-se de novo, durante 5min a 13200rpm. O sobrenadante foi novamente rejeitado e colocou-se o *pellet* a secar à temperatura ambiente, durante 10min. Quando seco, ressuspendeu-se o *pellet* em 250µL de tampão TE e guardaram-se as amostras a -20°C. A descrição da preparação das soluções de *Tail Buffer* e TE encontra-se no Anexo I – 1.3 e 1.4.

1.2. Genotipagem por PCR

A triagem dos murganhos mutantes foi feita através da sua genotipagem através de um protocolo de reação em cadeia da polimerase (PCR).

As reações de PCR foram realizadas criando misturas de reação preparadas em gelo, com oligonucleótidos iniciadores (Thermo Scientific), dNTPs (Frlabo, 110002), MgCl₂ (Promega, 1007078), polimerase Taq (Promega, 1006688), tampão comercial (Promega, 1006890), ADN genómico ressuspendido em TE e água esterilizada e desionizada (SDW) (Calbiochem, 693520), até perfazer o volume final. Todas as reações foram efetuadas segundo o número de amostras a amplificar, mais o controlo positivo e o controlo (-), no qual foi utilizado água SDW em vez de ADN genómico.

Posteriormente, estas foram colocadas num termociclador (VWR, 732-1200) e após o término da reação, o produto de amplificação foi observado em eletroforese a 90mA num gel de agarose (VWR, FMCB500040500) a 2%, em TAE 1x com GreenSafe (NZYTECH, MB08801) (2,5µL/100mL). De forma a saber os pesos moleculares dos produtos de PCR utilizou-se 5µL de uma solução de marcadores (1 Kb Plus DNA Ladder - Invitrogen, 10787). Em seguida, o resultado da eletroforese foi observado e fotografado utilizando um transiluminador UV (GE Healthcare).

A preparação do tampão TAE 1x encontra-se descrita no Anexo I – 1.5.) e as preparações das misturas de PCR, sequências de oligonucleótidos, peso molecular dos produtos de PCR e programas de termociclador estão descritas no Anexo II - 1.

2. Recolha e fixação dos tumores prostáticos

2.1. Recolha da próstata dos murganhos

Quatro murganhos machos de cada um dos grupos experimentais e controlos, foram humanamente sacrificados por deslocamento cervical às 18 e 24 semanas de idade. Recolheu-se a próstata dos murganhos (regiões da próstata anterior, lateral, dorsal e ventral – figura 8), sendo o tecido recolhido dividido em 2 partes iguais, uma das metades foi utilizada para análise do peso da próstata no término da experiência e

para análises histológicas (através da coloração de hematoxilina-eosina e imunofluorescência indireta), e a outra metade foi usada para analisar a expressão gênica.

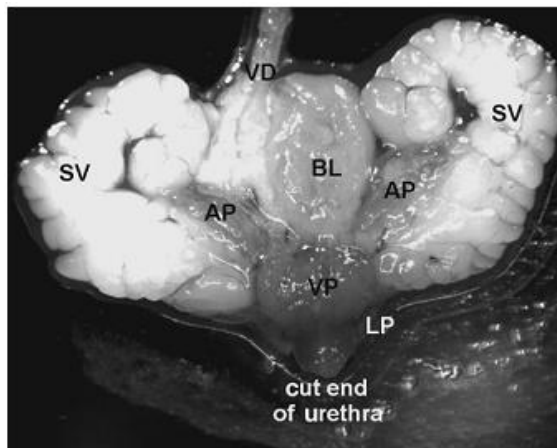


Figura 8. Trato urogenital de um murganho adulto masculino. Abreviações: AP, próstata anterior; BL, bexiga; LP, próstata lateral; SV, vesículas seminais; VD, canal deferente; VP, próstata ventral (Hurwitz et al., 2001).

Outros oito animais de cada um dos grupos experimentais e controlos, foram anestesiados por via intraperitoneal, utilizando uma agulha de 26Gx $\frac{1}{2}$ "², 0,45x12mm acoplada a uma seringa de insulina (de 1mL), com 500 μ L de Avertin[®] (Sigma-Aldrich, T4840-2) (princípio ativo: 2-2-2 tribromoetanol) a 2,5% em PBS estéril (Anexo I – 1.6). Em seguida, em quatro dos animais referidos anteriormente, injetou-se na veia da cauda, com uma agulha de 30Gx $\frac{1}{2}$ "², 0,3x13mm (BD Microlance[™] 3, 304000) acoplada a uma seringa de insulina (de 1mL), 100 μ L de lectina biotinilada (*lectin biotinylated from Lycopersicon esculentum*, Sigma-Aldrich, L0651), um indicador da perfusão vascular (100 μ g de lectina em 100 μ L de PBS). Nos restantes quatro animais, injetou-se 200 μ L do corante Azul de Evans (Sigma, E2129-10G) a 1%, indicador da extravasação vascular. Esperou-se 5min para permitir a circulação tanto da lectina biotinilada como do Azul de Evans nos murganhos. De seguida, os animais foram sacrificados e procedeu-se à recolha, processamento e criosecção de blocos de gelatina da próstata dos murganhos, como descrito anteriormente, para posteriores análises.

2.2. Processamento dos tecidos

Todas as amostras usadas para análise do peso da próstata e análise histológica foram fixadas numa solução de 4% de paraformaldeído (Sigma-Aldrich, P6148) e 4% de sacarose (Sigma-Aldrich, S0389) em PBS, durante 1h a 4°C. De seguida, cada amostra foi transferida para uma solução de sacarose a 15% em PBS, onde permaneceram durante a noite a incubar a 4°C com agitação, de modo a ficarem desidratadas.

No dia seguinte, pesaram-se cada uma das próstatas recolhidas e multiplicou-se por 2, de modo a obter o peso total da próstata de cada um dos murganhos. Preparou-se gelatina a 7,5% (*Gelatin from porcine skin, Type A*, Sigma-Aldrich, G2500) com sacarose a 15% em PBS e fez-se um bloco de gelatina para cada tecido. O bloco de gelatina serve como uma matriz de suporte estrutural ao tecido, durante a congelação e facilita o processo de corte, ao criar uma superfície geométrica. Posteriormente, cada bloco foi congelado em isopentano (Sigma-Aldrich, 1.06056.1000) a -80°C e armazenado a esta temperatura, até ser cortado em crióstato.

2.3. Criosecção dos blocos de gelatina das próstatas dos murganhos

As amostras incluídas nos blocos de gelatina congeladas foram criosecionadas transversalmente num crióstato Leica CM3050S a -30°C. A espessura de secção foi de 20µm, tendo sido os cortes transferidos para lâminas adesivas *super-frost plus*, de modo a obterem-se 3 lâminas gêmeas, com 10 criosecções por lâmina. As criosecções têm de secar durante 30min à temperatura ambiente antes de serem guardadas a -20°C em caixa de armazenamento.

3. Análise histológica

3.1. Coloração Hematoxilina-Eosina (H&E)

Descongelou-se uma das lâminas gêmeas com as criosecções de cada murganho (referidas na secção 2.3) à temperatura ambiente (30min) e desgelatinou-se em PBS a

37°C (15min). Fizeram-se duas lavagens em PBS de 5min cada, seguidas de uma em água destilada de 2min. Mergulhou-se as lâminas em hematoxilina (Sigma-Aldrich, GHS1128) durante 10min. Em seguida, lavou-se com água corrente, com água destilada e com etanol a 70% durante 3min. Depois, mergulhou-se em eosina (Sigma-Aldrich, HT110180), durante 5min e posteriormente, lavou-se com água corrente e subsequentemente com água destilada. Em seguida, as lâminas foram colocadas sucessivamente em etanol a 70%, etanol a 85%, etanol a 95%, etanol a 100% e xilol (Panreac, 131769.1612) (2min em cada uma solução). Deixou-se secar e montou-se as lâminas com Microscopy Entellan[®] Neu (VWR, 1.07961.0500).

3.2. Imunofluorescência indireta

Duas das lâminas gêmeas com as crioseções de próstata de cada murganho foram descongeladas à temperatura ambiente, durante 30 min, e colocadas a desgelatinar num frasco Coplin com PBS, em banho-maria a 37°C, durante 15min. Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS, durante 5min. Após esse tempo as lâminas foram colocadas em metanol (VWR, 1.06009.2511) com 3% de peróxido de hidrogénio (VWR, 1.07298.0250) durante 30min à temperatura ambiente para inibir a ação das peroxidases endógenas. Depois fez-se de novo duas lavagens em PBS de 5min cada, seguidas de duas lavagens em PBS com Triton[®]X-100 (*polyethylene glycol tert-octylphenylether*, Fluka, 93426) a 0,1% de 10min cada. As lâminas foram então colocadas numa câmara húmida e adicionou-se a cada uma 200µL de solução de bloqueio, constituída por 2% de albumina sérica bovina e 5% de soro de cabra (Sigma-Aldrich, G9023) em PBS com Tween[®] 20 (Sigma-Aldrich, P9416) a 0,1% e deixou-se actuar durante 1h, à temperatura ambiente. De seguida, escoadou-se a solução de bloqueio das lâminas e adicionou-se 100µL do anticorpo primário diluído em solução de bloqueio, sendo este valor de diluição específico para cada anticorpo [anti-PECAM-1, *Rat monoclonal anti-body to CD31* (BD Pharmigen, 557355) – 1:100, que se liga às células endoteliais; anti-SMA, *Monoclonal anti-α-Smooth muscle actin Cy3 conjugate* (Sigma-Aldrich, C6198) – 1:300, que marca células de suporte dos vasos]. Cobriram-se as lâminas com lamelas e incubaram-se durante a noite a 4°C na câmara húmida.

No dia seguinte, fez-se cinco lavagens em PBS com Tween a 0,1% de 10min cada, e colocou-se em cada lâmina 100 μ L de anticorpo secundário específico para a espécie em que o anticorpo primário correspondente foi produzido, diluído em solução de bloqueio [*goat anti-rat IgG Alexa Fluor*[®] 488 (Molecular Probes, A-11006) – 1:300, para o anti-PECAM-1 (emitindo fluorescência verde) ou *goat anti-rat IgG Alexa Fluor*[®] 555 (Molecular Probes, A-21115) – 1:300, para o anti-PECAM-1 (emitindo fluorescência vermelha) quando utilizado o *streptavidin Alexa Fluor*[®] 488 *conjugate* (Invitrogen, S-32354) – 1:200, que se liga à biotina e assim à lectina (emitindo fluorescência verde)] e incubou-se durante 1h, à temperatura ambiente no escuro. De seguida, fez-se três lavagens em PBS de 10min cada. Depois fez-se uma incubação com DAPI (4,6-diamino-2-fenil indol) a 0,15% em PBS durante 3min. Procedeu-se então a duas lavagens em PBS de 10min cada e por fim escorreu-se as lâminas uma a uma e distribui-se 90 μ L de Mowiol e cobriu-se com lamela de modo a não ficarem bolhas. As lâminas foram armazenadas a 4°C, na câmara húmida, protegidas da luz. A preparação da solução de DAPI e Mowiol encontram-se descritas no Anexo I – 1.7 e 1.8.

3.3. Microscopia

As criosecções de hematoxilina e eosina foram fotografadas com uma câmara Olympus C-4040 acoplada a um microscópio Olympus CX40, numa ampliação de 20x. As imagens de fluorescência em secções foram captadas no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, por uma câmara digital Leica DM340FX acoplada a um microscópio de fluorescência Leica DMR, numa ampliação de 20x. Todas as imagens foram processadas no programa Adobe Photoshop CS5, para posterior análise no programa Image J 1.37v (NIH, EUA).

A quantificação da densidade vascular foi medida através da percentagem das secções de cada amostra com sinal positivo para PECAM (percentagem de pixéis brancos por campo após transformar as imagens RGB em documentos binários). Para a medição da maturidade vascular quantificou-se a percentagem de estruturas das secções de cada amostra com sinal positivo para PECAM e para α SMA. Em relação à perfusão vascular esta foi quantificada determinando a percentagem de estruturas das secções de cada amostra com sinal positivo para PECAM e para estreptavidina ligada à lectina

biotinilada. Por último, para se medir a extravasação quantificou-se a percentagem de estruturas das secções de cada amostra com sinal positivo para PECAM e para Evans Blue.

4. Análise da expressão genética

4.1. Processamento dos tecidos

A outra metade de tecido de cada um dos murganhos referida anteriormente, secção III - 2.1., foi congelada em azoto líquido e guardada a -80°C , para posterior extração de ARN e realização de PCR em tempo real.

4.2. Extração de ARN

A extração de ARN foi feita através da utilização do mini *kit RNeasy*[®] (Quiagen, 50974104) e fazendo-se sempre extração de duas amostras em paralelo segundo as instruções do fabricante. No fim do protocolo o ARN foi eluído em 30 μl de água bidestilada, fornecida no *kit* comercial, e congelado a -80°C até ser usado.

A quantificação do ARN extraído realizou-se num espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific, Nanodrop 2000 Spectrophotometer) adicionando-se apenas 1 μl de amostra para obter a quantificação e qualificação do ARN. Esta quantificação é feita através da medição do rácio de absorção a 260nm e 280nm, que deve ser superior a 1,8 em amostras de ARN puro, como foi o caso observado em todas as amostras testadas.

4.3. Transcrição reversa

Para produzir ADNc recorreu-se a uma reação de transcrição reversa, usando o *kit SuperScript*[®] III *First-strand synthesis supermix for qRT-PCR* (Alfagene, SKU# 11752-052). A quantidade de ARN total usada de cada amostra foi de 400ng. Este *kit* contém a enzima transcriptase reversa, uma enzima inibidora de ARNases (*Escherichia coli RNase H*), oligonucleótidos oligo(dT)₂₀ e oligonucleótidos hexâmeros aleatórios

como iniciadores de reação e o respetivo tampão. As reações foram executadas seguindo as instruções do fabricante.

4.4. PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real semi-quantitativo foram realizadas com o *kit Power SYBR Green PCR Master Mix*[®] (Applied Biosystems[®], 4368706), segundo as instruções do fabricante. O *SYBR Green* é um agente intercalador, fluorescente quando ligado à dupla cadeia de ADN (Morrison et al., 1998). As condições de amplificação usadas foram iguais em todas as reações (as sequências oligonucleotídicas foram escolhidas de forma a terem a mesma temperatura de hibridação) e usou-se uma quantidade mínima de oligonucleótidos iniciadores de forma a evitar a formação de dímeros e amplificações inespecíficas.

Os genes testados foram *Dll4*, *efrinaB2*, *PDGFR-β*, *VEGFR1 e 2*, *VEGFA*, *PECAM*, *Tie2* e *Hey2*, tendo sido feitos triplicados de cada um destes testes. Em todas as reações usou-se o gene *β-Actina* como controlo interno de expressão e avaliou-se a presença de mais do que um produto de amplificação em solução, indicando inespecificidade da reação. Utilizou-se o termociclador em tempo real da *Applied Biosystems StepOne* e o programa de análise de resultados *StepOne Software v2.2.2*.

A preparação das misturas de PCR em tempo real, dos cADNs e controlos negativos, das sequências de oligonucleótidos e o programa de termociclador estão descritas no Anexo II - 2.

A reação de amplificação de ADN é acompanhada, medindo a fluorescência ao fim do passo de extensão. Para cada amostra obtém-se um valor de *cycle threshold* (C_T), que corresponde ao início da fase exponencial da emissão de fluorescência, sendo inversamente proporcional à quantidade de ADN deste gene, presente na amostra. Os resultados apresentados representam a média das reações em que se formou apenas um produto de amplificação.

5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada nos programas Microsoft Office EXCEL 2007 e SPSS v.17.0 (Statistical Package for the Social Sciences, version 17.0). Neste último programa usou-se o teste Mann-Whitney-Wilcoxon para se calcular a média \pm erro padrão e o nível de significância (p). Considerou-se um $p < 0,05$ significativo (indicado nos gráficos com *), $p < 0,01$ muito significativo (indicado nos gráficos com **) e $p < 0,001$ extremamente significativo (***)

Capítulo III

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Análise fenotípica de tumores prostáticos em mutantes com ganho-de-função endotelial de *Dll4*

Os murganhos TRAMP com ganho-de-função de *Dll4* foram produzidos a partir do cruzamento da linha transgênica TRAMP com murganhos que possuem os transgenes Tie2-rtTA e TetO7-Dll4. A sobre-expressão de *Dll4* foi induzida nos murganhos TRAMP^{+/+} Tie2-rtTA⁺ TetO7-Dll4⁺ (T^{+/+} eDll4OE) às 8 e às 12 semanas de idade, que corresponde a uma fase precoce e tardia, respetivamente, do desenvolvimento tumoral. Nos animais TRAMP^{+/+} Tie2-rtTA⁺ TetO7-Dll4⁻ (T^{+/+} CtrlOE) foi administrada doxiciclina, tendo estes função normal endotelial de *Dll4*. Ambos os grupos foram humanamente sacrificados às 18 e 24 semanas de idade.

1.1. Análise do crescimento tumoral

Inicialmente, a análise dos tumores prostáticos foi efetuada através da avaliação do peso da próstata dos murganhos T^{+/+} eDll4OE e T^{+/+} CtrlOE, às 18 e 24 semanas, em relação ao peso da próstata apresentado pelos murganhos *wild-type* (C57BL/6) (figura 9).

Os resultados obtidos demonstraram que às 18 semanas de idade, o peso da próstata dos murganhos T^{+/+} eDll4OE e os do grupo controlo tinham um aumento de 20% e 50% respetivamente, em relação ao peso das próstatas dos animais C57BL/6. Estes resultados representam uma diminuição de 30%, estatisticamente significativa, do peso da próstata dos murganhos T^{+/+} eDll4OE, comparativamente com os animais controlo. Às 24 semanas de idade dos murganhos, os resultados indicaram também um aumento de cerca de 70% do peso da próstata nos murganhos T^{+/+} CtrlOE em relação aos animais C57BL/6 *wild-type* e um aumento de 35% nos murganhos T^{+/+} eDll4OE. Estes resultados demonstraram uma diminuição de 35%, estatisticamente significativa,

do peso da próstata nos murganhos $T^{+/+}$ eDII4OE, em comparação com o grupo controlo.

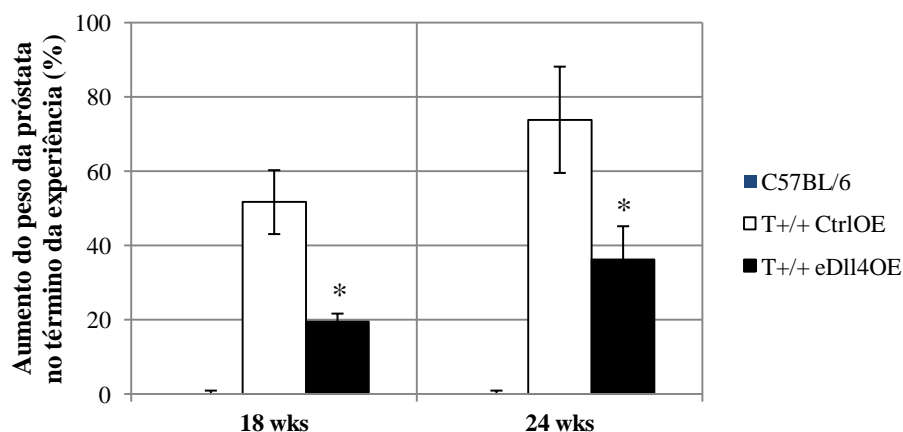


Figura 9. Comparação do aumento do peso da próstata em murganhos $T^{+/+}$ eDII4OE e $T^{+/+}$ CtrlOE, relativamente ao peso apresentado pelos murganhos C57BL/6, às 18 e 24 semanas de idade. C57BL/6: murganhos *wild-type*; $T^{+/+}$ CtrlOE: murganhos TRAMP^{+/+} com expressão basal de *Dll4*. $T^{+/+}$ eDII4OE: murganhos TRAMP^{+/+} com sobre-expressão de *Dll4* no endotélio. As barras representam SEM (*standard error of the mean*) e (*) representa $p < 0,05$.

De seguida, através da coloração de hematoxilina-eosina em criosecções da próstata dos murganhos $T^{+/+}$ eDII4OE e $T^{+/+}$ CtrlOE, avaliaram-se possíveis anormalidades e o grau das lesões prostáticas, às 18 e às 24 semanas de idade (figura 10).

Os resultados obtidos não revelaram diferenças apreciáveis nas próstatas dos murganhos experimentais *versus* as próstatas dos murganhos controlo, em ambos os termos da experiência. Às 18 semanas de idade a análise histológica das próstatas dos $T^{+/+}$ eDII4OE e dos $T^{+/+}$ CtrlOE indicou lesões de grau 3 que representa uma elevada neoplasia prostática intraepitelial (PIN) (Berman-Booty et al., 2011). Esta classificação foi baseada na presença de estruturas cribiformes que se estendem para o lúmen, estratificação e herniação das células epiteliais, células do músculo liso que envolvem a glândula encontrarem-se intactas e por não existir evidência de invasão. Por sua vez, às 24 semanas, os murganhos $T^{+/+}$ eDII4OE e $T^{+/+}$ CtrlOE apresentaram lesões de grau 5,

adenocarcinoma bem diferenciado (WD) (Berman-Booty et al., 2011). A classificação destas lesões foi fundamentada pelo aumento das glândulas na próstata observado e pela invasão das células epiteliais nas células do músculo liso.

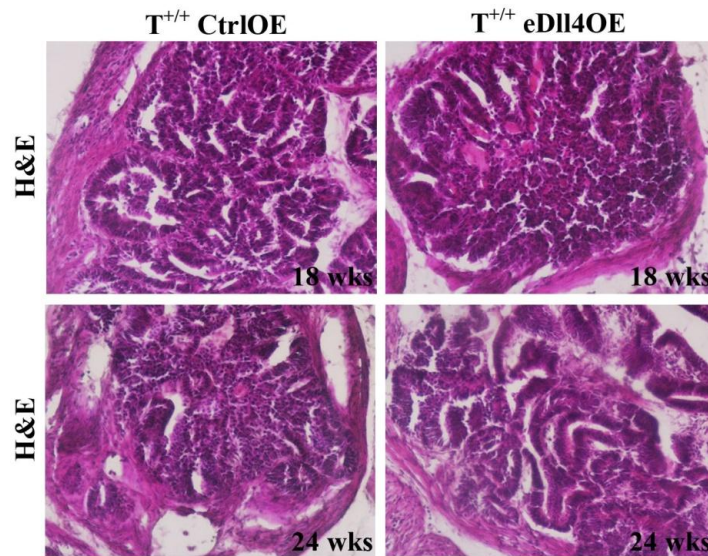


Figura 10. Secções histológicas do lóbulo dorsal da próstata dos murganhos $T^{+/+}$ CtrlOE e $T^{+/+}$ eDII4OE, às 18 e 24 semanas de idade (ampliação 20x). Esta análise foi realizada por coloração hematoxilina-eosina (H&E) dos murganhos TRAMP^{+/+} com expressão basal ($T^{+/+}$ CtrlOE) e com sobre-expressão de *Dll4* no endotélio ($T^{+/+}$ eDII4OE).

1.2. Caracterização do desenvolvimento vascular tumoral

De forma a confirmar que a diminuição do peso da próstata observada nos murganhos $T^{+/+}$ eDII4OE seria devido a alterações na vasculatura tumoral fizeram-se análises histológicas por imunofluorescência.

A densidade vascular e o recrutamento das células de suporte foram visualizados por imunofluorescência utilizando-se os anticorpos anti-CD31 (PECAM-1) e anti- α SMA, como marcadores de células endoteliais e de células do músculo liso perivasculares, respetivamente (figura 11).

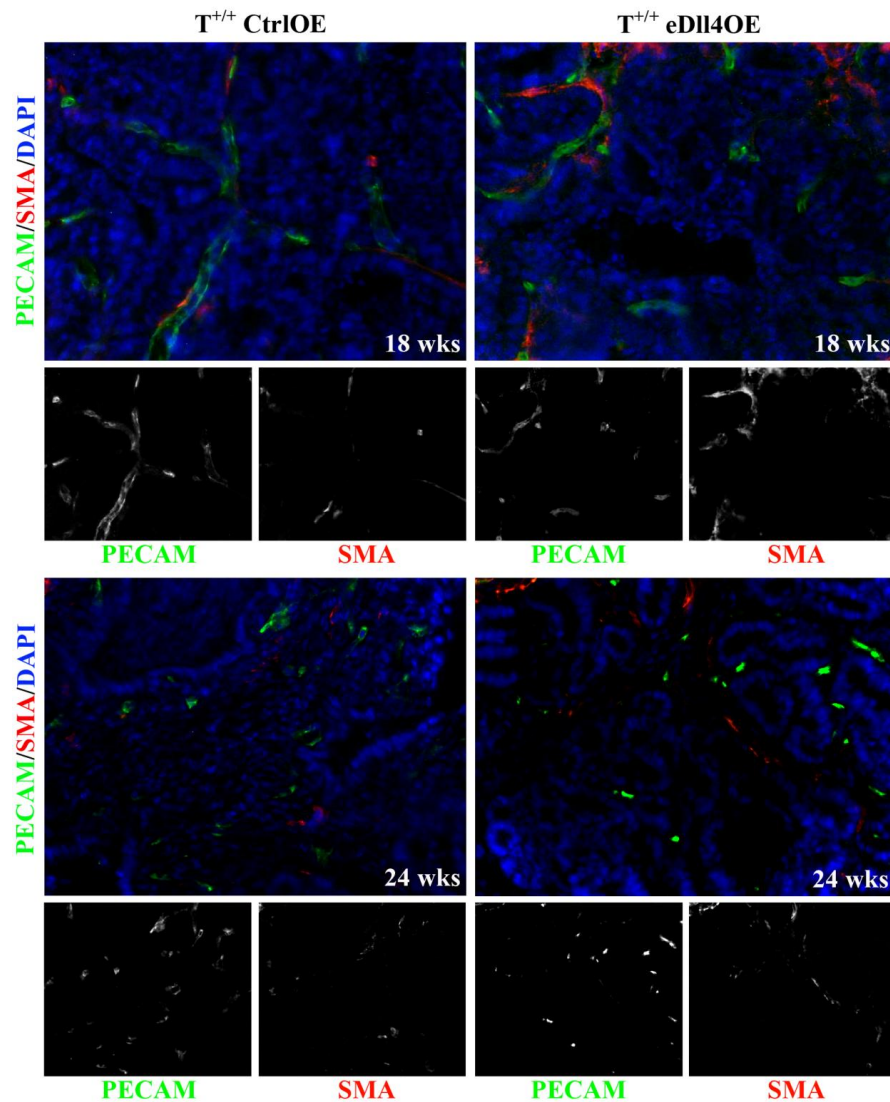


Figura 11. Imunofluorescência indireta para detecção da densidade vascular e do recrutamento de células de suporte, em crioseções da próstata dos murganhos $T^{+/+}$ CtrlOE e $T^{+/+}$ eDII4OE, às 18 e 24 semanas de idade. PECAM/SMA/DAPI são imagens RGB com núcleos a azul (DAPI), vasos sanguíneos a verde (PECAM) e células de suporte a envolverem os vasos a vermelho (α SMA sobreposto a PECAM). PECAM: imagens do canal de CD31 que marcam os vasos sanguíneos. SMA: imagens do canal de α SMA com vasos que contêm células de suporte a branco. $T^{+/+}$ CtrlOE: murganhos TRAMP $^{+/+}$ com expressão basal de *Dll4*. $T^{+/+}$ eDII4OE: murganhos TRAMP $^{+/+}$ com sobre-expressão de *Dll4* no endotélio.

Posteriormente, as imagens de imunofluorescência obtidas foram transformadas em documentos binários e quantificou-se a percentagem de pixéis brancos das estruturas

das secções de cada amostra com sinal positivo para ambos os marcadores, PECAM-1 e α SMA. Os murganhos $T^{+/+}$ eDII4OE apresentaram uma diminuição de cerca de 20% da densidade vascular tumoral relativamente ao controlo, às 18 e às 24 semanas de idade (figura 12a).

Contrariamente, os murganhos com sobre-expressão de *Dll4* apresentaram um aumento de 50% em relação ao recrutamento das células de músculo liso, em comparação com o grupo controlo, às 18 semanas, e um aumento de 20%, às 24 semanas de idade (figura 12b).

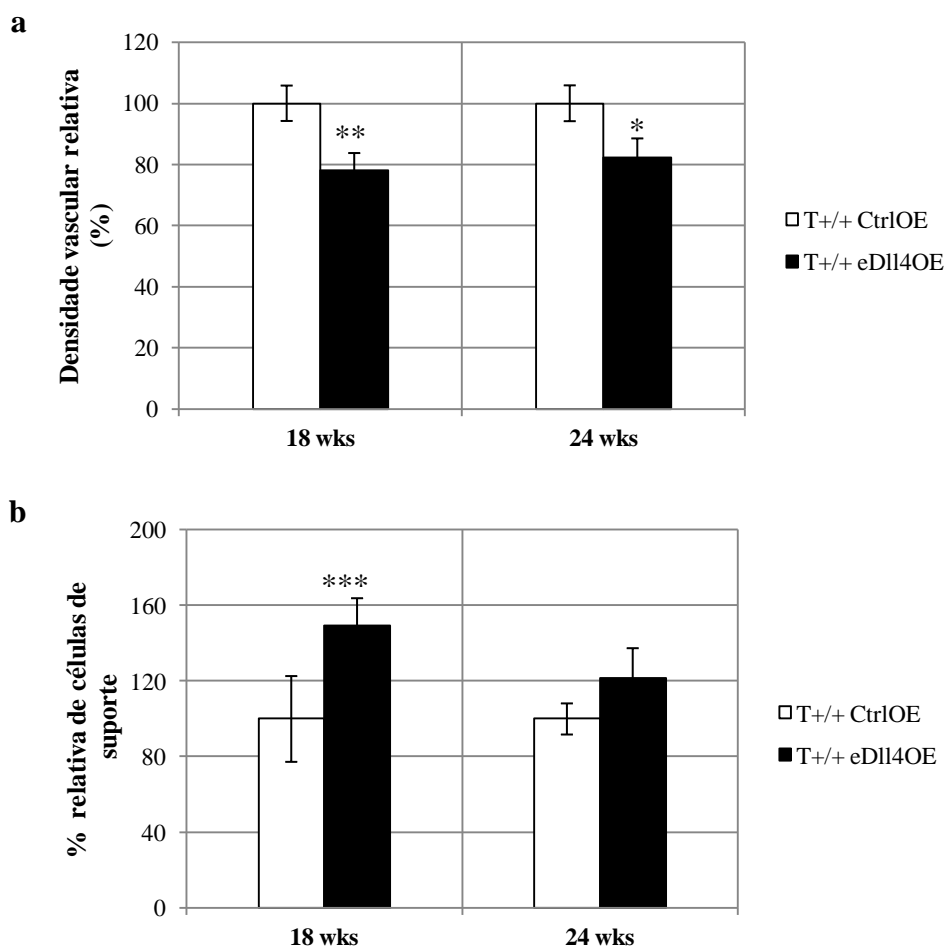


Figura 12. Análise dos resultados obtidos por imunofluorescência da (a) densidade vascular relativa e do (b) recrutamento de células de suporte dos tumores prostáticos \pm desvia padrão, em murganhos TRAMP^{+/+} controlos e $T^{+/+}$ eDII4OE, às 18 e 24 semanas de idade. $T^{+/+}$ CtrlOE: murganhos TRAMP^{+/+} com expressão basal de *Dll4*. $T^{+/+}$ eDII4OE: murganhos TRAMP^{+/+} com sobre-

expressão de *Dll4* no endotélio. As barras representam SEM, (*) representa $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$ ($n=4$ para cada genótipo).

A perfusão vascular foi determinada por imunofluorescência contra PECAM-1 e detecção de lectina, administrada por via endovenosa antes do sacrifício, que marca os vasos sanguíneos perfundidos (figura 13).

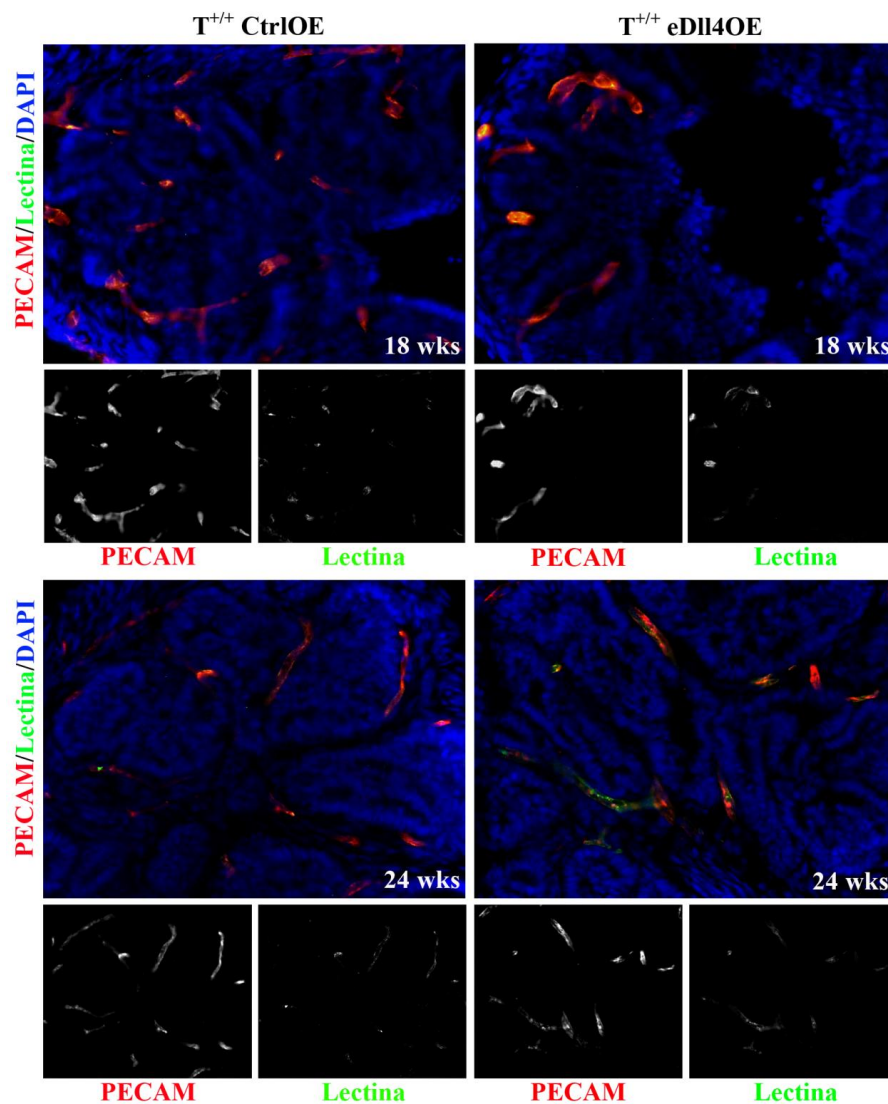


Figura 13. Imunofluorescência indireta para detetar a perfusão vascular em criosecções da próstata dos murganços $T^{+/+}$ CtrlIOE e $T^{+/+}$ eDll4OE, às 18 e 24 semanas de idade. PECAM/Lectina/DAPI: imagens RGB representativas da perfusão vascular em tumores prostáticos, com núcleos a azul (DAPI), vasos sanguíneos a vermelho (PECAM) e vasos perfundidos a verde (lectina). PECAM: imagens do canal de CD-31 que correspondem à marcação dos vasos sanguíneos. Lectina: imagens do canal de estreptavidina ligada à lectina biotinilada que marca os vasos perfundidos. $T^{+/+}$ CtrlIOE: murganços TRAMP $^{+/+}$ com expressão basal de *Dll4*. $T^{+/+}$ eDll4OE: murganços TRAMP $^{+/+}$ com sobre-expressão de *Dll4* no endotélio.

Os resultados obtidos indicaram um aumento de 50% dos vasos sanguíneos perfundidos nos murganhos $T^{+/+}$ eDII4OE quando estes apresentam lesão de grau 3 (18 semanas), em comparação com os animais controle. E um aumento de 20%, em relação ao controle, quando os murganhos de ganho-de-função endotelial de *Dll4* têm uma lesão de grau 5 (24 semanas) (figura 14).

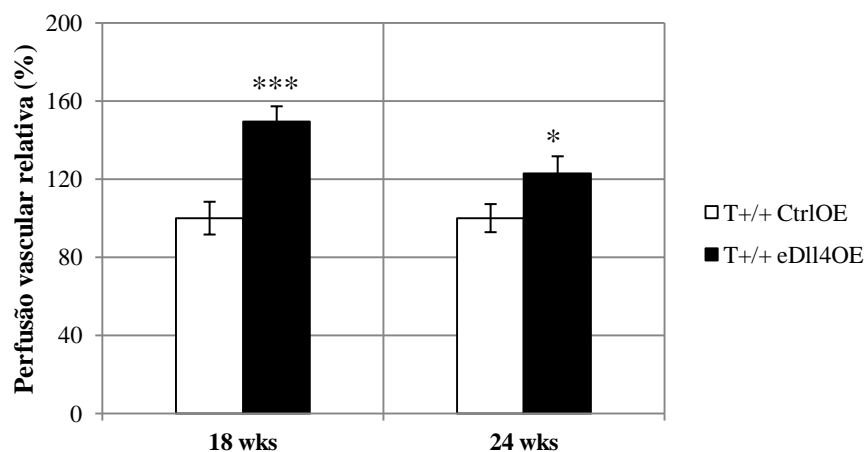


Figura 14. Análise dos resultados obtidos por imunofluorescência da perfusão vascular relativa \pm erro padrão, em tumores prostáticos de ganho-de-função endotelial em *Dll4* relativamente aos controlos, em animais com 18 e 24 semanas de idade. $T^{+/+}$ CtrlOE: murganhos TRAMP^{+/+} com expressão basal de *Dll4*. $T^{+/+}$ eDII4OE: murganhos TRAMP^{+/+} com sobre-expressão de *Dll4* no endotélio. As barras representam SEM, (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ ($n=4$ para cada genótipo).

Em relação ao nível de extravasação dos vasos neoformados nos tumores prostáticos, este foi analisado por administração endovenosa de uma solução com 1% do corante Azul de Evans, que apresenta fluorescência vermelha ao ser visualizado num microscópio de fluorescência (figura 15).

Os resultados obtidos demonstraram uma extravasação, estatisticamente bastante significativa, 30% inferior nos murganhos $T^{+/+}$ eDII4OE em relação aos $T^{+/+}$ CtrlOE, tanto às 18 como às 24 semanas (figura 16).

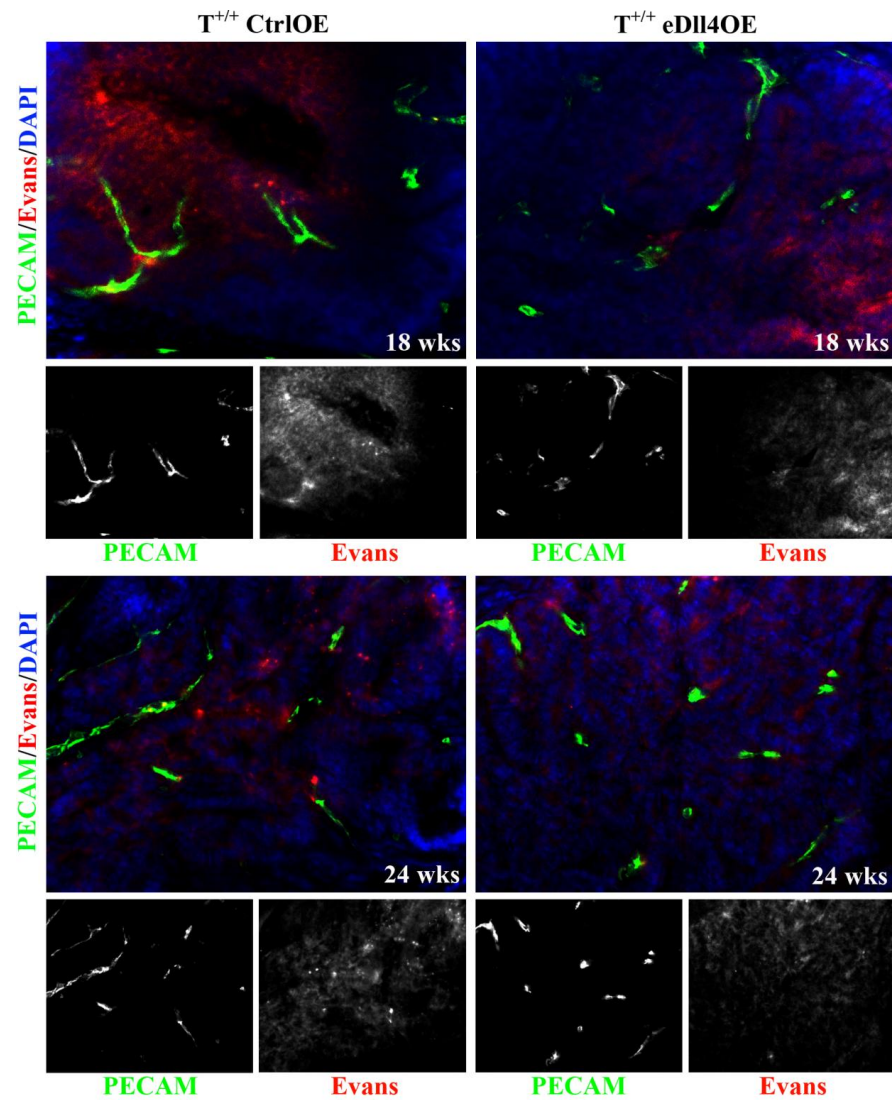


Figura 15. Imunofluorescência indireta para detetar a extravasação vascular em murganhos $T^{+/+}$ CtrlIOE e $T^{+/+}$ eDII4OE, às 18 e 24 semanas de idade. PECAM/Evans/DAPI: imagens RGB representativas da extravasação vascular, núcleos celulares apresentados a azul, vasos a verde e marcador de extravasação (Evans blue) a vermelho. PECAM e Evans: correspondem, respetivamente, ao canal que marca os vasos e ao canal que marca a extravasação vascular. $T^{+/+}$ CtrlIOE: murganhos TRAMP $^{+/+}$ com expressão basal de *Dll4*. $T^{+/+}$ eDII4OE: murganhos TRAMP $^{+/+}$ com sobre-expressão de *Dll4* no endotélio.

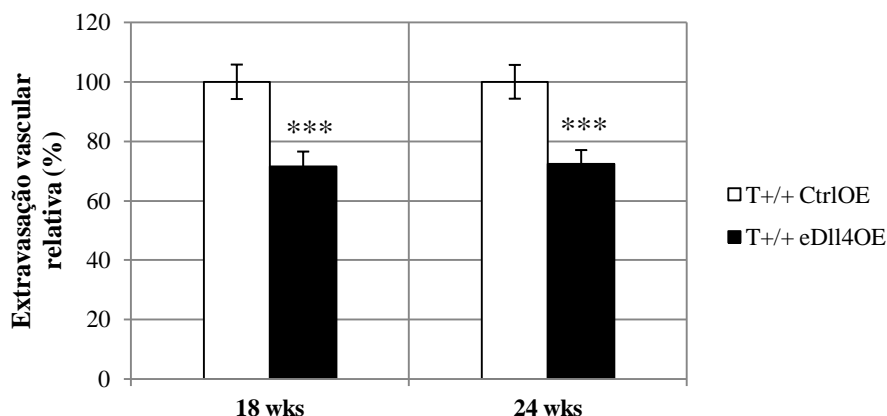


Figura 16. Análise dos resultados obtidos por imunofluorescência da extravasação vascular relativa \pm erro padrão, em tumores prostáticos de ganho-de-função endotelial em *Dll4* em relação aos controlos, em animais com 18 e 24 semanas de idade. T^{+/+} CtrlOE: murganhos TRAMP^{+/+} com expressão basal de *Dll4*. T^{+/+} eDII4OE: murganhos TRAMP^{+/+} com sobre-expressão de *Dll4* no endotélio. As barras representam SEM e (***) $p < 0,001$ ($n=4$ para cada genótipo).

1.3. Análise de expressão génica por PCR em tempo real

Por fim avaliou-se a expressão relativa de alguns dos principais genes envolvidos na regulação da angiogénese, por PCR em tempo real, para ajudar a compreender as mudanças fenotípicas causadas pelo aumento de expressão endotelial de *Dll4* nos tumores prostáticos (figura 17).

Comparativamente com os controlos usados, no estudo do ganho-de-função endotelial de *Dll4* observou-se um aumento dos níveis de ARNm para *Dll4* e uma sobre-expressão de *Hey2*, confirmando a indução da via de sinalização Dll4/Notch nos murganhos T^{+/+} eDII4OE em relação aos controlos. O aumento da expressão de *Dll4* e *Hey2* nos animais que têm uma lesão de grau 3 (18 semanas) é mais elevado do que o observado nos animais que apresentam uma lesão de grau 5 (24 semanas). Por outro lado em ambas os términos da experiência, verificou-se que um aumento de expressão de *Dll4* está associado ao aumento da expressão de *Vegfa*, *Vegfr1*, *Tie2*, *Pdgfr β* e *efrinaB2* e a uma diminuição de *Vegfr2* e *PECAM-1*, com variações de expressão semelhantes.

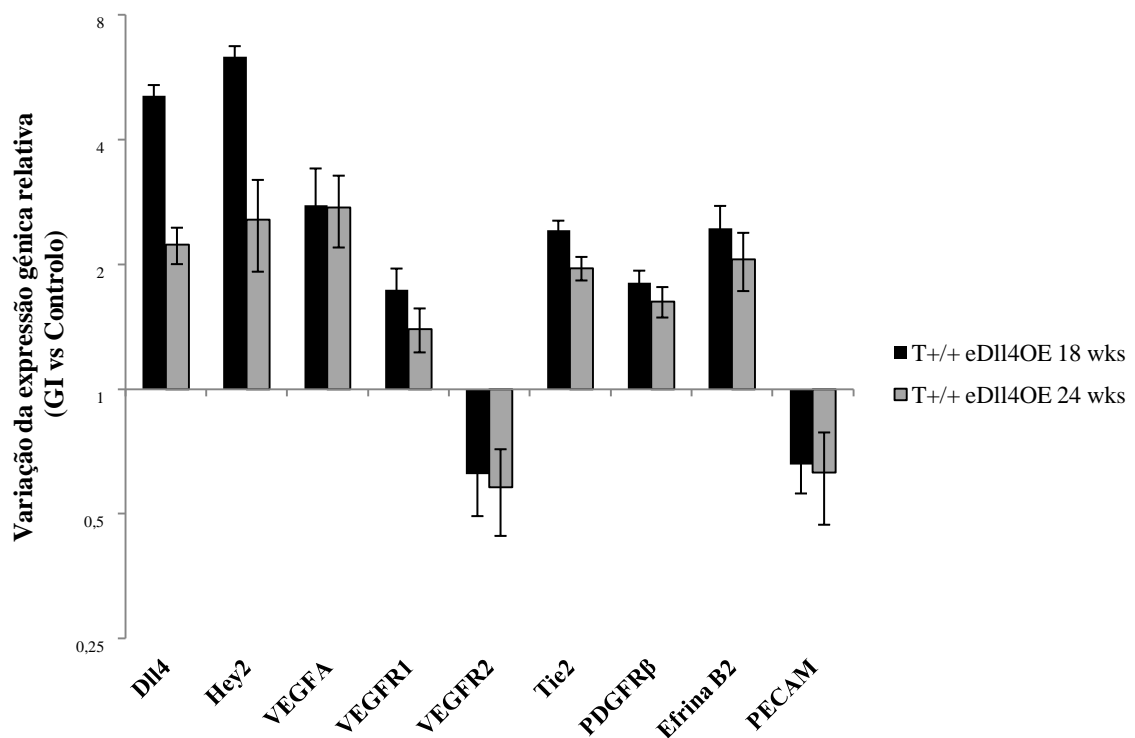


Figura 17. Expressão relativa de genes envolvidos na neo-angiogênese tumoral em murganhos TRAMP^{+/+} com ganho-de-função endotelial em *Dll4* em comparação com os controles. Esta análise foi realizada por PCR em tempo real em triplicado em três reações separadas, sendo todos os resultados obtidos normalizados para β -actina. GI: gene de interesse. T^{+/+} eDll4OE: murganhos TRAMP^{+/+} com sobre-expressão de *Dll4* no endotélio. As barras representam SEM.

2. Análise fenotípica de tumores prostáticos em mutantes com perda-de-função endotelial de *Dll4*

O estudo do efeito da perda-de-função endotelial de *Dll4* nos tumores prostáticos foi possível através do cruzamento da linha transgênica TRAMP com murganhos mutantes *Dll4*^{lox/lox} VE-Cadherin-CreER^{T2}, na qual a expressão de *Dll4* nas células endoteliais é eliminada em resposta ao tratamento com tamoxifeno. A deleção de *Dll4* no endotélio foi induzida às 8 semanas de idade apenas nos murganhos TRAMP^{+/+} *Dll4*^{+/+} VE-Cadherin-Cre⁺ (T^{+/+} eDll4LOF), não tendo sido induzida nos animais TRAMP^{+/+} *Dll4*^{+/+} VE-Cadherin-Cre⁻ (T^{+/+} CtrlLOF), tendo estes função normal endotelial de *Dll4*. Os animais obtidos foram sacrificados às 18 ou às 24 semanas de

idade, que correspondem a uma fase precoce e tardia, respetivamente, do desenvolvimento tumoral.

2.1. Análise do crescimento tumoral

Às 18 semanas, os murganhos $T^{+/+}$ CtrlLOF e $T^{+/+}$ eDII4LOF apresentaram um aumento do peso da próstata em relação aos murganhos C57BL/6, de 40% e 25%, respetivamente (figura 18). Os resultados obtidos demonstram também que existe uma diminuição de 15% do peso da próstata dos $T^{+/+}$ eDII4LOF, comparativamente com os controlos. Relativamente às 24 semanas, verificou-se também um aumento de 70% e 55% do peso da próstata dos $T^{+/+}$ CtrlLOF e $T^{+/+}$ eDII4LOF, respetivamente, e em comparação com o peso da próstata apresentado por murganhos C57BL/6. Além disso, o peso da próstata dos $T^{+/+}$ eDII4LOF apresentou uma diminuição de 15%, comparativamente com os $T^{+/+}$ CtrlLOF.

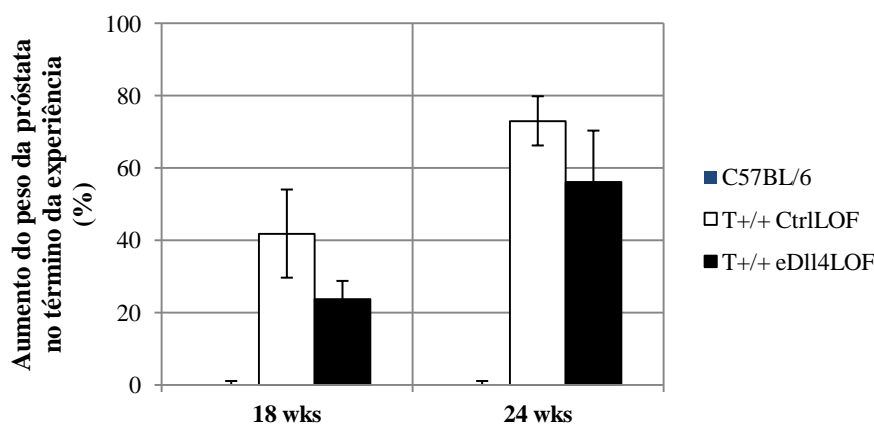


Figura 18. Comparação do aumento do peso da próstata em murganhos $T^{+/+}$ eDII4LOF e $T^{+/+}$ CtrlLOF, relativamente ao peso apresentado pelos murganhos C57BL/6, às 18 e 24 semanas de idade. C57BL/6: murganhos *wild-type*; $T^{+/+}$ CtrlLOF: murganhos TRAMP^{+/+} com função normal de *Dll4*. $T^{+/+}$ eDII4LOF: murganhos TRAMP^{+/+} com deleção de *Dll4* no endotélio. As barras representam SEM (*standard error of the mean*) e (*) representa $p < 0,05$.

A análise histológica por coloração hematoxilina-eosina das criosecções da próstata dos murganhos $T^{+/+}$ eDII4LOF e $T^{+/+}$ CtrlLOF não revelou diferenças consideráveis no grau de lesões apresentadas pelos murganhos experimentais vs controles, às 18 e 24 semanas de idade, respetivamente (figura 19). Às 18 semanas os animais apresentaram lesões de grau 3 (PIN elevado) e às 24 semanas lesões de grau 5 (WD) (Berman-Booty et al., 2011). Esta classificação foi efetuada através das características apresentadas pelas próstatas dos animais já descritas anteriormente, nos murganhos TRAMP com sobre-expressão endotelial de *Dll4* (secção II - 1.1).

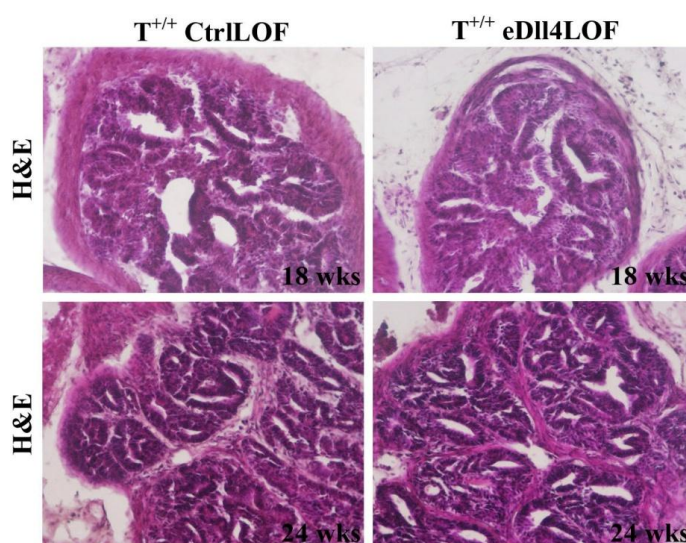


Figura 19. Secções histológicas do lóbulo dorsal da próstata dos murganhos $T^{+/+}$ CtrlLOF e $T^{+/+}$ eDII4LOF, às 18 e 24 semanas de idade (ampliação 20x). Esta análise foi realizada por coloração hematoxilina-eosina (H&E) dos murganhos TRAMP $^{+/+}$ com expressão basal ($T^{+/+}$ CtrlLOF) e com deleção de *Dll4* no endotélio ($T^{+/+}$ eDII4LOF).

2.2. Caracterização do desenvolvimento vascular tumoral

Na análise das imagens obtidas por imunofluorescência anti-PECAM e anti- α SMA (figuras 20), os murganhos $T^{+/+}$ eDII4LOF apresentaram um aumento de 30% e 40% da densidade vascular, resultados estatisticamente significativos, em comparação com os $T^{+/+}$ eDII4LOF às 18 e 24 semanas respetivamente (figuras 21a). Por outro lado,

os resultados demonstraram uma diminuição de 20% e 35% no recrutamento das células do músculo liso, no final de ambas as experiências (figura 21b).

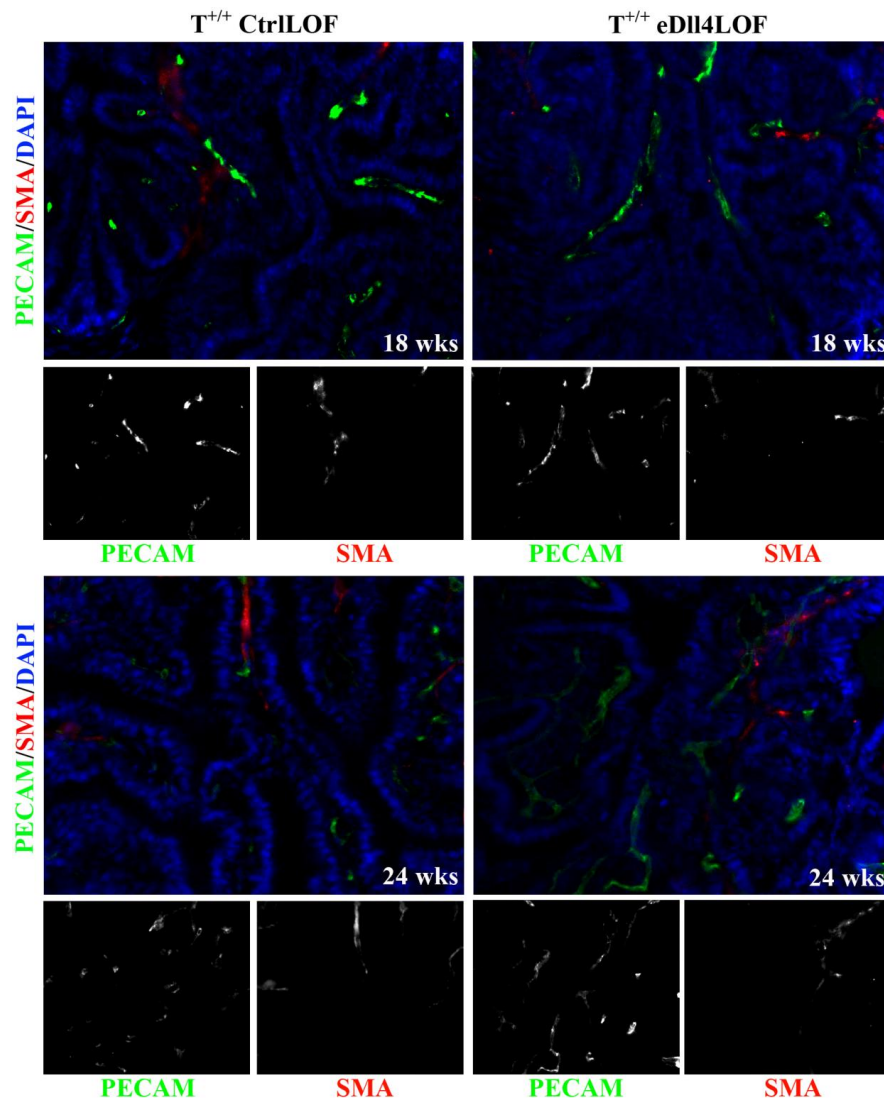


Figura 20. Imunofluorescência indireta para detecção da densidade vascular e do recrutamento de células de suporte, em crioseções da próstata dos murganhos $T^{+/+}$ CtrlLOF e $T^{+/+}$ eDII4LOF, às 18 e 24 semanas de idade. PECAM/SMA/DAPI são imagens RGB com núcleos a azul (DAPI), vasos sanguíneos a verde (PECAM) e células de suporte a envolverem os vasos a vermelho (α SMA sobreposto a PECAM). PECAM: imagens do canal de CD31 que marcam os vasos sanguíneos. SMA: imagens do canal de α SMA com vasos que contêm células de suporte a branco. $T^{+/+}$ CtrlLOF: murganhos TRAMP $^{+/+}$ com função normal de *Dll4*. $T^{+/+}$ eDII4LOF: murganhos TRAMP $^{+/+}$ com deleção de *Dll4* no endotélio.

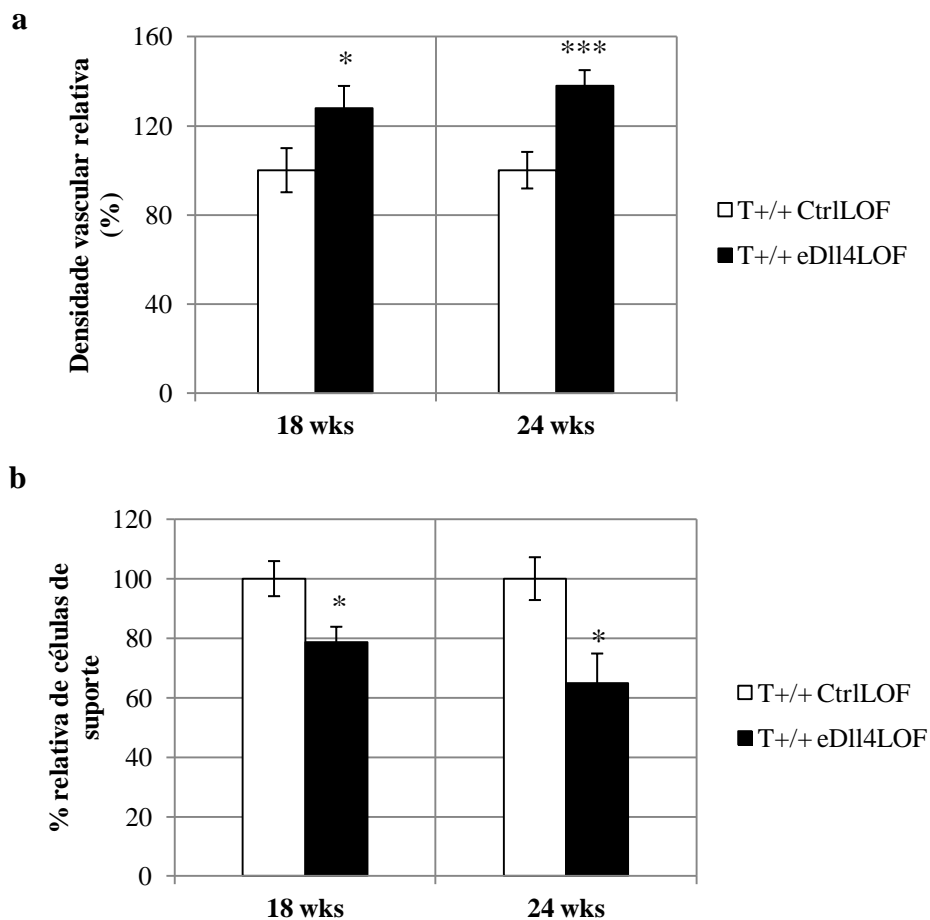


Figura 21. Análise dos resultados obtidos por imunofluorescência da (a) densidade vascular relativa e do (b) recrutamento de células de suporte dos tumores prostáticos \pm desvia padrão, em murganhos T^{+/-} eDII4LOF e T^{+/-} CtrlLOF, às 18 e 24 semanas de idade. T^{+/-} CtrlLOF: murganhos TRAMP^{+/-} com função normal de *Dll4*. T^{+/-} eDII4LOF: murganhos TRAMP^{+/-} com deleção de *Dll4* no endotélio. As barras representam SEM, (*) representa $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$ ($n=4$ para cada genótipo).

Relativamente aos controlos, a perfusão vascular encontrava-se diminuída nos grupos com perda-de-função endotelial de *Dll4*, em ambas as experiências (figuras 22 e 23). A diminuição da perfusão nos vasos foi de 30% às 18 semanas e de 20% às 24 semanas nos animais T^{+/-} eDII4LOF.

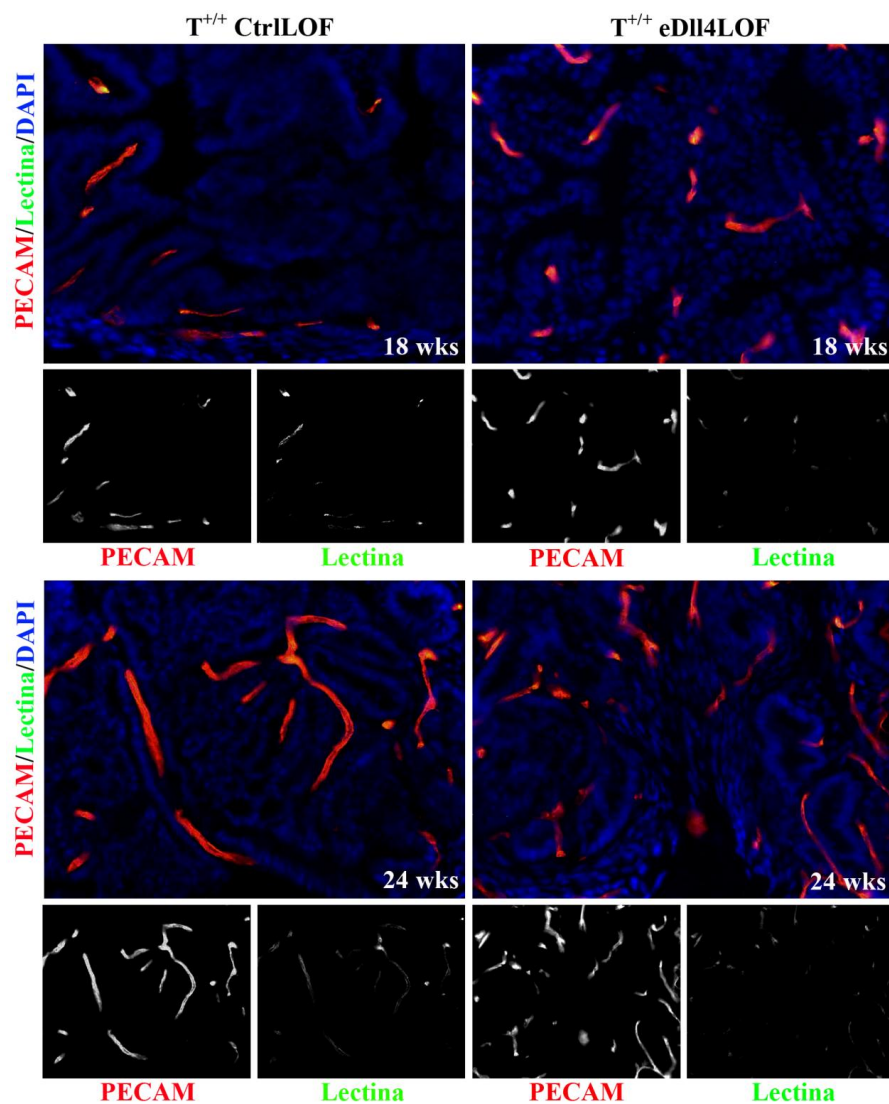


Figura 22. Imunofluorescência indireta para detectar a perfusão vascular em criosecções da próstata dos murganhos $T^{+/+}$ CtrlLOF e $T^{+/+}$ eDII4LOF, às 18 e 24 semanas de idade. PECAM/Lectina/DAPI: imagens RGB representativas da perfusão vascular em tumores prostáticos, com núcleos a azul (DAPI), vasos sanguíneos a vermelho (PECAM) e vasos perfundidos a verde (lectina). PECAM: imagens do canal de CD-31 que correspondem à marcação dos vasos sanguíneos. Lectina: imagens do canal de estreptavidina ligada à lectina biotinizada que marca os vasos perfundidos. $T^{+/+}$ CtrlLOF: murganhos TRAMP $^{+/+}$ com função normal de *Dll4*. $T^{+/+}$ eDII4LOF: murganhos TRAMP $^{+/+}$ com deleção de *Dll4* no endotélio.

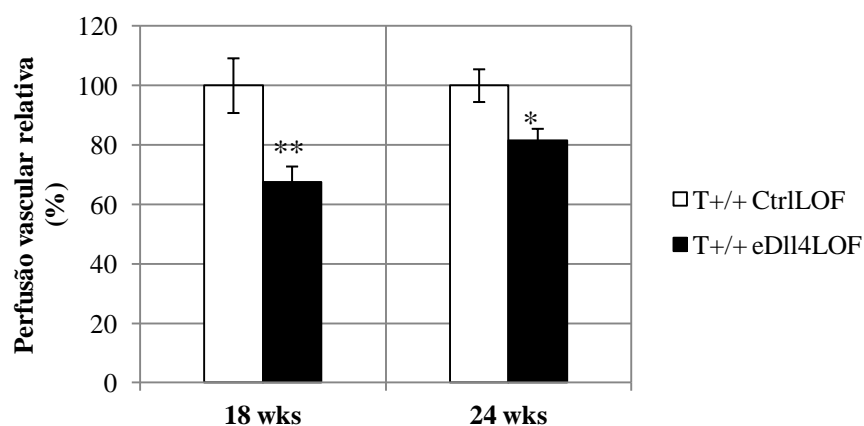


Figura 23. Análise dos resultados obtidos por imunofluorescência da perfusão vascular relativa \pm erro padrão, em tumores prostáticos de perda-de-função endotelial em *Dll4* relativamente aos controlos, em animais com 18 e 24 semanas de idade. T^{+/+} CtrlLOF: murganhos TRAMP^{+/+} com função normal de *Dll4*. T^{+/+} eDII4LOF: murganhos TRAMP^{+/+} com deleção de *Dll4* no endotélio. As barras representam SEM, (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$ ($n=4$ para cada genótipo).

Os resultados referentes à extravasação vascular indicaram um aumento de 20% nos murganhos T^{+/+} eDII4LOF em comparação com os T^{+/+} CtrlLOF, às 18 semanas e de 15% às 24 semanas (figura 24 e 25).

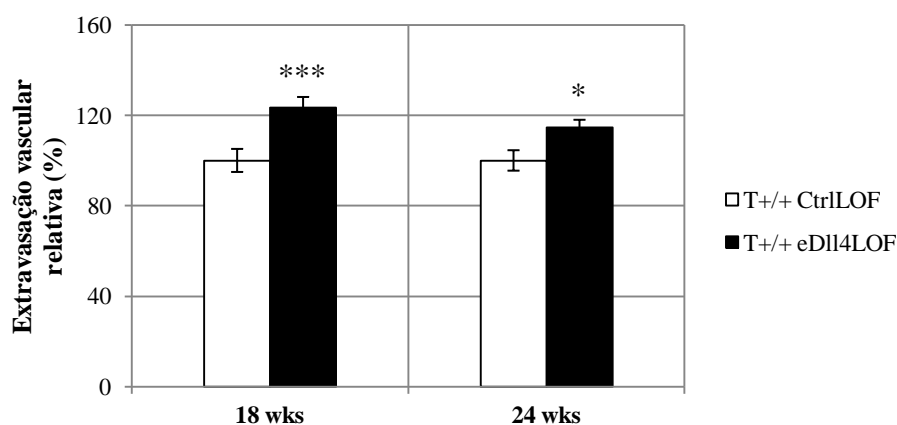


Figura 24. Análise dos resultados obtidos por imunofluorescência da extravasação vascular relativa \pm erro padrão, em tumores prostáticos de perda-de-função endotelial em *Dll4* em relação aos controlos, em animais com 18 e 24 semanas de idade. T^{+/+} CtrlLOF: murganhos TRAMP^{+/+} com função normal de *Dll4*. T^{+/+} eDII4LOF: murganhos TRAMP^{+/+} com deleção de *Dll4* no endotélio. As barras representam SEM, (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ ($n=4$ para cada genótipo).

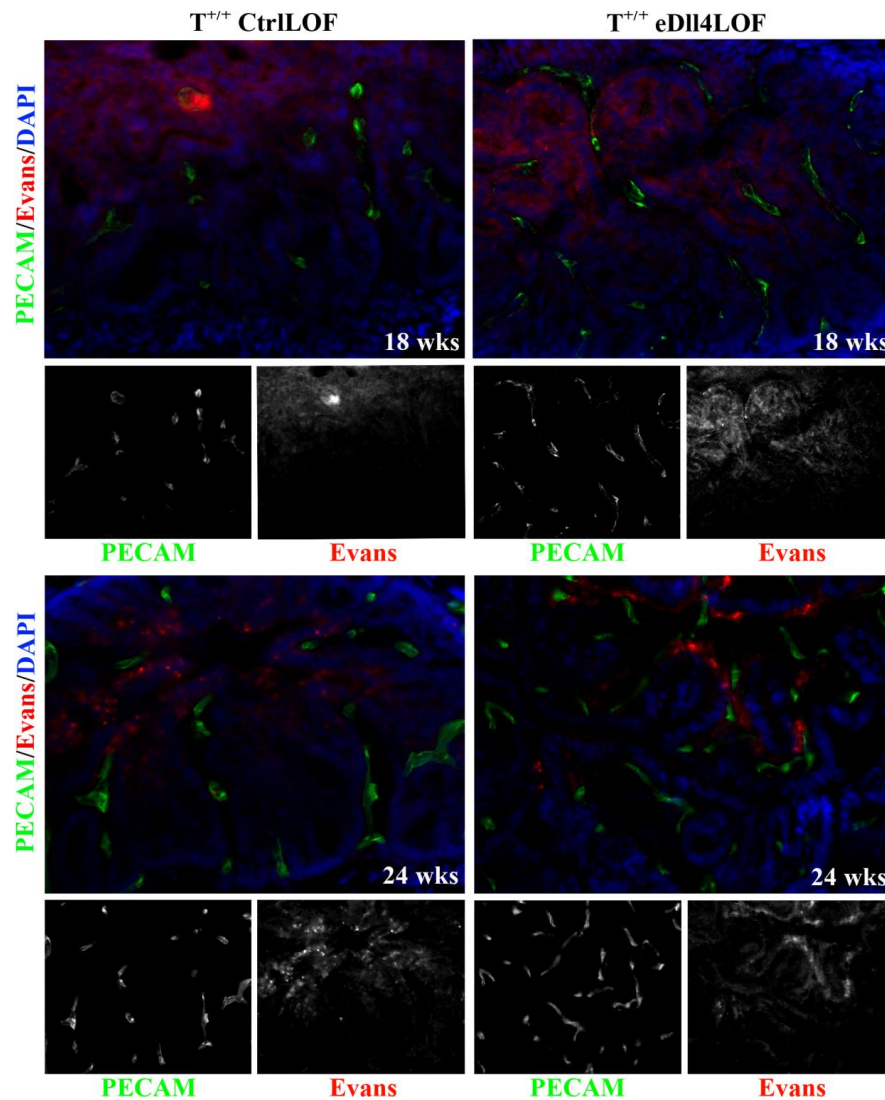


Figura 25. Imunofluorescência indireta para detetar a extravasação vascular em murganhos $T^{+/+}$ CtrlLOF e $T^{+/+}$ eDil4LOF, às 18 e 24 semanas de idade. PECAM/Evans/DAPI: imagens RGB representativas da extravasação vascular, núcleos celulares apresentados a azul, vasos a verde e marcador de extravasação (Evans blue) a vermelho. PECAM e Evans: correspondem, respetivamente, ao canal que marca os vasos e ao canal que marca a extravasação vascular. $T^{+/+}$ CtrlLOF: murganhos TRAMP $^{+/+}$ com função normal de *Dil4*. $T^{+/+}$ eDil4LOF: murganhos TRAMP $^{+/+}$ com deleção de *Dil4* no endotélio.

2.3. Análise de expressão génica por PCR em tempo real

Por último, os resultados obtidos pela análise quantitativa da expressão génica indicaram uma diminuição dos níveis de expressão de *Dll4* e *Hey2* nos murganhos $T^{+/+}$ eDII4LOF, em relação aos murganhos $T^{+/+}$ CtrlLOF. Este facto, confirma a perda-de-função endotelial de *Dll4* e a inibição da via de sinalização Dll4/Notch no grupo experimental. Além disso, verificou-se que com a diminuição dos níveis de expressão de *Dll4*, os níveis de *Vegfa*, *Vegfr1*, *Tie2*, *PDGFR β* e *efrinaB2* também se encontraram diminuídos. Contrariamente, os níveis de *Vegfr2* e *PECAM-1* encontraram-se aumentados. Todos os resultados mencionados foram observados no final de ambas as experiências, em níveis de expressão semelhantes.

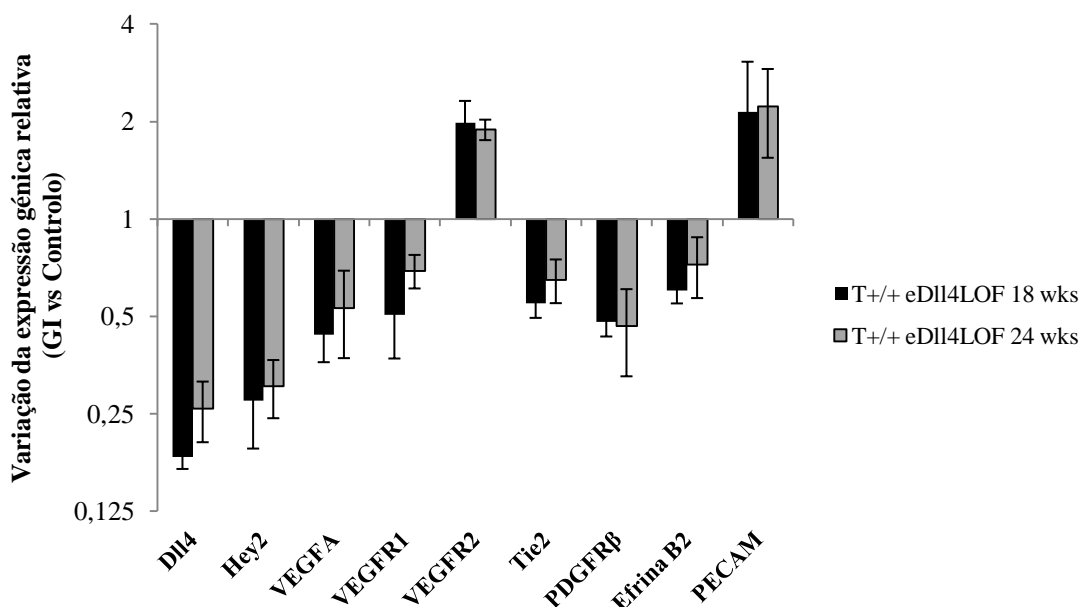


Figura 26. Expressão relativa de genes envolvidos na neo-angiogénese tumoral em murganhos TRAMP^{+/+} com perda-de-função endotelial em *Dll4* em comparação com os controlos. Esta análise foi realizada por PCR em tempo real em triplicado em três reações separadas, sendo todos os resultados obtidos normalizados para β -actina. GI: gene de interesse. $T^{+/+}$ eDII4LOF: murganhos TRAMP^{+/+} com deleção de *Dll4* no endotélio. As barras representam SEM.

Capítulo IV

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Nos últimos anos foram efetuados grandes avanços no estudo da neo-angiogénese tumoral e fisiológica, entre os quais a identificação do papel da via de sinalização Dll4/Notch como potente regulador da angiogénese durante a embriogénese, crescimento tumoral, cicatrização de feridas e na vascularização da retina (Benedito and Duarte, 2005, Suchting et al., 2007, Patel et al., 2006, Trindade et al., 2012, Mailhos et al., 2001). Dll4 é um ligando transmembranar da via de sinalização Notch extremamente importante ao atuar como regulador negativo da angiogénese, promovendo o equilíbrio entre a proliferação vascular e a maturação/quiescência dos vasos, em resposta a VEGF (Noguera-Troise et al., 2006, Ridgway et al., 2006, Scehnet et al., 2007). Deste modo, a sua importância na formação da árvore vascular e o facto da sua expressão se encontrar fortemente aumentada nos tumores originou o desenvolvimento de estudos de bloqueio da função de Dll4 no tratamento de tumores (Mailhos et al., 2001) .

Os estudos genéticos e farmacológicos do bloqueio de Dll4/Notch têm revelado um aumento da vascularização, e simultaneamente uma diminuição do crescimento tumoral, ao induzirem vasos imaturos, com menos perícitos e menor capacidade de perfusão (Li et al., 2007, Noguera-Troise et al., 2006, Scehnet et al., 2007, Ridgway et al., 2006). No entanto, ensaios clínicos com fatores anti-angiogénicos, como os 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). Assim, os contornos mecanísticos da função de Dll4 nas células endoteliais em geral, e em particular na regulação do plexo vascular tumoral, continuam por esclarecer. Com efeito, torna-se fundamental o estudo de murganhos mutantes ou transgénicos que apresentem formação de tumores autóctones, os quais refletem melhor as interações entre o hospedeiro e o tumor.

No presente trabalho foi utilizado o modelo de murganhos transgênicos TRAMP, que desenvolve autoctonamente adenocarcinoma da próstata. Este modelo encontra-se bem descrito na literatura e a progressão tumoral ocorre de forma semelhante à doença nos humanos (Huss et al., 2001, Greenberg et al., 1995, Kaplan-Lefko et al., 2003, Gingrich and Greenberg, 1996). Por esta razão, este modelo foi escolhido para estudar o impacto da expressão alterada de *Dll4*, nomeadamente, o ganho- ou a perda-de-função endotelial de *Dll4*, numa fase precoce (18 semanas) e numa fase tardia (24 semanas) do desenvolvimento tumoral.

O modelo condicional de ganho-de-função utiliza o sistema indutível *tet-on*, para sobre-expressar o gene *Dll4*, tendo como vantagem a expressão de *Dll4* poder ser feita apenas nas células endoteliais e poder ser controlada no tempo, mediante a indução por doxiciclina (Mallo, 2006, Trindade et al., 2008). Por outro lado, a perda-de-função condicional endotelial de *Dll4* utiliza o sistema de recombinação indutível (Mallo, 2006). A linha *Dll4^{lox/lox}* VE-Cadherin-CreER^{T2} por um lado possui o transgene *Dll4^{lox/lox}* que tem a região codificante de *Dll4* flanqueada pelos locais loxP (Monvoisin et al., 2006, Koch et al., 2008). Nas células em que ocorre expressão da recombinase Cre, a sequência localizada entre os dois locais loxP é excisada criando um mutante nulo. Por outro lado, esta linha possui também o transgene VE-Cadherin-CreER^{T2} que permite a expressão controlada de CreER^{T2} no endotélio, uma vez que o elemento ER^{T2} é ativado somente na presença de tamoxifeno (Monvoisin et al., 2006).

Os resultados obtidos, relativamente ao efeito da sobre-expressão endotelial de *Dll4* no crescimento tumoral, no final de ambas as experiências, revelaram uma diminuição do peso da próstata nos murganhos TRAMP^{+/+} que possuem ganho-de-função endotelial de *Dll4* (T^{+/+} eDII4OE), em comparação com os murganhos TRAMP^{+/+} com expressão basal de *Dll4* (T^{+/+} CtrlOE). De igual modo, a análise do crescimento tumoral nos murganhos TRAMP^{+/+} com perda-de-função endotelial de *Dll4* (T^{+/+} eDII4LOF) demonstrou uma diminuição do peso da próstata, comparativamente com os murganhos que apresentam função normal de *Dll4* (T^{+/+} CtrlLOF). Porém, a análise histológica das próstatas pela coloração hematoxilina-eosina, demonstrou não haver diferenças consideráveis no grau de lesão apresentado pelos grupos experimentais

versus grupos controlos, quer às 18 como às 24 semanas. Além disso, esta análise permitiu a identificação de um atraso no desenvolvimento das lesões prostáticas em comparação com o que se encontra descrito, tanto nos mutantes de ganho- como nos de perda-de-função endotelial de *Dll4*. Os murganhos TRAMP, às 18 semanas de idade deveriam apresentar adenocarcinoma bem diferenciado, e às 24 adenocarcinoma indiferenciado com formação de metástases (Gingrich and Greenberg, 1996, Kaplan-Lefko et al., 2003). No entanto, a análise histológica realizada revelou lesões de grau 3 (PIN elevado), às 18 semanas de idade, para ambos os grupos analisados e uma lesão de grau 5 (WD), às 24 semanas. Esta classificação foi baseada no esquema mais recente de classificação das lesões prostáticas nos murganhos TRAMP, tendo em conta a lesão mais grave apresentada e a lesão mais comum. O atraso na progressão tumoral dos murganhos verificado pode ser resultante de diferenças no fundo genético entre as linhas aqui apresentadas e as linhas em que este transgénico foi descrito.

Posteriormente, o mecanismo de inibição do crescimento dos tumores prostáticos com sobre-expressão ou deleção endotelial de *Dll4* foi estudado caracterizando-se a vasculatura tumoral destes, comparativamente com os grupos controlos. Com este intuito procedeu-se à análise de secções de amostras da próstata por imunofluorescência recorrendo-se a anticorpos específicos para a marcação do endotélio (PECAM) e células perivasculares (anti-SMA), para avaliação dos níveis de perfusão vascular (lectina) e extravasação (Evans Blue). Nos murganhos $T^{+/+}$ e *Dll4*OE os resultados revelaram uma diminuição, estaticamente significativa, da densidade e da extravasação vascular (indicador da permeabilidade dos vasos). Em contrapartida, observou-se um aumento do recrutamento de células de suporte (indicador da maturidade vascular) e da perfusão vascular (indicador da funcionalidade vascular). Estes resultados eram expectáveis, uma vez que a função de *Dll4* parece estar relacionada com o impedimento do excesso de proliferação vascular, o estabelecimento da identidade e a estabilidade vascular. Por outro lado, a análise por imunofluorescência nos murganhos $T^{+/+}$ e *Dll4*LOF demonstrou um aumento da densidade vascular e da extravasação vascular e uma diminuição do recrutamento de células de suporte e da perfusão vascular. Deste modo, estes resultados indicam que apesar do aumento dos vasos neoformados observados, estes são mais imaturos e menos funcionais corroborando com o que se encontra descrito (Noguera-Troise et al., 2006, Ridgway et

al., 2006, Schnet et al., 2007). De salientar ainda, que todos estes resultados ocorreram em ambas as fases do desenvolvimento dos tumores prostáticos testados, nos dois modelos analisados.

Por fim, os estudos fenotípicos dos murganhos TRAMP^{+/+} com ganho- ou perda-de-função endotelial de *Dll4* foram concluídos pela quantificação dos níveis de expressão (ARNm) de alguns dos genes envolvidos na regulação da angiogénese tumoral, os quais interagem com a via de sinalização Dll4/Notch. Os resultados obtidos em ambos os términos da experiência, não revelaram diferenças importantes entre si, dos níveis de expressão dos genes analisados. Como seria de esperar, os níveis de expressão de *Dll4* no endotélio encontraram-se aumentados nos murganhos T^{+/+} eDll4OE, em comparação com os de T^{+/+} CtrlOE. Além disso, verificou-se que a expressão de *Hey2*, o principal efetor da via Notch no endotélio, também se encontra aumentada, confirmando que a indução a deleção de *Dll4* afeta a sinalização Notch (Williams et al., 2006). Por sua vez, a expressão de *Dll4* nos murganhos T^{+/+} eDll4LOF era nula comparativamente com os controlos, variando no mesmo sentido os níveis de *Hey2*, indicativo da inibição da via de sinalização Notch. Os níveis de expressão de *Vegfa* verificou-se estarem aumentados, possivelmente devido ao aumento da hipoxia nos tumores (Noguera-Troise et al., 2006, Patel et al., 2006). É conhecido o importante papel de *Dll4* na regulação da sinalização por VEGF, ao controlar a expressão dos seus recetores transmembranares no endotélio (Veikkola et al., 2000, Neufeld et al., 1999). VEGFR1 possui uma afinidade cerca de 10 vezes superior para o ligando que VEGFR2, mas a sua atividade de cinase tirosina é extremamente fraca (Waltenberger et al., 1994). Assim, este recetor funciona como sequestrador de VEGFA, minimizando a sinalização pró-angiogénica ao contrário de VEGFR2 que é o principal mediador da ação de VEGFA. A sinalização VEGFR2/VEGFA estimula a proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais, assim como a permeabilidade vascular (Waltenberger et al., 1994). Em conformidade com o que se encontra descrito, os resultados observados revelaram um aumento da expressão do gene *Vegfr1* e uma diminuição de *Vegfr2* nos mutantes com ganho-de-função endotelial de *Dll4*, facto terá contribuído para a redução verificada na densidade da vasculatura tumoral e na permeabilidade dos vasos. Contrariamente, nos mutantes com perda-de-função endotelial de *Dll4* observou-se uma diminuição dos níveis de *Vegfa*, possivelmente

devido à diminuição dos níveis de *Vegfr1* e ao grande aumento dos níveis de *Vegfr2*. Este aumento de *Vegfr2* poderá ter sido suficiente para aumentar de forma significativa a resposta ao VEGF por parte das células endoteliais, promovendo a proliferação endotelial e assim o aumento da densidade vascular, e a permeabilidade vascular, conforme observado nestes murganhos. Em relação ao recrutamento de células de suporte (perícitos e células de músculo liso), os genes analisados concentraram-se nas vias de sinalização Ang1/Tie2, PDGFB/PDGFR β e EfrinaB2/EphB4. O recetor Tie2, específico do endotélio, através da ligação a Ang1, expresso principalmente nas células perivasculares, é essencial na manutenção do endotélio quiescente, ao promover o recrutamento de células de suporte, a jusante da via de sinalização Dll4/Notch (Trindade et al., 2012, Thomas and Augustin, 2009). A sinalização PDGFB/PDGFR β está envolvida na maturação vascular, sendo necessária no recrutamento de células de suporte durante a angiogénese (Abramsson et al., 2003). Adicionalmente, a via EfrinaB2/EphB4, atua a jusante da via Notch na regulação do processo angiogénico e é reguladora da identidade endotelial e da maturação vascular (Adams et al., 1999, Wang et al., 1998, Djokovic et al., 2010). Posto isto, os resultados obtidos revelaram um aumento da expressão de *Tie2*, *Pdgfr β* e *efrinaB2* nos murganhos T^{+/+} eDll4OE e uma diminuição da expressão dos referidos genes, nos murganhos T^{+/+} eDll4LOF. Assim, pode-se concluir que o aumento da sinalização Dll4/Notch estabiliza os vasos tumorais ao aumentar a sinalização Ang1/Tie2, PDGF/PDGFR β e EfrinaB2/EphB4, provocando um aumento do recrutamento de células de suporte, tendo a inibição da via Dll4/Notch o efeito oposto. Além disso, verificou-se que os níveis de expressão de *PECAM-1* estão diminuídos nos animais T^{+/+} eDll4OE e aumentados nos animais T^{+/+} eDll4LOF, servindo esta proteína como marcador da densidade vascular (Jackson, 2003).

Globalmente, os resultados apresentados neste trabalho sobre o efeito do ganho-de-função endotelial de *Dll4* em tumores prostáticos revelaram um fenótipo vascular oposto ao observado nos murganhos TRAMP^{+/+} com perda-de-função endotelial de *Dll4*, apesar da redução do crescimento tumoral verificado em ambos os casos. Esta observação tem como base os resultados ao nível da densidade tumoral, maturação e funcionalidade observados tanto através da análise por imunofluorescência, como por PCR em tempo real. Os resultados combinados destas duas análises complementam-se e

permitted a more accurate and secure understanding of the function of the *Dll4* gene in prostate tumors.

The effect observed in the TRAMP^{+/+} mice with overexpression of endothelial *Dll4* is relatively beneficial to the functionality and maturation of the tumor blood vessels, delaying tumor growth by the reduced density of the vascular network. Additionally, the increase in the maturation of the vessels can reduce the penetration of malignant cells into the bloodstream and their metastasis (more stabilized vessels are less permeable) and be beneficial, in terms of the efficiency of the delivery of cytostatics and other drugs to the tumors. On the other hand, the vascular characteristics observed in the TRAMP^{+/+} mice with endothelial deletion of *Dll4* may be beneficial in oncological therapy, as they limit tumor growth, due to the deficient blood supply to the tumor, essential for its development. Thus, the tumor becomes increasingly hypoxic, which in turn stimulates the production of VEGF and other pro-angiogenic factors, progressively promoting a greater proliferation of the immature and less functional vasculature. In addition, the reduction in the competence of the blood vessels makes the vasculature more sensitive to the use of drug inhibitors of angiogenesis and can limit tumor saturation by cytostatics, increasing its efficacy. The potential benefits of both overexpression and deletion of *Dll4* on the efficacy of chemotherapy should be the subject of future investigation. It would be important to develop studies similar to those in other tumor types, in order to determine the occurrence of the same effects, the existence of any side effects, and their durability. Similarly, it would be important to test the effects of these possible new therapeutic forms in combination with existing treatments.

The present work demonstrates that both the gain- and the loss-of-function of endothelial *Dll4* interfere with prostate tumor growth, by inhibiting the angiogenic response or by promoting a non-productive angiogenesis, respectively. *Dll4* thus acts as an important negative regulator of vascular growth, playing a key role as a negative regulator of angiogenic vascular growth, and

ao mesmo tempo, como regulador positivo dos fatores de normalização da vasculatura tumoral. Deste modo, os resultados obtidos representam uma boa base para o desenvolvimento de terapias agonistas e antagonistas de Dll4/Notch, que poderão vir a ser utilizadas com eficácia no tratamento de tumores prostáticos.

Capítulo V

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- ABATE-SHEN, C. & SHEN, M. M. (2002) Mouse models of prostate carcinogenesis. *Trends in genetics : TIG*, 18, S1-5.
- ABRAMSSON, A., LINDBLUM, P. & BETSHOLTZ, C. (2003) Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *The Journal of clinical investigation*, 112, 1142-51.
- ADAMS, R. H., WILKINSON, G. A., WEISS, C., DIELLA, F., GALE, N. W., DEUTSCH, U., RISAU, W. & KLEIN, R. (1999) Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes & development*, 13, 295-306.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WATSON, J. D. (1994) *The Molecular Biology of the Cell*. Garland, New York, 3rd Ed.
- ARMULIK, A., ABRAMSSON, A. & BETSHOLTZ, C. (2005) Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res*, 97, 512-23.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, S., RAND, M. D. & LAKE, R. J. (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, 284, 770-6.
- BATTEGAY, E. J., RUPP, J., IRUELA-ARISPE, L., SAGE, E. H. & PECH, M. (1994) PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. *The Journal of cell biology*, 125, 917-28.
- BENEDITO, R. & DUARTE, A. (2005) Expression of Dll4 during mouse embryogenesis suggests multiple developmental roles. *Gene expression patterns : GEP*, 5, 750-5.
- BENEDITO, R., TRINDADE, A., HIRASHIMA, M., HENRIQUE, D., DA COSTA, L. L., ROSSANT, J., GILL, P. S. & DUARTE, A. (2008) Loss of Notch signalling induced by Dll4 causes arterial calibre reduction by increasing endothelial cell response to angiogenic stimuli. *BMC developmental biology*, 8, 117.
- BERGERS, G. & BENJAMIN, L. E. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews. Cancer*, 3, 401-10.

- BERMAN-BOOTY, L. D., SARGEANT, A. M., ROSOL, T. J., RENGEL, R. C., CLINTON, S. K., CHEN, C. S. & KULP, S. K. (2011) A review of the existing grading schemes and a proposal for a modified grading scheme for prostatic lesions in TRAMP mice. *Toxicol Pathol*, 40, 5-17.
- BETSHOLTZ, C., KARLSSON, L. & LINDAHL, P. (2001) Developmental roles of platelet-derived growth factors. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 23, 494-507.
- BLAUMUELLER, C. M., QI, H., ZAGOURAS, P. & ARTAVANIS-TSAKONAS, S. (1997) Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell*, 90, 281-91.
- BRAY, S. J. (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7, 678-89.
- BURRI, P. H., HLUSHCHUK, R. & DJONOV, V. (2004) Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 231, 474-88.
- CARMELIET, P. & JAIN, R. K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407, 249-57.
- CARMELIET, P. & JAIN, R. K. (2011) Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473, 298-307.
- CASANOVAS, O., HICKLIN, D. J., BERGERS, G. & HANAHAN, D. (2005) Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer cell*, 8, 299-309.
- COUSSENS, L. M. & WERB, Z. (2001) Inflammatory cells and cancer: think different! *The Journal of experimental medicine*, 193, F23-6.
- CURRIE, M. J., GUNNINGHAM, S. P., HAN, C., SCOTT, P. A., ROBINSON, B. A., HARRIS, A. L. & FOX, S. B. (2001) Angiopoietin-1 is inversely related to thymidine phosphorylase expression in human breast cancer, indicating a role in vascular remodeling. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 7, 918-27.
- DJOKOVIC, D., TRINDADE, A., GIGANTE, J., BADENES, M., SILVA, L., LIU, R., LI, X., GONG, M., KRASNOPEROV, V., GILL, P. S. & DUARTE, A. (2010) Combination of Dll4/Notch and

- Ephrin-B2/EphB4 targeted therapy is highly effective in disrupting tumor angiogenesis. *BMC cancer*, 10, 641.
- DUARTE, A., HIRASHIMA, M., BENEDITO, R., TRINDADE, A., DINIZ, P., BEKMAN, E., COSTA, L., HENRIQUE, D. & ROSSANT, J. (2004) Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development. *Genes & development*, 18, 2474-8.
- DUESBERG, P., RASNICK, D., LI, R., WINTERS, L., RAUSCH, C. & HEHLMANN, R. (1999) How aneuploidy may cause cancer and genetic instability. *Anticancer research*, 19, 4887-906.
- DUFRAINE, J., FUNAHASHI, Y. & KITAJEWSKI, J. (2008) Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms. *Oncogene*, 27, 5132-7.
- EICHHORN, M. E., KLEESPIES, A., ANGELE, M. K., JAUCH, K. W. & BRUNS, C. J. (2007) Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie*, 392, 371-9.
- FERRARA, N. (1999) Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Current topics in microbiology and immunology*, 237, 1-30.
- FERRARA, N., GERBER, H. P. & LECOUTER, J. (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*, 9, 669-76.
- FIUZA, U. M. & ARIAS, A. M. (2007) Cell and molecular biology of Notch. *The Journal of endocrinology*, 194, 459-74.
- FLEMING, R. J. (1998) Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Seminars in cell & developmental biology*, 9, 599-607.
- FOLKMAN, J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine*, 285, 1182-6.
- FOLKMAN, J. (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute*, 82, 4-6.
- FOLKMAN, J. (2007) Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature reviews. Drug discovery*, 6, 273-86.
- FOLKMAN, J. & HANAHAN, D. (1991) Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. *Princess Takamatsu symposia*, 22, 339-47.

- FRESE, K. K. & TUVESON, D. A. (2007) Maximizing mouse cancer models. *Nature reviews. Cancer*, 7, 645-58.
- FUNG, E., TANG, S. M., CANNER, J. P., MORISHIGE, K., ARBOLEDA-VELASQUEZ, J. F., CARDOSO, A. A., CARLESSO, N., ASTER, J. C. & AIKAWA, M. (2007) Delta-like 4 induces notch signaling in macrophages: implications for inflammation. *Circulation*, 115, 2948-56.
- GALE, N. W. & YANCOPOULOS, G. D. (1999) Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes & development*, 13, 1055-66.
- GINGRICH, J. R. & GREENBERG, N. M. (1996) A transgenic mouse prostate cancer model. *Toxicol Pathol*, 24, 502-4.
- GREENBERG, N. M., DEMAYO, F., FINEGOLD, M. J., MEDINA, D., TILLEY, W. D., ASPINALL, J. O., CUNHA, G. R., DONJACOUR, A. A., MATUSIK, R. J. & ROSEN, J. M. (1995) Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 3439-43.
- GREENBERG, N. M., DEMAYO, F. J., SHEPPARD, P. C., BARRIOS, R., LEOVITZ, R., FINEGOLD, M., ANGELOPOULOU, R., DODD, J. G., DUCKWORTH, M. L., ROSEN, J. M. & ET AL. (1994) The rat probasin gene promoter directs hormonally and developmentally regulated expression of a heterologous gene specifically to the prostate in transgenic mice. *Molecular endocrinology*, 8, 230-9.
- GRIDLEY, T. (1997) Notch signaling in vertebrate development and disease. *Molecular and cellular neurosciences*, 9, 103-8.
- HAHN, W. C. & WEINBERG, R. A. (2002) Rules for making human tumor cells. *The New England journal of medicine*, 347, 1593-603.
- HANAHAN, D. & FOLKMAN, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86, 353-64.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HARMELIN, A., DANON, T., KELA, I. & BRENNER, O. (2005) Biopsy of the mouse prostate. *Laboratory animals*, 39, 215-20.

- HELLSTROM, M., PHNG, L. K., HOFMANN, J. J., WALLGARD, E., COULTAS, L., LINDBLOM, P., ALVA, J., NILSSON, A. K., KARLSSON, L., GAIANO, N., YOON, K., ROSSANT, J., IRUELA-ARISPE, M. L., KALEN, M., GERHARDT, H. & BETSHOLTZ, C. (2007) Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*, 445, 776-80.
- HERBERT, S. P. & STAINIER, D. Y. (2011) Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12, 551-64.
- HURWITZ, A. A., FOSTER, B. A., ALLISON, J. P., GREENBERG, N. M. & KWON, E. D. (2001) The TRAMP mouse as a model for prostate cancer. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]*, Chapter 20, Unit 20 5.
- HUSS, W. J., HANRAHAN, C. F., BARRIOS, R. J., SIMONS, J. W. & GREENBERG, N. M. (2001) Angiogenesis and prostate cancer: identification of a molecular progression switch. *Cancer Res*, 61, 2736-43.
- ISO, T., HAMAMORI, Y. & KEDES, L. (2003) Notch signaling in vascular development. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23, 543-53.
- JACKSON, D. E. (2003) The unfolding tale of PECAM-1. *FEBS Lett*, 540, 7-14.
- JAIN, R. K., DUDA, D. G., CLARK, J. W. & LOEFFLER, J. S. (2006) Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nature clinical practice. Oncology*, 3, 24-40.
- JUBB, A. M., TURLEY, H., MOELLER, H. C., STEERS, G., HAN, C., LI, J. L., LEEK, R., TAN, E. Y., SINGH, B., MORTENSEN, N. J., NOGUERA-TROISE, I., PEZZELLA, F., GATTER, K. C., THURSTON, G., FOX, S. B. & HARRIS, A. L. (2009) Expression of delta-like ligand 4 (Dll4) and markers of hypoxia in colon cancer. *British journal of cancer*, 101, 1749-57.
- KAPLAN-LEFKO, P. J., CHEN, T. M., ITTMANN, M. M., BARRIOS, R. J., AYALA, G. E., HUSS, W. J., MADDISON, L. A., FOSTER, B. A. & GREENBERG, N. M. (2003) Pathobiology of autochthonous prostate cancer in a pre-clinical transgenic mouse model. *The Prostate*, 55, 219-37.
- KARAMYSHEVA, A. F. (2008) Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry. Biokhimiia*, 73, 751-62.

- KENDALL, R. L. & THOMAS, K. A. (1993) Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 10705-9.
- KERBEL, R. S. (2008) Tumor angiogenesis. *The New England journal of medicine*, 358, 2039-49.
- KING, R. J. B. (1996) Cancer Biology. (Longman, Essex).
- KOCH, U., FIORINI, E., BENEDITO, R., BESSEYRIAS, V., SCHUSTER-GOSSLER, K., PIERRES, M., MANLEY, N. R., DUARTE, A., MACDONALD, H. R. & RADTKE, F. (2008) Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *The Journal of experimental medicine*, 205, 2515-23.
- KREBS, L. T., SHUTTER, J. R., TANIGAKI, K., HONJO, T., STARK, K. L. & GRIDLEY, T. (2004) Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. *Genes & development*, 18, 2469-73.
- KUHNERT, F., KIRSHNER, J. R. & THURSTON, G. (2011) Dll4-Notch signaling as a therapeutic target in tumor angiogenesis. *Vascular cell*, 3, 20.
- KUME, T. (2009) Novel insights into the differential functions of Notch ligands in vascular formation. *Journal of angiogenesis research*, 1, 8.
- LI, J. L., SAINSON, R. C., SHI, W., LEEK, R., HARRINGTON, L. S., PREUSSER, M., BISWAS, S., TURLEY, H., HEIKAMP, E., HAINFELLNER, J. A. & HARRIS, A. L. (2007) Delta-like 4 Notch ligand regulates tumor angiogenesis, improves tumor vascular function, and promotes tumor growth in vivo. *Cancer Res*, 67, 11244-53.
- LI, X. & VON BOEHMER, H. (2011) Notch Signaling in T-Cell Development and T-ALL. *ISRN hematology*, 2011, 921706.
- LI, Y. & COZZI, P. J. (2010) Angiogenesis as a strategic target for prostate cancer therapy. *Medicinal research reviews*, 30, 23-66.
- LIANG, W. C., WU, X., PEALE, F. V., LEE, C. V., MENG, Y. G., GUTIERREZ, J., FU, L., MALIK, A. K., GERBER, H. P., FERRARA, N. & FUH, G. (2006) Cross-species vascular endothelial growth factor (VEGF)-blocking antibodies completely inhibit the growth of human tumor xenografts and measure the contribution of stromal VEGF. *The Journal of biological chemistry*, 281, 951-61.

- LINDAHL, P. & BETSHOLTZ, C. (1998) Not all myofibroblasts are alike: revisiting the role of PDGF-A and PDGF-B using PDGF-targeted mice. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 7, 21-6.
- LIU, H., KENNARD, S. & LILLY, B. (2009) NOTCH3 expression is induced in mural cells through an autoregulatory loop that requires endothelial-expressed JAGGED1. *Circulation research*, 104, 466-75.
- LOBOV, I. B., RENARD, R. A., PAPADOPOULOS, N., GALE, N. W., THURSTON, G., YANCOPOULOS, G. D. & WIEGAND, S. J. (2007) Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 3219-24.
- LODISH, BERK, ZIPURSKY, MATSUDAIRA, BALTIMORE & DARNELL (2001) *Molecular Cell Biology*. Freeman, 4th Edition.
- MAILHOS, C., MODLICH, U., LEWIS, J., HARRIS, A., BICKNELL, R. & ISH-HOROWICZ, D. (2001) Delta4, an endothelial specific notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis. *Differentiation; research in biological diversity*, 69, 135-44.
- MAISONPIERRE, P. C., SURJ, C., JONES, P. F., BARTUNKOVA, S., WIEGAND, S. J., RADZIEJEWSKI, C., COMPTON, D., MCCLAIN, J., ALDRICH, T. H., PAPADOPOULOS, N., DALY, T. J., DAVIS, S., SATO, T. N. & YANCOPOULOS, G. D. (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 277, 55-60.
- MALLO, M. (2006) Controlled gene activation and inactivation in the mouse. *Front Biosci*, 11, 313-27.
- MCDONALD, D. M. & BALUK, P. (2002) Significance of blood vessel leakiness in cancer. *Cancer research*, 62, 5381-5.
- MONVOISIN, A., ALVA, J. A., HOFMANN, J. J., ZOVEIN, A. C., LANE, T. F. & IRUELA-ARISPE, M. L. (2006) VE-cadherin-CreERT2 transgenic mouse: a model for inducible recombination in the endothelium. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 235, 3413-22.
- MORRISON, T. B., WEIS, J. J. & WITWER, C. T. (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 24, 954-8, 960, 962.

- NEUFELD, G., COHEN, T., GENGRINOVITCH, S. & POLTORAK, Z. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13, 9-22.
- NOGUERA-TROISE, I., DALY, C., PAPADOPOULOS, N. J., COETZEE, S., BOLAND, P., GALE, N. W., LIN, H. C., YANCOPOULOS, G. D. & THURSTON, G. (2006) Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature*, 444, 1032-7.
- NOREN, N. K., LU, M., FREEMAN, A. L., KOOLPE, M. & PASQUALE, E. B. (2004) Interplay between EphB4 on tumor cells and vascular ephrin-B2 regulates tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 5583-8.
- NUNES, P., PIMENTEL, F. L., PINA, F. & ROLO, F. (2010) Registo Nacional de Cancro da Próstata, em Portugal – ReNaCaP. *Acta Urologica*.
- OKLU, R., WALKER, T. G., WICKY, S. & HESKETH, R. (2010) Angiogenesis and current antiangiogenic strategies for the treatment of cancer. *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR*, 21, 1791-805; quiz 1806.
- PANDYA, N. M., DHALLA, N. S. & SANTANI, D. D. (2006) Angiogenesis--a new target for future therapy. *Vascular pharmacology*, 44, 265-74.
- PAPETTI, M. & HERMAN, I. M. (2002) Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American journal of physiology. Cell physiology*, 282, C947-70.
- PATEL, N. S., DOBBIE, M. S., ROCHESTER, M., STEERS, G., POULSOM, R., LE MONNIER, K., CRANSTON, D. W., LI, J. L. & HARRIS, A. L. (2006) Up-regulation of endothelial delta-like 4 expression correlates with vessel maturation in bladder cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12, 4836-44.
- PATEL, N. S., LI, J. L., GENERALI, D., POULSOM, R., CRANSTON, D. W. & 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 research*, 65, 8690-7.
- PELENGARIS, S., KHAN, M. & EVAN, G. (2002) c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nature reviews. Cancer*, 2, 764-76.

- PLANK, M. J. & SLEEMAN, B. D. (2003) Tumour-Induced Angiogenesis: A Review. *Journal of Theoretical Medicine*, 5, 137-153.
- RIDGWAY, J., ZHANG, G., WU, Y., STAWICKI, S., LIANG, W. C., CHANTHERY, Y., KOWALSKI, J., WATTS, R. J., CALLAHAN, C., KASMAN, I., SINGH, M., CHIEN, M., TAN, C., HONGO, J. A., DE SAUVAGE, F., PLOWMAN, G. & YAN, M. (2006) Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature*, 444, 1083-7.
- RISAU, W. & FLAMME, I. (1995) Vasculogenesis. *Annual review of cell and developmental biology*, 11, 73-91.
- ROSSANT, J. & HOWARD, L. (2002) Signaling pathways in vascular development. *Annual review of cell and developmental biology*, 18, 541-73.
- ROY BICKNELL, LEWIS, C. E., FERRARA, N. & (EDS) (1997) Tumor Angiogenesis. *Oxford University Press*.
- RUDDON, R. W. (2007) Cancer Biology. *Oxford University Press*, 4th Edition.
- SAINSON, R. C. & HARRIS, A. L. (2007) Anti-Dll4 therapy: can we block tumour growth by increasing angiogenesis? *Trends in molecular medicine*, 13, 389-95.
- SCEHNET, J. S., JIANG, W., KUMAR, S. R., KRASNOPEROV, V., TRINDADE, A., BENEDITO, R., DJOKOVIC, D., BORGES, C., LEY, E. J., DUARTE, A. & GILL, P. S. (2007) Inhibition of Dll4-mediated signaling induces proliferation of immature vessels and results in poor tissue perfusion. *Blood*, 109, 4753-60.
- SCEHNET, J. S., LEY, E. J., KRASNOPEROV, V., LIU, R., MANCHANDA, P. K., SJOBERG, E., KOSTECKE, A. P., GUPTA, S., KUMAR, S. R. & GILL, P. S. (2009) The role of Ephs, Ephrins, and growth factors in Kaposi sarcoma and implications of EphrinB2 blockade. *Blood*, 113, 254-63.
- SEMENZA, G. L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, 3, 721-32.
- SHIBUYA, M. (2006) Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis*, 9, 225-30; discussion 231.
- SHIBUYA, M., YAMAGUCHI, S., YAMANE, A., IKEDA, T., TOJO, A., MATSUSHIME, H. & SATO, M. (1990) Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*, 5, 519-24.

- SIEKMANN, A. F. & LAWSON, N. D. (2007) Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature*, 445, 781-4.
- SUCHTING, S., FREITAS, C., LE NOBLE, F., BENEDITO, R., BREANT, C., DUARTE, A. & EICHMANN, A. (2007) The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 3225-30.
- SURAWSKA, H., MA, P. C. & SALGIA, R. (2004) The role of ephrins and Eph receptors in cancer. *Cytokine & growth factor reviews*, 15, 419-33.
- SUZUKI, M., YAMAMOTO, M., SUGIMOTO, A., NAKAMURA, S., MOTODA, R. & ORITA, K. (2006) Delta-4 expression on a stromal cell line is augmented by interleukin-6 via STAT3 activation. *Experimental hematology*, 34, 1143-50.
- TEICHER, B. A. (2006) Tumor models for efficacy determination. *Molecular cancer therapeutics*, 5, 2435-43.
- THOMAS, M. & AUGUSTIN, H. G. (2009) The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis*, 12, 125-37.
- THURSTON, G. & KITAJEWSKI, J. (2008) VEGF and Delta-Notch: interacting signalling pathways in tumour angiogenesis. *British journal of cancer*, 99, 1204-9.
- THURSTON, G., NOGUERA-TROISE, I. & YANCOPOULOS, G. D. (2007) The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth. *Nature reviews. Cancer*, 7, 327-31.
- TOI, M., KONDO, S., SUZUKI, H., YAMAMOTO, Y., INADA, K., IMAZAWA, T., TANIGUCHI, T. & TOMINAGA, T. (1996) Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer. *Cancer*, 77, 1101-6.
- TORTORA, G., MELISI, D. & CIARDIELLO, F. (2004) Angiogenesis: a target for cancer therapy. *Current pharmaceutical design*, 10, 11-26.
- TRINDADE, A., DJOKOVIC, D., GIGANTE, J., BADENES, M., PEDROSA, A. R., FERNANDES, A. C., LOPES-DA-COSTA, L., KRASNOPEROV, V., LIU, R., GILL, P. S. & DUARTE, A. (2012) Low-dosage inhibition of Dll4 signaling promotes wound healing by inducing functional neo-angiogenesis. *PLoS One*, 7, e29863.

- TRINDADE, A., KUMAR, S. R., SCEHNET, J. S., LOPES-DA-COSTA, L., BECKER, J., JIANG, W., LIU, R., GILL, P. S. & DUARTE, A. (2008) Overexpression of delta-like 4 induces arterialization and attenuates vessel formation in developing mouse embryos. *Blood*, 112, 1720-9.
- VALKENBURG, K. C. & WILLIAMS, B. O. (2011) Mouse models of prostate cancer. *Prostate Cancer*, 2011, 895238.
- VEIKKOLA, T., KARKKAINEN, M., CLAESSION-WELSH, L. & ALITALO, K. (2000) Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer research*, 60, 203-12.
- VILLA, N., WALKER, L., LINDSELL, C. E., GASSON, J., IRUELA-ARISPE, M. L. & WEINMASTER, G. (2001) Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mechanisms of development*, 108, 161-4.
- WALTENBERGER, J., CLAESSION-WELSH, L., SIEGBAHN, A., SHIBUYA, M. & HELDIN, C. H. (1994) Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *The Journal of biological chemistry*, 269, 26988-95.
- WANG, H. U., CHEN, Z. F. & 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, Y., NAKAYAMA, M., PITULESCU, M. E., SCHMIDT, T. S., BOCHENEK, M. L., SAKAKIBARA, A., ADAMS, S., DAVY, A., DEUTSCH, U., LUTHI, U., BARBERIS, A., BENJAMIN, L. E., MAKINEN, T., NOBES, C. D. & ADAMS, R. H. (2010) Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature*, 465, 483-6.
- WILLIAMS, C. K., LI, J. L., MURGA, M., HARRIS, A. L. & TOSATO, G. (2006) Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function. *Blood*, 107, 931-9.
- XU, Q. & WILKINSON, D. G. (1997) Eph-related receptors and their ligands: mediators of contact dependent cell interactions. *Journal of molecular medicine*, 75, 576-86.
- YAN, M. & PLOWMAN, G. D. (2007) Delta-like 4/Notch signaling and its therapeutic implications. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13, 7243-6.

- YANCOPOULOS, G. D., DAVIS, S., GALE, N. W., RUDGE, J. S., WIEGAND, S. J. & HOLASH, J. (2000)
Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407, 242-8.
- YU, L., SU, B., HOLLOMON, M., DENG, Y., FACCHINETTI, V. & KLEINERMAN, E. S. (2010)
Vasculogenesis driven by bone marrow-derived cells is essential for growth of Ewing's
sarcomas. *Cancer research*, 70, 1334-43.

ANEXOS

ANEXO I

1. Modo de preparação das soluções usadas

1.1. Tamoxifeno

Para 1mL de solução, pesa-se 10mg de tamoxifeno (Sigma-Aldrich, T5648-1G) e adiciona-se 100 μ L de etanol (Merck, 1.00983.1011) e 900 μ L de óleo de ricínio (Cremophor[®] EL, Sigma-Aldrich, C5135). De seguida, é necessário sonicar a solução durante 10 minutos numa potência de 45W (Sonicador Bandelin Sonopuls HD 2070). Para se proceder à administração do tamoxifeno, aquece-se a solução em banho-maria a 37°C e administra-se 100 μ L desta (50 mg de tamoxifeno/kg de peso vivo, sendo o peso médio de 35g \pm 5g) por via intraperitoneal, com seringa de insulina (de 1mL) e agulha de 21 G x 1½”, 0,8 x 40 mm, a murganhos com 8 semanas de idade, uma vez por dia à mesma hora durante 5 dias.

1.2. PBS (*phosphate-buffered saline*)

Esta solução tampão é uma solução salina que ajuda a manter o pH constante (isotónico). Esta foi preparada pela adição de 80g de NaCl, 2g de KCl (Merck, 1.04936.0250), 14,4g de Na₂HPO₄ (Merck, 1.06586.0500) e 2,4g de KH₂PO₄ (Merck, 1.05108.0500) a 800mL de água desionizada. Acertou-se o pH a 7,4 com NaOH (Merck, 1.06482.1000) e adicionou-se água desionizada até ao volume final de 1L. De seguida, a solução foi autoclavada, a 121°C durante 20 minutos.

1.3. Solução de *Tail Buffer*

Utilizou-se esta solução para se proceder à lise das caudas de cada animal a genotipar. Para tal, misturou-se 5,9g de NaCl, 50mL de *Tris (hydroxymethyl)-aminomethane* (VWR, 1.08387.0500) 1M, 200mL de EDTA

(*ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate*, 99%, Sigma-Aldrich, E5134) a 500mM e 100mL de SDS (*sodium dodecyl sulfat*e, Merck, 1.13760.0100) a 10%. Perfez-se o volume final de 1L com água desionizada e autoclavou-se para esterilizar, a 121°C durante 20 minutos.

1.4. Solução de TE (tris-EDTA)

Este tampão é comumente usado para ressuspender e proteger a degradação do ADN das amostras de cauda dos animais. A solução de trabalho com concentração 1x foi preparada a partir de uma solução *stock* de 10x. Esta foi preparada adicionando-se 1,21g de Tris e 0,34g de EDTA a 800mL de água desionizada. Homoginou-se a solução e acertou-se o pH com HCl concentrado (Sigma-Aldrich, H7020) para 7,5. Por último, perfez-se o volume final de 1L com água desionizada e esterilizou-se autoclavando a 121°C durante 20 minutos. Para se obter a solução de trabalho dilui-se a solução *stock* 1:10 com água desionizada e manteve-se a solução à temperatura ambiente durante 6 meses.

1.5. Tampão de eletroforese: TAE (tris-acetato-EDTA)

Usado como solução base à qual se adiciona a agarose em pó para se fazer o gel e como tampão de eletroforese usado na tina de eletroforese. A solução de trabalho (TAE 1x) é feita a partir de uma solução *stock* concentrada a 50x. Esta foi preparada adicionando-se 242g de Tris-base (Sigma, T6066), 57,1mL de ácido acético glacial (Merck, 100056), 100mL de EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate*, 99%, Sigma-Aldrich, E5134) a 0,5M pH8.0 e água desionizada, para um volume final de 1L.

1.6. Avertina

Anestésico usado para anestésiar os machos, tribomoetanol recorrentemente conhecido por avertina. Este anestésico atua rapidamente, entre dois a cinco minutos

depois da injeção intraperitoneal, e produz uma boa analgesia durante 40 a 90 minutos, com bom relaxamento da musculatura esquelética e apenas um grau moderado de depressão respiratória. A solução tribromoetanol de trabalho (2,5%) é feita a partir de uma solução *stock* de 100%. Esta solução de 100% é preparada dissolvendo 10g de 2,2,2-tribromoetanol (Aldrich, T4.840-2) em 10mL de 2-metil-2-butanol (Aldrich, 24.048-6), a 40°C com agitação. Após o tribromoetanol estar dissolvido, a solução é filtrada em filtro Millipore de 0,5µm. A solução é armazenada a 4°C, em recipiente protegido da luz. Por sua vez, para se obter a solução de trabalho de avertina dilui-se a solução *stock* a 100% num volume apropriado de PBS para uma concentração final de 2,5%. Agita-se vigorosamente até se dissolver. Normalmente injeta-se 0,5mL de solução de tribromoetanol por animal de 25g, que corresponde a uma dose de 250mg/Kg.

1.7. DAPI

DAPI (4,6-diamino-2-fenil indol) é um agente intercalador, que funciona como marcador dos núcleos celulares, isto é, como agente de contraste indicador da estrutura dos tecidos. A sua preparação foi feita através da adição de 5mg (*4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride hydrate*, que cora os núcleos celulares) que cora os núcleos celulares) (Sigma, D9564) a 50mL água bidestilada e agita-se a solução, com agitador magnético, durante 60 minutos. Filtra-se a solução com filtro de poro 0,22µm e guarda-se a -20°C em alíquotas de 500µL.

1.8. Mowiol

Funciona como meio de montagem. O Mowiol preparou-se pela adição de 2,4g de Mowiol 4-88 (Calbiochem, 475904), 6g de glicerol (Merck, 1.04095.0250), 6mL de água bidestilada e 12mL de 0,2M Tris pH8,5 e coloca-se esta mistura a agitar durante 6 horas. De seguida, deixa-se a mistura repousar durante 2 horas. Depois coloca-se a mistura a 50°C até dissolver Após centrifugação alíquota-se o sobrenadante e guarda-se a -20°C até à sua utilização.

ANEXO II

1. Protocolos de PCR

1.1. Linha transgênica TRAMP

Tabela 1. Sequências de oligonucleótidos iniciadores (*primers*) usados na reação de PCR.

Nome	Sequência oligonucleotídica (5'-3')	Amplificação (pb)
MβCx7 For	GATGTGCTCCAGGCTAAAGTT	500 WT
MβCx7 Rev	AGAAACGGAATGTTGTGGAGT	
Pb-1 For	CCGGTCGACCGGAAGCTTCCACAAGTGCATTTA	600 TRAMP
SV40Tag Rev	CTCCTTTCAAGACCTAGAAGGTCCA	

Tabela 2. Mistura de reação de PCR.

Componentes	Concentração (mM)	Volume (μL)
H ₂ O SDW	-	10,5
Tampão de PCR	5x	5
dNTPs mix	10	1
MgCl ₂	25	1
<i>Primers</i>	10	1
polimerase Taq ADN	-	0,5
DNA	50	2
Volume final		25

Tabela 3. Programa de termociclador.

Programa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Desnaturação inicial	94	1
29 ciclos	94	1
	60	2
	72	3
Síntese final	72	8
∞	4	∞

1.2. Linha transgênica TetO7-Dll4 e VE-Cadherin-CreER^{T2}

Tabela 4. Sequências de oligonucleótidos iniciadores (*primers*) usados na reação de PCR, para TetO7-Dll4.

Nome	Sequência oligonucleotídica (5'-3')	Amplicação (pb)
tet_Dll4_L	ATCCACGCTGTTTTGACCTC	500
tet_Dll4_R	GTGGAGACATTGCCAAAGGT	

Tabela 5. Sequências de oligonucleótidos iniciadores (*primers*) usados na reação de PCR, para VE-Cadherin-CreER^{T2}.

Nome	Sequência oligonucleotídica (5'-3')	Amplicação (pb)
Cre313U	CCAGCTAAACATGCTTCATC	350
Cre683I	CGCTCGACCAGTTTAGTTAC	

Tabela 6. Mistura de reação de PCR para ambas as linhas.

Componentes	Concentração (mM)	Volume (μ L)
H ₂ O SDW	-	10,7
Tampão de PCR	5x	5
dNTPs mix	10	0,5
MgCl ₂	25	1,6
<i>Primers</i>	10	0,5
polimerase Taq ADN	-	0,2
DNA	50	2
Volume final		20

Tabela 7. Programa de termociclador.

Programa	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tempo (min-seg)
Desnaturação inicial	95	3´
35 ciclos	95	30´´
	60	30´´
	72	35´´
Síntese final	72	3´
∞	4	∞

1.3. Linha transgênica Tie2-rtTA

Tabela 8. Sequências de oligonucleótidos iniciadores (*primers*) usados na reação de PCR.

Nome	Sequência oligonucleotídica (5´-3´)	Amplicação (pb)
rtTA2S-Fwd	AAGTCATTCCGCTGTGCTCT	200
rtTA2S-Rev	GTCTCAGAAGTGGGGGCATA	

Tabela 9. Mistura de reação de PCR.

Componentes	Concentração (mM)	Volume (μ L)
H ₂ O SDW	-	4,28
Tampão de PCR	5x	2,4
dNTPs mix	2,5	0,96
MgCl ₂	25	0,96
<i>Primers</i>	20	0,6
polimerase Taq ADN	-	0,2
DNA	50	2
Volume final		12

Tabela 10. Programa de termociclador.

Programa	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tempo (min-seg)
Desnaturação inicial	94	4'
35 ciclos	94	1'
	58	1'
	72	35''
Síntese final	72	10'
∞	4	∞

1.4. Linha transgênica *Dll4^{lox/lox}*

Tabela 11. Sequências de oligonucleótidos iniciadores (*primers*) usados na reação de PCR.

Nome	Sequência oligonucleotídica (5'-3')	Amplicação (pb)
Dll4 5'lox	GTGCTGGGACTGTAGCCACT	419 WT
Dll4 3'lox	TGT TAG GGATGTCGCTCTCC	455 <i>Dll4^{lox/lox}</i>

Tabela 12. Mistura de reação de PCR.

Componentes	Concentração (mM)	Volume (µL)
H ₂ O SDW	-	10,7
Tampão de PCR	5x	5
dNTPs mix	2	2,5
MgCl ₂	25	2
<i>Primers</i>	20	1,25
polimerase Taq ADN	-	0,2
DNA	50	2
Volume final		25

Tabela 13. Programa de termociclador.

Programa	Temperatura (°C)	Tempo (min-seg)
Desnaturação inicial	94	2´
34 ciclos	94	45´´
	60	30´´
	72	30´´
Síntese final	72	10´
∞	4	∞

2. Protocolo PCR em tempo real

Tabela 14. Sequências de oligonucleótidos iniciadores (*primers*) usados na reacção de PCR em tempo real.

Nome	Sequência oligonucleotídica (5'-3')	Gene
beta-actin Fwd	GATCCTCACGGAATTCATGG	<i>βactina</i>
beta-actin Rev	GGGGTGTGGAAGGTCTCAA	
Dll4 ? F	GGAACCTTCTCACTCAACATCC	<i>Dll4</i>
Dll4 ? R	CTCGTCTGTTCGCCAAATCT	
PECAM F2	CAAGCAAAGCAGTGAAGCTG	<i>Pecam</i>
PECAM R2	TCTAACTTCGGCTTGGGAAA	
Hey2 ? F	TGCCAAGTTAGAAAAGGCTGA	<i>Hey2</i>
Hey2 ? R	CACTCTCGGAATCCAATGCT	
VEGFA ? F	GGAGAGCAGAAGTCCCATGA	<i>Vegfa</i>
VEGFA ? R	ACACAGGACGGCTTGAAGAT	
VEGFR1 ? F	GACCCTCTTTTGGCTCCTTC	<i>Vegfr1</i>
VEGFR1 ? R	CAGTCTCTCCCGTGCAAAC	
VEGFR2 F	GGCGGTGGTGACAGTATCTT	<i>Vegfr2</i>
VEGFR2 R	GAGGCGATGAATGGTGATCT	
Tie2 - F	CCCCTGAACTGTGATGATGA	<i>Tie2</i>
Tie2 - R	CTGGGCAAATGATGGTCTCT	
PDGFR-beta F	TGATGAAGGTCTCCAGAGG	<i>Pdgfrβ</i>
PDGFR-beta R	AGGAGATGGTGGAGGAAGTG	
EPHRINB2 F2	TCCCTTTGTGAAGCCAAATC	<i>efrinaB2</i>
EPHRINB2 R2	TACTTGAGCAGCAGCAGCACCAC	

Tabela 15. Mistura de reação de PCR em tempo real para as amostras em triplicado.

Componentes	Concentração	Volume (µL)
<i>Power SYBER Green Master Mix</i>	-	20
<i>Primers</i>	2µM	1,1
cADN Amostra	400ng	0,81
-95.Água SDW	25	19,2
Volume final		12

Tabela 16. Mistura de reação de PCR em tempo real – controlo negativo.

Componentes	Concentração	Volume (µL)
<i>Power SYBER Green Master Mix</i>	-	6,25
<i>Primers</i>	2µM	0,4
Água SDW	25	5,85
Volume final		12

Tabela 17. Programa de termociclador em tempo real.

Programa	Temperatura (°C)	Tempo (min-seg)
Desnaturação inicial	95	10´
35 ciclos	95	15´´
	60	1´
Dissociação	De acordo com os parâmetros pré-definidos	