

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



Estudo da regulação da angiogénese tumoral pelo H_2O_2
in vivo

Gonçalo Martins da Costa Pereira Rodrigues

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2011

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



Estudo da regulação da angiogénese tumoral pelo H₂O₂
in vivo

Gonçalo Martins da Costa Pereira Rodrigues

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2011

Dissertação orientada por:

Dra. Carla Real Afonso, FCUL-DQB, Lisboa

Agradecimentos

*“Science goes where you imagine it”
Judah Folkman*

Quero agradecer a todas as pessoas que me apoiaram ao longo desta etapa do meu percurso académico.

À minha orientadora, Carla Real Afonso, por me ter guiado continuamente nesta jornada. Pelas discussões importantes, por ter partilhado do meu entusiasmo nas pequenas conquistas e me ter motivado nos momentos mais atribulados.

Ao Laboratório de Microscopia e Análise de Imagem da FCUL pela disponibilização do equipamento de *imaging*, e em especial ao Prof. Gabriel Martins pelos conselhos e ajuda imprescindível na manipulação do equipamento de *imaging* e na análise de dados. Aos professores do GBOA da FCUL, por me terem aceitado no seu grupo, pela ajuda cedida e contribuição de ideias constante ao longo da minha tese. Aos meus colegas de laboratório do GBOA, especialmente à Rita, mas também ao Covas, Daniela, Inês, Xana, João, Juan, Sara, Joana, Rúben e Ana J por me terem aturado e ajudado sempre que precisei. Levo desta experiência boas recordações passadas com todos vós. A todas as pessoas da UMO que me auxiliaram e ensinaram tantas coisas ao longo deste ano, à Rita, Sara, Mariana, e em especial à Lara e ao Fábio da Fish Facility por terem ajudado com os problemas técnicos e tornado mais fáceis e bem-humoradas as minhas tardes de trabalho árduo.

Um agradecimento especial ao Dr. António Jacinto, da UMO (IMM), por ter possibilitado com esta colaboração a realização da parte prática do meu projecto com peixe-zebra. À Dra. Luísa Figueiredo e ao Dr. Domingos Henrique do IMM, pela disponibilização de vários equipamentos.

Aos meus amigos Alexandre, Miguel e Nuno, pela força que me deram e pelos momentos de descontração. Ao *core* da Irmandade da Tese, Francisco, Renata e Susana, que foram uma companhia fundamental para ultrapassar a fase final da tese, mas também à Sofia e ao Duarte! Aos meus restantes amigos da FCUL e colegas de BMG, em especial à Inês, à Joana e ao Miragaia, pelas conversas, discussões e palhaçadas. Ao João Gonçalo pela ajuda vital com o Photoshop.

À minha Mãe, por sempre acreditar nas minhas capacidades, por me aconselhar e apoiar incondicionalmente em todos os momentos da minha vida. À minha Avó por zelar sempre pelo meu bem-estar. À Joana por ser *awesome* e fazer de mim uma pessoa mais feliz.

Obrigado a todos.

Em memória do meu pai.

Resumo

A angiogénese é um processo muito importante na progressão tumoral, permitindo o aporte de oxigénio e nutrientes necessários para o crescimento do tumor. O H_2O_2 é uma espécie reactiva de oxigénio que está actualmente a atrair o interesse dos investigadores pela sua função na regulação de várias vias de sinalização, através da modulação proteica por oxidação. O facto de ter a sua produção elevada nas células tumorais e desempenhar importantes funções no potenciamento da sinalização pelo VEGF e na modulação da actividade de factores de transcrição e de outras proteínas, tornam esta molécula num alvo de estudo importante para a compreensão da angiogénese tumoral.

Para tal, foi estabelecido um modelo de xenotransplante tumoral em embrião de peixe-zebra, que permitiu averiguar o efeito na angiogénese da modulação dos níveis do H_2O_2 nas células tumorais.

Foi verificado que a prevenção da produção de H_2O_2 pelas células tumorais tem dois efeitos distintos e independentes no processo angiogénico: a diminuição do recrutamento vascular e a inibição da invasão vascular no tumor. Para além do efeito na angiogénese tumoral, a diminuição dos níveis de H_2O_2 nas células tumorais é capaz de inibir o recrutamento de macrófagos para o implante tumoral.

Os resultados obtidos permitem concluir que o H_2O_2 influencia diferentes processos celulares essenciais na progressão tumoral. Foi também possível mostrar neste trabalho as vantagens do modelo de peixe-zebra para o estudo da função do H_2O_2 num contexto tumoral. Assim, o H_2O_2 apresenta-se como um importante sinalizador molecular e um promissor alvo terapêutico no tratamento do cancro.

Palavras-chave: H_2O_2 , angiogénese, cancro, terapia, peixe-zebra.

Abstract

Tumor growth is allowed to advance through the process of neoangiogenesis, which allows the transport of the necessary nutrients and oxygen to the tumor. This process is induced by the tumor cells that produce pro-angiogenic factors, being VEGF one of the most important.

It is known that H_2O_2 , a reactive oxygen specie, has an important role in the regulation of signaling pathways by protein modulation. This molecule has the ability to enhance VEGF signaling and also modulates the activity of angiogenic related proteins and transcription factors. Hence, the understanding of the H_2O_2 modulation pathways will unravel new insights for the comprehension of tumor angiogenesis.

In this work, a tumor xenograft model using zebrafish embryos was optimized in order to understand the effects of H_2O_2 levels produced by tumor cells in the neoangiogenesis process.

It is shown here that low levels of H_2O_2 in tumor cells, inhibits independently two major cellular events in the angiogenic process: endothelial cell recruitment and vascular invasion of tumors. In addition to the effects on angiogenesis, H_2O_2 levels in tumor cells are also able to modulate macrophage attraction to the tumor. These results indicate that H_2O_2 produced by tumor cells modulate several cellular processes, which are essential for tumor progression, revealing this molecule as a promising therapeutic target for cancer.

Keywords: H_2O_2 , angiogenesis, cancer, therapy, zebrafish.

Abreviaturas

ANG-1 – do inglês *Angiopoietin-1*

CE – Células Endoteliais

DII – do inglês *Delta-like Ligand*

DMSO – *Dimetilsulfóxido*

dpf – dias pós-fertilização

DPI – do inglês *Diphenyleneiodonium*

ERO – Espécies Reactivas de Oxigénio

FGF – do inglês *Fibroblast Growth Factor*

GFP – do inglês *Green Fluorescent Protein*

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogénio

HIF – do inglês *Hypoxia Inducible Factor*

hpf – horas pós-fertilização

IL-8 – Interleucina-8

MMP-9 – Metaloproteinase da Matriz 9

NOXs – NADPH oxidases

O₂•⁻ – Radical Anião Superóxido

PBS – do inglês *phosphate buffered saline*

PCR – do inglês *Polimerase Chain Reaction*

PDGF – do inglês *Platelet-derived Growth Factor*

PIGF – do inglês *Placental Growth Factor*

PTPs – do inglês *Protein Tyrosine Phosphatases*

PTU – do inglês *Phenylthiourea*

SIV – Veias Sub-Intestinais (do inglês *Sub-Intestinal Veins*)

SOD – Superóxido Dismutase

TSP1 – Trombospondina-1

VEGF – do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*

VEGFR – do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*

Índice

Agradecimentos	II
Resumo	III
Abstract	IV
Abreviaturas.....	V
Introdução	1
1. Angiogénese.....	1
2. Função do H ₂ O ₂ na angiogénese tumoral.....	6
3. Peixe-zebra como modelo de xenotransplante para o estudo da angiogénese tumoral.....	8
Objectivos	10
Procedimentos experimentais	11
1. Cultura de células tumorais e endoteliais de mamífero.....	11
2. Condições de cultura de bactérias.....	12
3. Construção de plasmídeos para expressão da enzima catalase.....	12
4. Diminuição dos níveis de H ₂ O ₂ em células tumorais 4T1.....	13
5. Análise da expressão génica de células tumorais 4T1.....	13
6. Manutenção e visualização de embriões de peixe-zebra.....	14
7. Microinjecção e coloração de embriões de peixe-zebra.....	14
8. Diminuição dos níveis de H ₂ O ₂ em embriões de peixe-zebra	16
9. Análise estatística.....	16
Resultados	17
1. Optimização do modelo de xenotransplante tumoral em embrião de peixe-zebra.....	17
2. Estudo do efeito do H ₂ O ₂ na angiogénese tumoral em embriões xenotransplantados com células tumorais.....	19
3. Estudo do efeito do H ₂ O ₂ no recrutamento de macrófagos para os implantes de células tumorais em embriões xenotransplantados.....	24
4. Análise da expressão génica de células 4T1 com níveis reduzidos de H ₂ O ₂	25
Discussão	26
Considerações finais	28
Perspectivas.....	29
Bibliografia	30

Anexosi

 Materiais e Métodos suplementaresi

 Figuras suplementares.....ii

Introdução

1. Angiogénese

1.1. Desenvolvimento vascular e angiogénese

A vasculatura sanguínea e linfática são estruturas compostas por células endoteliais organizadas sob a forma de extensas redes tubulares que desempenham importantes funções como o transporte de células, nutrientes e outras moléculas através do organismo. Assim, a formação da vasculatura é essencial não só para a vida adulta do organismo como também para o desenvolvimento embrionário, podendo formar-se por dois processos, a vasculogénese, e a angiogénese. A vasculogénese consiste na formação de vasos a partir de progenitores endoteliais, sendo este processo responsável pela formação da rede primitiva de vasos sanguíneos a partir de progenitores endoteliais originários da mesoderme, designados angioblastos (Drake, 2003). Apesar de ser um processo característico do desenvolvimento embrionário, estudos recentes demonstram que o recrutamento de células endoteliais progenitoras pode ocorrer no adulto, tanto em situações fisiológicas como patológicas, durante processos de remodelação vascular (Lyden et al., 2001).

A angiogénese desempenha um papel preponderante na formação de novos vasos sanguíneos no adulto e durante o desenvolvimento embrionário (Risau, 1997). Neste processo as células endoteliais de um vaso já formado são activadas por factores de crescimento, o que leva à perda de contacto entre elas, à perda de adesão das células perivasculares e à degradação da matriz extracelular. Estes eventos permitem a migração das células endoteliais para o espaço perivascular que ao multiplicar-se formam uma coluna, onde mudam de forma e aderem umas às outras originando um lúmen. Na extremidade anterior desta coluna, existe um tipo especializado de célula endotelial caracterizada pela ausência de lúmen e presença de longos filopódios, denominada célula ponta (do inglês *tip cell*) (Gerhardt et al., 2003). Este tipo celular é essencial pela sua capacidade de direccionamento do crescimento do vaso ao encontro do estímulo angiogénico e de se ligar a outros vasos adjacentes, formando desse modo redes vasculares funcionais (Eilken & R. H. Adams, 2010). Após esta fase de destabilização vascular ocorre nova estabilização através da atracção das células perivasculares (Betsholtz, Lindblom, & Gerhardt, 2005; Gerhardt & Betsholtz, 2003) e da formação da membrana basal em torno dos vasos neoformados, o que reduz a proliferação das células endoteliais.

1.2. Regulação molecular do processo angiogénico

A formação de vasos sanguíneos por angiogénese é um processo complexo e controlado a múltiplos níveis (Herbert & Stainier, 2011), no qual o factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF – do inglês *vascular endothelial growth factor*) desempenha a função de principal regulador (Ferrara, Gerber, & LeCouter, 2003). O VEGF foi identificado em 1989 (Leung et al. 1989) e previamente descoberto como factor da angiogénese tumoral (TAF – *tumor angiogenesis factor*) por Folkman em 1971 (Folkman et al. 1971). O VEGF-A é a forma mais ubíqua e sinaliza principalmente através do receptor 2 do VEGF (VEGFR2 - do inglês VEGF receptor 2, ou Flk1), um receptor de cinase de tirosina também denominado por KDR (do inglês *kinase-insert domain-containing receptor*), expresso em células endoteliais e respectivos progenitores (Millauer et al. 1993). Este factor liga-se também ao receptor 1 do VEGF (VEGFR1 ou Flt1) com grande afinidade, embora este tenha uma baixa actividade de cinase de tirosina. O VEGF-A possui várias isoformas que se distinguem pela sua afinidade relativa à matriz extracelular (Ruiz de Almodovar et al., 2010). Outros membros da família do VEGF como o VEGF-B e o factor de crescimento placentário (PlGF – do inglês *placental growth factor*), ligam-se exclusivamente ao VEGFR1. O VEGF-C e VEGF-D para além do VEGFR2 ligam-se também ao receptor 3 do VEGF. Existem no entanto outros co-receptores que embora não sinalizem através das cinases de tirosina são importantes reguladores da angiogénese, como é o caso das neuropilinas (Pellet-Many, Frankel, Jia, & Zachary, 2008) e das efrinas (Kullander & Klein, 2002). A ligação do VEGF aos seus receptores culmina com a activação de cascatas de sinalização de vias como a PLC-MAPK ou o PI3K-AKT, que resultam na indução de genes envolvidos na proliferação e sobrevivência de células endoteliais.

Outros factores secretados como a angiopoietina-1 (ANG-1 – do inglês *angiopoietin-1*) estão também envolvidos no processo angiogénico, ligando-se ao receptor de cinase de tirosina TIE-2 (L.-Y. Li, Barlow, & Metheny-Barlow, 2005). As funções da ANG-1 são mais determinantes na fase de estabilização vascular, no recrutamento de pericitos e na ligação destas células às células endoteliais. A angiopoietina-2 por sua vez possui um papel antagonístico à ANG-1, destabilizando a ligação célula endotelial-pericito. O factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF – do inglês *platelet-derived growth factor*) desempenha importantes funções na indução da proliferação de fibroblastos e no recrutamento das células perivasculares (Andrae, Gallini, & Betsholtz, 2008).

Por outro lado, os factores anti-angiogénicos podem ser enquadrados em duas classes de moléculas, péptidos e proteínas derivadas da matriz extracelular e da membrana basal ou factores de crescimento e citocinas. Ambas possuem actividades anti-angiogénicas gerais como

a inibição da proliferação e migração de células endoteliais, entre outras como a promoção de apoptose ou inibição da síntese proteica. O primeiro inibidor angiogénico descrito foi a trombospondina-1 (TSP1), uma glicoproteína da matriz extracelular que modula a proliferação e mobilidade das células endoteliais (Volpert et al. 1995). Além da TSP1, existe um outro grupo de moléculas inibitórias, derivadas da proteólise de proteínas de maiores dimensões. Entre estas encontram-se a angiostatina (Soff, 2000), fragmento do plasminogénio, a endostatina, a tumestatina e a canstatina, correspondentes a fragmentos resultantes da proteólise de colagénios. Além destas moléculas, citocinas como o interferão- α (IFN- α) possuem actividade anti-angiogenica através da inibição de enzimas que facilitam a remodelação da matriz extracelular como a metaloproteínase da matriz 9 (MMP-9) ou pelo seu efeito na redução da expressão de quimiocinas envolvidas na resposta inflamatória como a interleucina-8 (IL-8) (Rosewicz, Detjen, Scholz, & Von Marschall, 2004).

Para além das vias de sinalização descritas acima referentes a factores secretados, existem factores que regulam o processo angiogénico através do contacto célula-a-célula, como a via de sinalização Notch (Siekman & Lawson, 2007). Estudos em murgancho revelaram o papel essencial desta via de sinalização na ramificação e estabilização da vasculatura formada de novo, tanto no embrião como no adulto (Gale et al. 2004). As células endoteliais expressam os receptores NOTCH1, 3 e 4, bem como os seus ligandos *Delta-like 1* (Dll1), Dll4, Jagged1 e Jagged2. A activação desta via de sinalização leva à hidrólise do fragmento intracelular do receptor que induz a expressão dos repressores de transcrição HES e HEY.

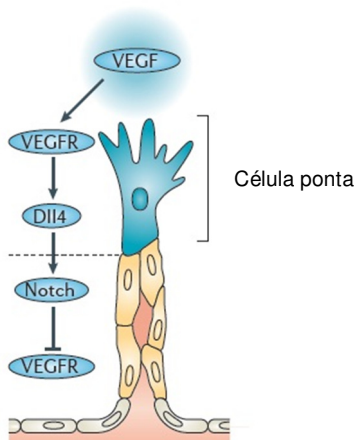


Figura 1: Mecanismo molecular de selecção de célula endotelial ponta pela interacção via Notch-VEGF (adaptado de (Herbert & Stainier, 2011))

De entre os ligandos da via Notch, o Dll4 destaca-se pelo seu papel central na regulação do processo angiogénico. A activação da via de sinalização VEGF induz a expressão do ligando Dll4 que especifica as células endoteliais como células ponta. A expressão deste ligando irá activar a via Notch nas células justapostas impedindo que estas adquiram o mesmo fenótipo (Figura 1). A activação da via Notch via o seu ligando Dll4 limita a ramificação excessiva da vasculatura permitindo a sua maturação e consequente funcionalidade.

A expressão de moléculas pró-angiogénicas é aumentada por determinados factores ambientais ou condições de stress celular como a hipóxia e pela presença de citocinas inflamatórias, e factores de crescimento.

Além destas condições, a regulação da expressão de genes pró-angiogénicos pode também ocorrer devido a alterações na activação de oncogenes ou a perda de função de genes supressores de tumores (Bergers & Benjamin, 2003). A condição de hipóxia de muitos tumores é uma das razões para a expressão generalizada de VEGF como factor angiogénico, uma vez que este é activado pelo factor induzido pela hipóxia (HIF – do inglês *hypoxia inducible factor*) (Pugh & Ratcliffe, 2003). A angiogénese é então um processo fisiológico vital para desenvolvimento normal dos organismos e que também ocorre em situações de stress vascular na fase adulta, como a cicatrização de feridas, e o cancro.

1.3. Angiogénese tumoral

A transformação de uma célula normal em célula cancerígena, marcada pela perda da sua capacidade de divisão controlada, é produto da acumulação de diversas alterações epigenéticas e genéticas como a activação de oncogenes ou a mutação de genes que controlam a proliferação celular (Hahn, W., Weinberg, 2002). Apesar destas alterações serem eventos iniciais críticos para formação de um tumor (Hanahan, Weinberg, & Francisco, 2000), não são suficientes para que ocorra progressão tumoral. Esta impossibilidade dá-se uma vez que o crescimento do tumor está limitado pela disponibilidade de oxigénio e outros nutrientes essenciais. Para ultrapassar este limiar é necessária a indução de uma nova vasculatura tumoral (observado pela primeira vez em 1939 por Ide (Ide et al. 1939), capaz de fornecer nutrientes e metabolitos ao tumor e remover os produtos de excreção segregados pelas células tumorais em rápida proliferação (Algire et al. 1945). Este fenómeno é denominado por *switch* angiogénico (Hanahan & Folkman, 1996).

O *switch* angiogénico garante o crescimento exponencial do tumor e é crucial na transição para fase angiogénica (Figura 2), que sucede ao estado tumoral de dormência, ou estado avascular, no qual o tumor se desenvolve até atingir um estágio em que os níveis de proliferação e apoptose celular se equilibram. A regulação da angiogénese tumoral é feita através do balanço entre factores anti-angiogénicos e pró-angiogénicos. Os tumores possuem uma elevada expressão de factores pró-angiogénicos como o factor de crescimento do fibroblasto (FGF – do inglês *fibroblast growth factor*) e o VEGF, capaz de induzir *per se* a angiogénese de uma vasculatura em estado quiescente (Pettersson et al., 2000), sendo portanto o principal responsável pela activação do *switch*. Apesar dos mecanismos moleculares subjacentes aos processos de angiogénese serem semelhantes, a angiogénese tumoral apresenta características distintas do processo fisiológico, uma vez que nela não existe uma regulação morfológica/temporal do processo nem um balanço equilibrado entre factores pró e

anti-angiogénicos. Estes factores levam à formação de novos vasos morfologicamente irregulares, sem organização e com poucos pericitos associados, factores que em conjunto contribuem para uma rede com fluxo sanguíneo deficiente e permeável (Morikawa et al. 2002).

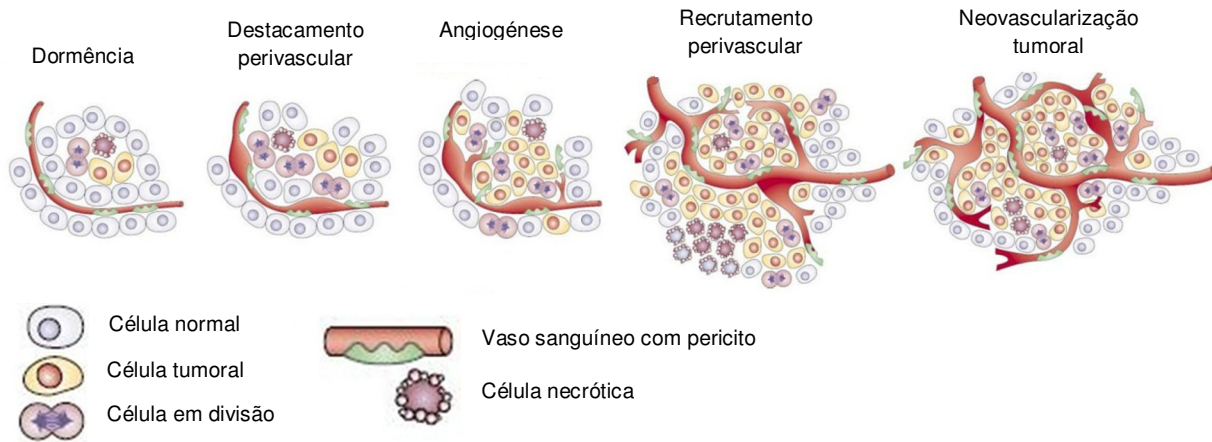


Figura 2: Etapas do *switch* angiogénico

Em vez disso, os vasos sanguíneos neoformados migram em direcção ao estímulo quimiotáctil produzido pelo tumor colonizando-o), e acompanhando o seu crescimento de forma dinâmica. A vasculatura tumoral apresenta um crescimento constante de novos vasos morfologicamente irregulares, sem organização e com poucos pericitos associados, factores que em conjunto contribuem para uma rede com fluxo sanguíneo deficiente e permeável (Morikawa et al. 2002). Outra diferença da angiogénese tumoral é a existência de um microambiente tumoral. O microambiente tumoral é composto não só por células malignas e células endoteliais, mas também por outras células como células do sistema imunitário, que são determinantes no processo angiogénico. Assim, os macrófagos e neutrófilos infiltram os tumores e respondem aos estímulos ambientais produzindo inúmeros factores e citocinas na sua maioria de natureza pró-angiogénica, como o VEGF e a IL-8. Estes factores conduzem a uma reacção inflamatória secundária que leva ao recrutamento de mais células do sistema imunitário que garantem o crescimento tumoral pela produção de factores pró-angiogénicos e pró-inflamatórios. As células do sistema imunitário secretam também proteases como as MMP's, heparinases e elastases, que remodelam a matriz e aumentam a acessibilidade dos factores incluídos nesta. Além das células do sistema imunitário também os pericitos, fibroblastos, células do músculo liso constituem importantes agentes do microambiente tumoral, cujas acções levam no seu conjunto a um aumento da angiogénese tumoral (Harold F Dvorak, Weaver, Tlsty, & Bergers, 2011).

Em suma, a angiogénese desempenha um papel determinante na progressão tumoral uma vez que o processo de neovascularização é essencial tanto numa fase inicial, para que exista um aporte suficiente de oxigénio e nutrientes, como numa fase mais tardia, ao constituir uma via para a disseminação das células tumorais possibilitando a formação de metástases. O facto dos tumores estarem dependentes do fornecimento de sangue para assegurar o seu crescimento tem atraído muitos investigadores para encontrar alvos de inibição no processo de angiogénese como forma de travão à progressão da doença (Ferrara & Kerbel, 2005). O maior impulsionador desta ideia foi o Dr. Judah Folkman, considerado o pai da angiogénese e da sua inibição como forma de terapia para o cancro (Folkman 1971).

2. Função do H_2O_2 na angiogénese tumoral

2.1. Espécies reactivas de oxigénio

As espécies reactivas de oxigénio (ERO) – peróxido de hidrogénio (H_2O_2), radical anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidróxilo (HO^{\cdot}), oxigénio singleto (1O_2), hidroperóxidos orgânicos (ROOH), entre outras – são formas reduzidas da molécula de oxigénio quimicamente reactivas, resultantes do metabolismo aeróbio. A partir de determinadas concentrações as ERO assumem um carácter tóxico, pelo que a célula possui mecanismos enzimáticos capazes de metabolizá-las rapidamente de modo a manter a homeostase celular. Caso contrário, a sua acumulação leva a uma situação de stress oxidativo resultando na alteração de várias biomoléculas, entre as quais as proteínas e o DNA, provocando apoptose celular e contribuindo para o processo de envelhecimento e o desenvolvimento de patologias como o cancro e doenças neurodegenerativas (Finkel, Serrano, & Blasco, 2007; González-Fraguela, Castellano-Benítez, & González-Hoyuela, 2005; Tang & Zhang, 2000). Contudo, estudos recentes têm revelado que em concentrações fisiológicas, estas espécies têm um papel regulador de processos vitais das células. Tem-se observado que existe uma estimulação da produção controlada destas espécies em células saudáveis e o seu envolvimento em mecanismos conhecidos fundamentais para vários processos fisiológicos, revelando deste modo um papel essencial das ERO como finos reguladores de vias de sinalização (Rhee, 1999, 2006; Stone & Yang, 2006).

2.2. Papel do H_2O_2 como sinalizador molecular

O H_2O_2 é a ERO mais abundante *in vivo* e o que possui maior tempo de meia vida. O facto de esta espécie ser relativamente estável e de não apresentar carga confere-lhe a capacidade de percorrer distâncias consideráveis e de difundir-se entre membranas (Antunes and Cadenas 2000). Esta espécie tem, na sua maioria, origem na dismutação do $O_2^{\cdot-}$,

processo que pode ocorrer espontaneamente ou ser catalisado pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Juarez et al., 2008). Uma das principais fontes do $O_2^{\cdot-}$, e consequentemente do H_2O_2 , são a cadeia transportadora de electrões, ao nível da mitocôndria, e as enzimas da membrana celular NADPH oxidases (NOXs), que respondem a estímulos externos (Bartosz, 2009), possibilitando o aumento transiente desta ERO. A eliminação do H_2O_2 dá-se através dos mecanismos de defesa antioxidantes celulares, sendo a catalase e a glutathione peroxidase (GPx) os principais responsáveis pelo consumo do H_2O_2 (Evans & B Halliwell, 1999).

O H_2O_2 é capaz de alterar a função proteica pela sua capacidade química de oxidação selectiva de resíduos de cisteína, mais especificamente a nível dos seus grupos tiol (R-SH). Estas modificações nas cisteínas têm a capacidade, por si só, de desencadear uma alteração na actividade da proteína, a nível da actividade do centro catalítico, da interacção com outras proteínas ou da sua localização subcelular. Pelo facto de os grupos tiol das cisteínas não apresentarem todos a mesma susceptibilidade em serem oxidados confere a selectividade necessária para a sinalização pelo H_2O_2 (Paulsen & Carroll, 2010). Desta forma, a oxidação e redução constitui um mecanismo de regulação de várias vias fisiológicas (Walker et al. 2008) através de modificações pós-traducionais rápidas e reversíveis, de um modo semelhante à fosforilação e desfosforilação, interagindo inclusivamente com esta (Halliwell 2006).

2.3. H_2O_2 e a angiogénese

Nos últimos anos foi revelado o papel fundamental do H_2O_2 na modulação da função das células endoteliais (CE) (Mu, Liu, & R. Zheng, 2010). O H_2O_2 está envolvido não só em processos que regulam a funcionalidade das CEs, como a regulação da proliferação, sobrevivência e apoptose (Cai, 2005; Zanetti, Katusic, & O'Brien, 2002), mas também do processo angiogénico (Ushio-Fukai 2006) e da estabilização da rede vascular. Uma das vias de regulação da angiogénese pelo H_2O_2 é a sua acção na sinalização do VEGF (Miller, Isenberg, & Roberts, 2009). Tal acontece pela inactivação das fosfatases de tirosina (PTPs *do inglês protein tyrosine phosphatases*), que regulam negativamente a sinalização pelo VEGF. A inactivação destas proteínas pelo H_2O_2 acontece pela oxidação das cisteínas reactivas do seu centro activo, favorecendo a fosforilação do VEGFR2 e consequente sinalização. Adicionalmente, observou-se que a produção de H_2O_2 é estimulada pelo VEGF, o que constitui um mecanismo de feedback positivo que permite prolongar o sinal, levando a uma resposta celular amplificada.

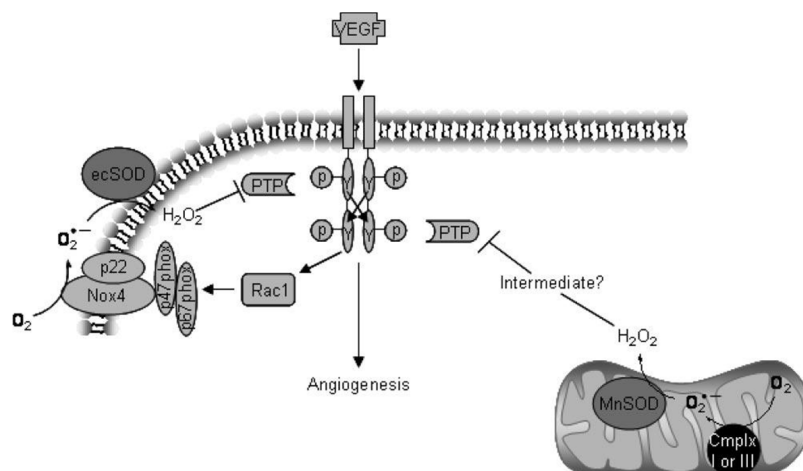


Figura 3: Sinalização pelo VEGF leva à produção de H_2O_2 que inibe as PTPs, criando um mecanismo de *feedback* positivo (adaptado de (Miller et al., 2009))

Adicionalmente, o H_2O_2 é também capaz de regular a angiogénese pela modulação da actividade de determinados factores de transcrição que contribuem para o processo angiogénico, como o NF- κ B (Shono et al. 1996), o Ets-1 e o p53 ou de outras proteínas, como as MMPs. Além das funções do H_2O_2 nas vias de sinalização referidas, a produção elevada desta molécula nas células tumorais (Szatrowski & Nathan, 1991) tem sido relacionada também com outros processos biológicos com efeito na progressão tumoral, como a proliferação celular, a metastização ou a activação da via HIF.

3. Peixe-zebra como modelo de xenotransplante para o estudo da angiogénese tumoral

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é actualmente um dos organismos modelo de vertebrados mais utilizados em investigação científica. Apesar de ter sido inicialmente utilizado para o estudo do desenvolvimento embrionário (Haffter et al., 1996), a identificação da ocorrência de patologias semelhantes às humanas, a grande disponibilidade de ferramentas moleculares e as vantagens a nível de visualização transformaram-no rapidamente num modelo animal com interesse para o estudo de vários processos biológicos na área da biomedicina, entre os quais a cancerígenes. Destas vantagens destacam-se a transparência óptica do embrião e o grande conjunto de linhas transgénicas repórter para diversas moléculas, a permeabilidade a pequenas moléculas que permite o tratamento com compostos moduladores de diversas actividades biológicas e a imaturidade do seu sistema imunitário que diminui a rejeição dos transplantes. Uma das várias estratégias que pode ser utilizada em peixe-zebra para o estudo do cancro é o xenotransplante de células tumorais de mamífero (Moshal, Ferri-Lagneau, & Leung, 2010). O transplante de células tumorais em modelos animais é especialmente útil para o estudo de

fenómenos de invasão e metastização tumoral e de remodelação vascular. Com este procedimento é possível mimetizar *in vivo* as primeiras etapas do desenvolvimento tumoral, e dessa forma analisar o efeito dos factores produzidos pelas células tumorais na regulação da fase inicial do processo de angiogénese tumoral. Além das vantagens que partilha com os outros organismos modelo para o estudo da angiogénese tumoral, como a semelhança do plano vascular embrionário e o desenvolvimento da maioria dos tumores humanos, apresentando inclusivamente com estes semelhanças morfológicas e vias de sinalização comparáveis, o embrião de peixe-zebra oferece vantagens específicas e únicas (Feitsma & Cuppen, 2008) que complementam os modelos de murganho (Couffinhal et al., 1998) e galinha (Ribatti, Vacca, Roncali, & Dammacco, 2000) já estabelecidos.

Objectivos

Estudos realizados utilizando concentrações fisiológicas de H_2O_2 mostraram que esta molécula não actua exclusivamente como agente tóxico, funcionando também como uma molécula reguladora capaz de modular várias funções celulares. Em particular nas células endoteliais, o H_2O_2 tem a capacidade de modular funções como a proliferação e a migração celulares. Por este motivo, é impreterível desvendar os mecanismos moleculares que levam à alteração destas funções celulares, aquando da formação de vasos sanguíneos, para encontrar novas terapias para doenças emergentes como o cancro, enfarte do miocárdio e complicações derivadas da diabetes.

Assim, pretendeu-se com este projecto atingir os seguintes objectivos:

- Optimizar um modelo tumoral em peixe-zebra adequado ao estudo do papel do H_2O_2 na angiogénese tumoral
- Estudar o efeito da redução de H_2O_2 nas células tumorais na angiogénese tumoral e no recrutamento de células do sistema imunitário.
- Estudar o efeito da redução de H_2O_2 no microambiente tumoral na angiogénese tumoral e no recrutamento de células do sistema imunitário

Procedimentos Experimentais

1. Cultura de células tumorais e endoteliais de mamífero

1.1. Condições de cultura celular

Neste estudo foram usadas as linhas celulares humanas HeLa, HCT-15, MCF-7, U251, HUVEC e a linha celular de murganho 4T1 (Quadro 1).

Quadro 1: Origem das linhas celulares utilizadas.

Linha celular	Proveniência	Tipo
HeLa	Humana	Adenocarcinoma cervical
HCT-15		Carcinoma colo-rectal
MCF-7		Adenocarcinoma mamário
U251		Glioblastoma
HUVEC		Endotélio da veia umbilical
4T1	Murganho	Adenocarcinoma mamário

As linhas celulares HeLa, HCT-15, U251 e 4T1 foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) com GlutaMAX (Invitrogen); a linha celular MCF-7 em meio de cultura RPMI 1640 (Thermo scientific); e a linha celular primária HUVEC em meio de cultura EBM-2 (Lonza), em placas de cultura com revestimento 0,2% (m/v) gelatina (Sigma) (ver composições dos meios de cultura em anexo). Todas as células foram mantidas numa estufa a 37 °C, 5% de CO₂ e atmosfera húmida, e foram passadas a cada 2-3 dias dependendo da sua confluência e de modo a mantê-las em crescimento exponencial sob a forma de monocamadas subconfluentes.

1.2. Ensaio angiogénico em matrigel

Para o ensaio angiogénico células 4T1 com sobre-expressão de catalase e controlo (ver procedimento experimental 4.2.) foram misturadas com células HUVEC numa proporção de 1:2, obtendo um número final de 100×10^3 células. As células foram plaqueadas em poços de placas de 24 poços com revestimento de matrigel (growth factor reduced) (BD Biosciences) diluído 1:2 em meio de cultura celular EBM-2 sem factores, previamente colocado durante 30 minutos a 37 °C para solidificar. O meio celular utilizado foi EBM-2 suplementado com VEGF (20 ng/ml), 5 U heparina e 5% (v/v) de soro fetal bovino e as culturas foram observadas no microscópio Olympus CK40, com uma lente de 10x, após 5 horas de incubação na estufa, e fotografadas com a câmara Olympus c-4040 zoom.

2. Condições de cultura de bactérias

A estirpe JM109 de *E. coli* foi cultivada em meio de cultura LB, líquido (triptona 10 g/l; extracto de levedura 5 g/l; NaCl 10 g/l) ou sólido [com 1,5% (m/v) agar], suplementado com o antibiótico ampicilina (100 µg/ml), a 37 °C e com agitação no caso das culturas em meio líquido. Para a conservação de bactérias durante grandes períodos de tempo estas foram congeladas em meio LB suplementado com 15% (v/v) glicerol (Sigma) a -80 °C. Todos os procedimentos que envolveram manipulação de bactérias foram realizados em esterilidade, na proximidade de uma chama.

Quadro 2: Genótipo da estirpe de *E. coli* utilizada.

Estirpe de <i>E. coli</i>	Genótipo
JM109	endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB+ λ (lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB+ lacIq lacZ_M15] hsdR17(rK-mK+)

3. Construção de plasmídeos para expressão da enzima catalase

3.1. Plasmídeos e estratégia de clonagem

Foram construídos os plasmídeos pCS-hcatalase (a partir do plasmídeo pCS2+), para produção de mRNA do gene da catalase e pCF-hcatalase (a partir do plasmídeo pIC112 - 6xHis-Pre-Scission-mRFP) para a expressão da catalase em células de mamífero. A região codificante do gene da catalase humana foi amplificada por reacção de polimerase em cadeia (PCR – do inglês *Polimerase Chain Reaction*) a partir de cDNA extraído de células HeLa, utilizando os seguintes *primers*: CTAGCTAGCCAAACCGCACGCTATGGCTGACAGC; ATCATCAGAGGCCTCGCTAAGCTTCGCTGCACAGGTGC, e uma polimerase de DNA (Phusion-Finnzymes), com actividade de revisão de provas. O amplicão foi isolado de um gel de agarose utilizando o kit NZYGelpure (NZYTech) e hidrolisado utilizando as enzimas de restrição ClaI e StuI (Fermentas). Para a reacção de ligação utilizou-se 40 ng de vector pCS2+ digerido com os mesmos enzimas de restrição e 120 ng de fragmento. A ligação do fragmento ao vector foi feita com a enzima ligase de DNA do fago T4 (Fermentas) e a clonagem foi verificada por sequenciação. Para a construção do plasmídeo pCF-hcatalase foi utilizado o fragmento contendo a sequência de catalase humana obtido pelo PCR do plasmídeo PCS-hcatalase com os mesmos *primers* referidos acima. O produto de PCR foi digerido com a enzima NheI e o plasmídeo pIC112 digerido com as enzimas NheI e EcoRV. As condições da reacção de ligação foram as mesmas que as descritas anteriormente para a construção do plasmídeo pCS-hcatalase. A este procedimento seguiu-se a transformação de bactérias e verificação dos clones recombinantes (ver procedimento experimental 3.2. em anexo).

4. Diminuição dos níveis de H_2O_2 em células tumorais 4T1

4.1. Eliminação do H_2O_2 originado pelas enzimas NAPH oxidases com DPI

As células foram incubadas a 37 °C durante 1 hora com 10 μ M de DPI (do inglês diphenyleneiodonium) (Sigma) ressuspensão em dimetilsulfóxido (DMSO). Após a incubação, o meio de cultura foi removido e substituído por novo. As células controlo foram incubadas nas mesmas condições apenas com DMSO. Para comparar a viabilidade das células tratadas com DPI e controlo foi realizada uma coloração com azul de tripano.

4.2. Sobre-expressão de catalase humana

Para o processo de transformação foram semeadas $\sim 50 \times 10^3$ células 4T1 por cm^2 . As células 4T1 foram transformadas por lipofecção usando o reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Para cada poço, a quantidade de Lipofectamine usada foi de 10 μ l e a quantidade de pCF-hcatalase de 5 μ g. As células controlo foram sujeitas ao mesmo procedimento de transformação mas sem DNA plasmídico adicionado. Para a determinação da actividade da catalase procedeu-se à determinação da constante de consumo de H_2O_2 em células intactas (Antunes and Cadenas 2001), em que se adiciona uma concentração conhecida de H_2O_2 no início do ensaio, neste caso 100 μ M. O consumo de H_2O_2 foi acompanhado ao longo do tempo por medição da concentração de H_2O_2 presente em alíquotas do meio de ensaio, recorrendo ao eléctrodo de oxigénio. A constante de velocidade de consumo, foi determinada pelo declive da equação (k (min^{-1})): $\ln [H_2O_2]_f = -kt + \ln [H_2O_2]_i$.

5. Análise da expressão génica de células tumorais 4T1

Para a análise da expressão génica das células 4T1 tratadas com DPI, células 4T1 com sobre-expressão de catalase e células 4T1 controlo, procedeu-se à extracção do RNA total com o TRI REAGENT (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A síntese do cDNA foi realizado com a enzima RevertAid (Fermentas), de acordo com as instruções do fabricante, a partir de 1 μ g de RNA total, previamente tratado com DNaseI (Fermentas). Os níveis de RNA mensageiro foram medidos por PCR em tempo real com o ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) utilizando *primers* (ver sequências nucleotídicas em anexo) para os seguintes genes de murganho: *dll1*, *dll4*, *jagged1*, *jagged2*, *vegf* e *plgf*. Cada amostra foi analisada em duplicados e os valores de expressão de cada gene foram normalizados face ao valor de expressão do gene da β -actina para cada amostra, e em seguida normalizados face à expressão génica das células tumorais 4T1 controlo correspondentes. Para cada gene foi realizado um poço controlo sem DNA.

6. Manutenção e visualização de embriões de peixe-zebra

6.1. Linhas de peixe-zebra utilizadas e condições de criação

Neste trabalho foi usada a linha transgênica Tg(fli:EGFP), capaz de conduzir a expressão de proteína verde fluorescente (GFP – do inglês green fluorescent protein) em todos os vasos sanguíneos ao longo do desenvolvimento, a partir do promotor fli1. Para os cruzamentos, cada casal foi deixado junto durante a noite em caixas de cruzamento apropriadas e os embriões resultantes recolhidos na manhã seguinte. Os embriões foram mantidos em placas de *petri* com meio embrionário (ver composição em anexo), que foi mudado diariamente. Os embriões Tg(fli:EGFP) são mantidos em heterozigotia, por isso foi necessário seleccionar os embriões GFP positivos às 24 hpf. No estágio de 24 hpf foi também adicionado ao meio embrionário feniltiourea (PTU – do inglês *phenylthiourea*) (Sigma) na concentração de 1,9 μ M, um inibidor da síntese melanina, que torna o embrião praticamente transparente e possibilita uma melhor observação do seu interior. Caso informação contrária, os embriões foram sempre mantidos numa estufa a 28 °C. Os peixes juvenis e adultos foram mantidos num sistema de aquários com água do sistema a 28 °C.

6.2. Visualização de embriões de peixe-zebra

As imagens foram adquiridas com uma Lupa Zeiss Lumar e com um Microscópio Confocal Leica SPE. Para a lupa, os embriões foram colocados numa placa de *petri* com revestimento de agarose 2%, após terem sido anestesiados em Tricaine 0,4 mM (em meio embrionário) e foi utilizada uma lente ApoLumar S 1,2x e uma câmara Zeiss AxioCam ou uma câmara Olympus DP50 (para as imagens a cores), ambas controladas pelo software Axiovision. Para o microscópio confocal os embriões foram colocados em Tricaine 0,4 mM (em meio embrionário) e em seguida montados numa lamela modificada. No confocal foi utilizada uma lente de 20x 0.7NA. As imagens obtidas foram tratadas com o software ImageJ e processadas com o software Adobe Photoshop® CS5 para as figuras em painel.

7. Microinjecção e coloração de embriões de peixe-zebra

7.1. Implantação de células tumorais de mamífero em embriões de peixe-zebra

Para este procedimento 1×10^6 células foram dissociadas enzimaticamente com 0,25% (v/v) tripsina (Thermo scientific) quando se encontravam num estado de subconfluência. As células foram então ressuspensas em 1 ml de tampão de fosfatos salino (PBS – do inglês phosphate buffered saline) com 2 μ l de Dil (Invitrogen) e incubadas a 37 °C durante 5 minutos e depois a 4 °C durante 15 minutos. Após as incubações as células foram lavadas 2 vezes em

PBS, de modo a eliminar o Dil não incorporado. Finalizado o processo de coloração as células foram novamente ressuspensas em PBS de modo a obter uma concentração final aproximada de 40000 células/ μ l. As células foram mantidas em gelo até serem injectadas nos peixes-zebra.

As microinjecções foram tipicamente realizadas em embriões com 48 hpf, previamente anestesiados em Tricaine (Sigma) 0,4 mM (em meio embrionico). Em seguida foram dispostos cuidadosamente numa placa de *petri* com revestimento de gel de agarose 2%.

A agulha foi introduzida no embrião no sentido anterior – posterior, paralela à direcção da cauda, numa zona central à superfície do vitelo, como ilustrado pela figura suplementar 1, em anexo. As células foram depois injectadas com o microinjector (PV 820 Pneumatic Pico Pump (WPI)), utilizando os seguintes parâmetros: 0.75-1 psi (pressão de suporte); 4-8 psi (pressão de ejeção); 100 ms (calibre) e 0,9-1,3 (período). O embrião foi transferido com o auxílio de uma pipeta de plástico para uma placa de *petri* com meio embrionico. No final das injecções os embriões foram passados para uma estufa a 32 °C. As microinjecções foram realizadas numa lupa Leica M165C. As agulhas utilizadas foram produzidas a partir de capilares de vidro borossilicato (Kwik-Fil TM).

7.2. Análise da neovascularização tumoral

A neovascularização tumoral dos embriões implantados com células tumorais foi analisada 24 hpi (ver procedimento experimental 6.2.). Os parâmetros analisados foram o recrutamento vascular para o implante tumoral e a invasão vascular. O recrutamento vascular foi definido pela identificação de vasos sanguíneos que, além de diferirem do padrão fisiológico descrito, estão em contacto com o implante tumoral, a partir de imagens obtidas na lupa de fluorescência. A invasão vascular foi definida pela observação da ingressão de vasos para o interior do perímetro do implante tumoral, em embriões com recrutamento vascular tumoral, a partir de imagens obtidas no microscópio confocal. O fenómeno de invasão vascular foi analisado em maior detalhe em reconstruções tridimensionais das massas celulares tumorais implantadas com recrutamento vascular, a partir das imagens de microscopia confocal. A massa tumoral foi segmentada manualmente usando o programa Amira, V5.3.3 (Visage Imaging) que permitiu depois calcular o volume do tumor e o número dos vasos que invadem cada implante, bem como o seu comprimento.

7.3. Coloração vital de embriões in toto com vermelho neutro

Embriões implantados às 48 hpf com células tumorais foram passados às 24 hpi para poços individuais de placas de 24 poços contendo uma solução de vermelho neutro (2,5mg/ml) em meio embrionário. Após terem sido incubados durante 2 horas à temperatura ambiente, no escuro, foram passados para meio embrionário e o recrutamento dos macrófagos para a massa celular tumoral implantada foi analisado à lupa.

8. Diminuição dos níveis de H_2O_2 em embriões de peixe-zebra

8.1. Eliminação do H_2O_2 originado pelas enzimas NAPH Oxidases com DPI

Os embriões de 48 hpf foram incubados em meio embrionário com 40 μ M de DPI (Sigma), durante 24 horas à temperatura de 32 °C. Como controlo embriões foram incubados nas mesmas condições apenas com DMSO.

8.2. Sobre-expressão de catalase humana

O RNA mensageiro de catalase produziu-se a partir do plasmídeo PCS-hcatalase utilizando a enzima SP6, com o kit mMESSAGE mMACHINE (Ambion), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do RNA mensageiro foi analisada por electroforese, nas mesmas condições que as descritas no procedimento experimental 3.2. A injeção do RNA mensageiro de catalase foi realizada em embriões Tg(fli:EGFP), no estágio de 1 célula. Cada embrião foi injectado na célula única com 1,4 nl de solução de H_2O contendo 50 ng de RNA mensageiro de catalase.

9. Análise estatística

Para a análise estatística foi usado o programa Graphpad Prism 5. Comparações entre resultados experimentais e controlo foram realizadas utilizando o teste t de Student com um nível de confiança de 0.95. Para $p < 0.05$, as diferenças foram consideradas significativas e os valores foram apresentados no respectivo gráfico.

Para cada experiência independente (N) foram analisados em média para a condição experimental e para o controlo: no recrutamento vascular, 40 embriões; na invasão vascular, 5 embriões; na invasão vascular das reconstruções 3D, 1 embrião. As barras de erro dos gráficos relativos a estas análises representam o erro padrão da média.

Resultados

1. Optimização do modelo de xenotransplante tumoral em embrião de peixe-zebra

Determinação das linhas celulares tumorais com maior potencial angiogénico

Os embriões foram injectados com diferentes linhas celulares tumorais com origem humana e de murganho (ver procedimento experimental 1), de modo a seleccionar as que apresentavam maior capacidade de recrutamento vascular para serem utilizadas nas experiências seguintes. Para tal, as células foram coradas com Dil, um corante vital de carácter lipofílico que se integra nas membranas celulares, corando integralmente as células, que são em seguida implantadas por microinjecção (ver procedimento experimental 7.1.) no espaço perivitelino (espaço entre a epiderme e a membrana do vitelo) de um embrião com 48 hpf Tg(fli:EGFP), região que na ausência de estímulos exógenos se manteria avascular. Os peixes-zebra transgénicos Tg(fli:EGFP) possuem as células endoteliais marcadas com a proteína verde fluorescente EGFP. Desta forma, é possível analisar o comportamento das células tumorais implantadas e visualizar o fenómeno de recrutamento dos vasos sanguíneos *in vivo*, durante o período do procedimento experimental. Durante as 24 horas que se seguem à injecção, as células tumorais implantadas produzem localmente factores pró-angiogénicos que afectam o padrão normal de desenvolvimento de um conjunto de vasos que se desenvolve nas proximidades desta região, denominadas veias sub-intestinais (Figura 4A). Em vez de formarem uma rede vascular ao longo do eixo dorsal-lateral que cobre a zona superior do vitelo, os factores produzidos pelas células tumorais induzem a migração e crescimento destes vasos num sentido mais ventral, em direcção ao implante (Figura 4B). Este procedimento foi anteriormente descrito por Nicoli e Presta (Nicoli & Presta, 2007).

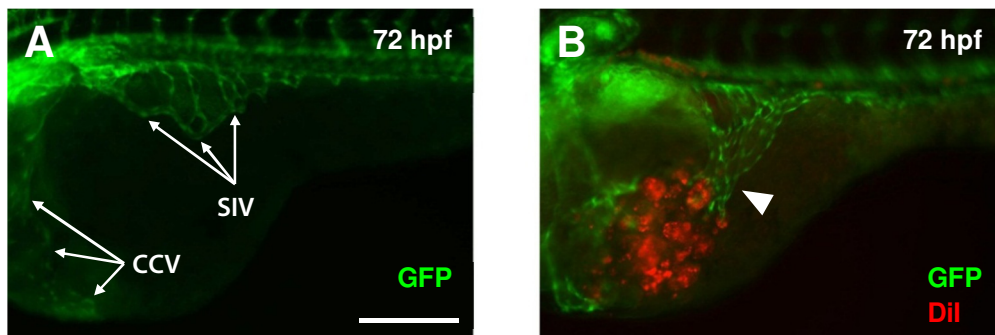


Figura 4: Modelo de xenotransplante tumoral em embrião de peixe-zebra **(A)** Embrião de peixe-zebra transgénico Tg(fli:EGFP) (indicadas com setas brancas no topo da imagem estão as veias sub-intestinais (SIV) e no lado esquerdo as veias comuns cardinais (CCV)); **(B)** Embrião de peixe-zebra transgénico Tg(fli:EGFP) com células tumorais 4T1 implantadas no espaço perivitelino, Δ indica recrutamento vascular para as células implantadas. Barra de escala corresponde a 200 μ m.

O recrutamento vascular para os implantes tumorais das diferentes linhas celulares testadas (Figura 5) foi analisado macroscopicamente na lupa de fluorescência 24 hpi (ver procedimento experimental 6.2.).

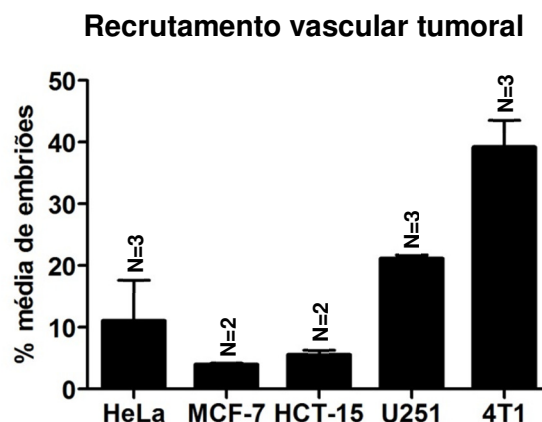


Figura 5: Percentagem média de embriões com recrutamento vascular para as diferentes linhas celulares tumorais.

Como esperado, a intensidade da resposta angiogénica difere consoante a linha celular utilizada. Das linhas celulares testadas, as células de cancro da mama de murganho 4T1 e de glioblastoma humano U251 são as que apresentam potenciais de recrutamento vascular mais elevados, enquanto as células de cancro colo-rectal humano HCT-15 e de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 demonstram ausência de recrutamento vascular em mais de 90% dos embriões injectados. Com base nestes resultados decidiu-se realizar as experiências seguintes com células 4T1 de murganho.

Durante a optimização do modelo de xenotransplante tumoral verificou-se também que alguns implantes de células tumorais localizados no espaço perivitelino recrutaram outros vasos para além das veias sub-intestinais, como as veias comuns cardinais, também denominadas de “ductos de Cuvier”. Este acontecimento verifica-se quando as células tumorais são implantadas numa posição mais ventral e anterior que a pretendida (Figura suplementar 2).

Estudo da cinética de recrutamento dos vasos sanguíneos para o implante

De forma a estudar a cinética de recrutamento dos vasos sanguíneos para o implante foram analisados embriões a 10, 24, 48, 72 e 96 hpi. Foi observado que 10hpi (Figura 6A) já existe recrutamento das veias sub-intestinais para o implante de células 4T1, com contacto físico estabelecido, embora ainda não seja observável na maior parte dos casos invasão vascular das massas celulares implantadas como se observa a partir das 20hpi (Figura 6B).

Nos intervalos de tempo mais tardios, o implante é sequestrado pela rede vascular de veias sub-intestinais, que se torna demasiado complexa para analisar com clareza os fenómenos angiogénicos tumorais. É também de referir que as tensões que o implante sofre devido às alterações morfogénicas e ao crescimento do embrião durante o desenvolvimento até à fase juvenil levam à alteração e falta de coesão do implante (Figura suplementar 3).

A partir destas observações foi estabelecido que 24 hpi seria o tempo ideal para a análise da angiogénese neste modelo, uma vez que permitia não só analisar o processo numa fase inicial mas também comparar o grau de invasão das células endoteliais no implante.

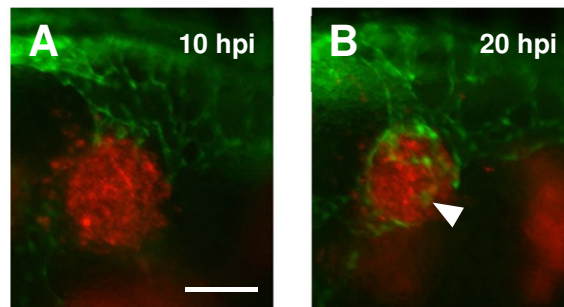


Figura 6: Estado de desenvolvimento das veias sub-intestinais recrutadas por células tumorais 4T1. (A) 10 hpi; (B) 20 hpi, Δ indica invasão vascular tumoral. Barra de escala corresponde a 100 μ m.

Optimização da temperatura de manutenção após injeção

Foram testadas diversas temperaturas (28 °C; 30 °C e 32 °C) de incubação dos embriões pós-injeção, de forma favorecer a viabilidade das células de mamífero implantadas, cuja temperatura ideal é 37 °C. Apesar do embrião ter como temperatura ideal de crescimento 28 °C, estudos anteriores mostraram que embriões mantidos até 35 °C apresentavam ausência de efeitos nocivos, contrariamente ao que se verifica para temperaturas superiores (Haldi et al. 2006). Assim, foi decidido manter os embriões implantados a 32 °C, de forma a aproximarmos da temperatura óptima para as células de mamífero e reduzir o choque térmico nos embriões.

2. Estudo do efeito do H₂O₂ na angiogénese tumoral em embriões xenotransplantados com células tumorais

2.1. Diminuição dos níveis de H₂O₂ nas células tumorais xenotransplantadas através da inativação das enzimas NOXs com DPI

Para determinar o efeito provocado pela ausência de H₂O₂ nas células tumorais implantadas para a angiogénese tumoral *in vivo*, analisou-se em primeiro lugar o efeito provocado pela diminuição de H₂O₂ celular originado pelas enzimas NOXs. Para tal, tratamos

células 4T1 com DPI (ver procedimento experimental 4.1.), um fármaco frequentemente usado como inibidor de flavoproteínas, e mais particularmente das NOXs (Li and Trush 1998).

Análise da neovascularização tumoral

Os parâmetros analisados foram o recrutamento vascular para a massa celular implantada e a sua invasão vascular (ver procedimento experimental 7.2.). A análise do recrutamento vascular demonstrou que não existem diferenças significativas entre o recrutamento de vasos para implantes de células tumorais 4T1 controlo e para implantes de células tumorais 4T1 tratadas com DPI (Figura 7A). A análise da invasão vascular dos implantes com recrutamento revelou que a invasão vascular dos implantes de células 4T1 tratadas com DPI é significativamente menor que a dos implantes de células 4T1 controlo (Figura 7B e C).

Verificou-se também em maior detalhe, com recurso a reconstruções tridimensionais (Figura suplementar 4A e B), que os implantes com recrutamento vascular de células tumorais 4T1 tratadas com DPI apresentam menos vasos invasores do implante tumoral (Figura 8A), e menor dimensão dos mesmos (Figura 8B), sendo estas diferenças significativas relativamente aos implantes de células 4T1 controlo, onde se observam vasos bem definidos e a presença de células ponta que se ramificam internamente no implante tumoral.

Podendo o DPI inactivar outras vias metabólicas essenciais o efeito citotóxico deste composto nas células tumorais foi analisado pela coloração com azul de tripano e verificou-se que não existe diferença significativa entre o controlo e as células tratadas à concentração de 10 μ M.

2.2. Diminuição dos níveis de H_2O_2 nas células tumorais xenotransplantadas através da sobre-expressão de catalase

Para determinar o efeito provocado pela falta de H_2O_2 celular geral nas células tumorais implantadas para a angiogénese tumoral *in vivo*, reduzimos os níveis de H_2O_2 celulares de uma forma mais específica, sobre-expressando catalase humana em células tumorais 4T1 pela transformação com o plasmídeo pCF-hcatalase (ver procedimento experimental 4.2.).

Para garantir a funcionalidade da enzima catalase humana nas células tumorais 4T1 a implantar, analisou-se o consumo de H_2O_2 no eléctrodo de oxigénio destas células, após a transformação. Da análise dos valores de consumo (Figura suplementar 5), observa-se que as células 4T1 transformadas com pCF-hcatalase apresentam maior velocidade de consumo de H_2O_2 que as células controlo, indicando que a catalase exógena está activa.

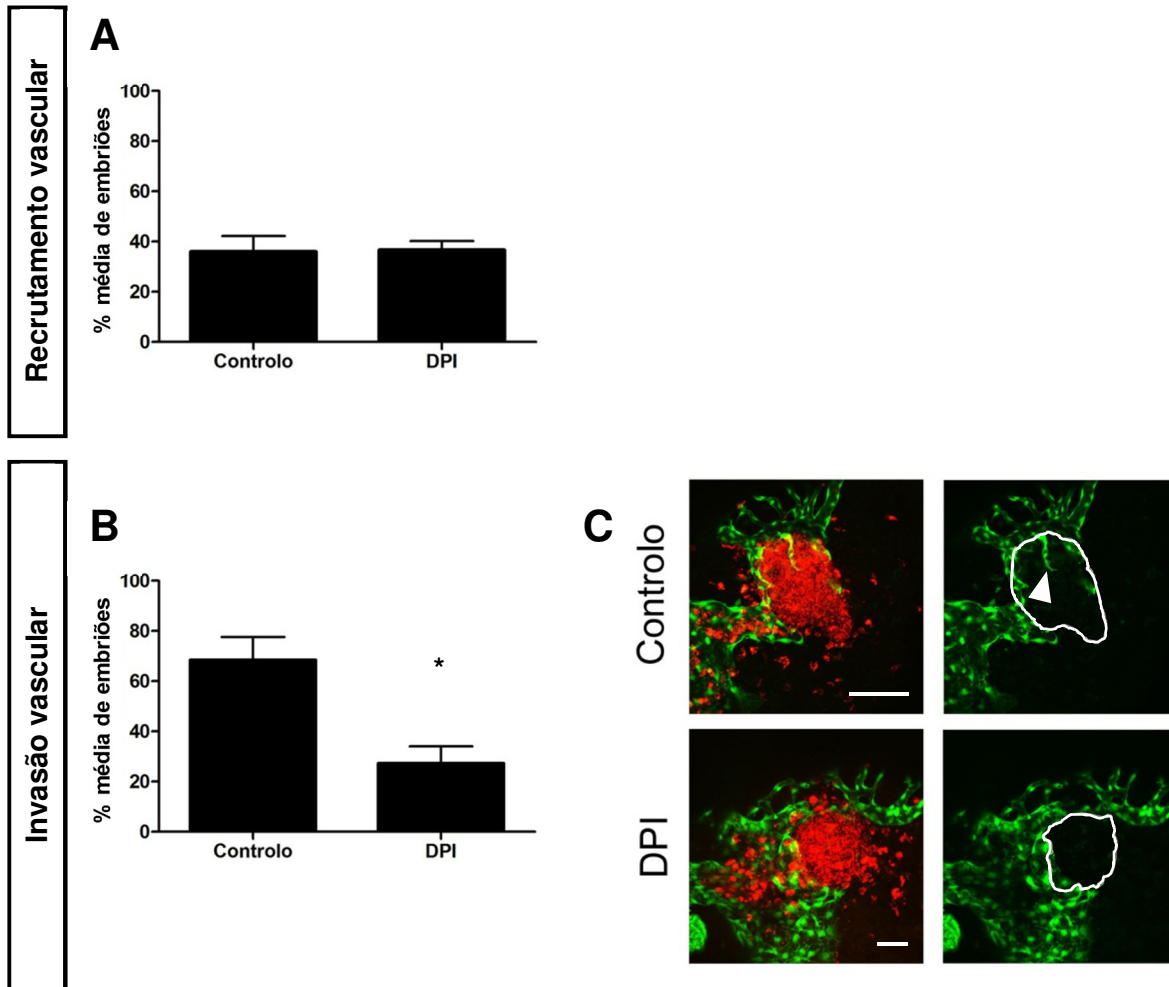


Figura 7: Análise do recrutamento e invasão vascular de implantes tumorais tratados com DPI e controlo **(A)** Percentagem média de embriões injectados que apresentam implantes com recrutamento vascular, N=4; **(B)** Percentagem média de embriões com recrutamento vascular tumoral que apresentam implantes com invasão vascular, N=3 $^*=0.0137$; **(C)** Invasão vascular de implantes de células tumorais 4T1 tratadas com DPI e controlo, o perímetro do tumor encontra-se delineado a branco nas imagens à direita e Δ indica invasão vascular. Barra de escala corresponde a 100 μm no controlo e 200 μm no DPI.

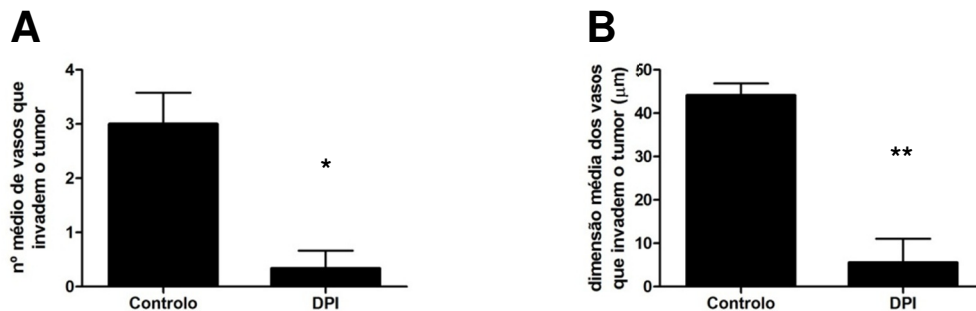


Figura 8: Análise da invasão vascular nas reconstruções tridimensionais de implantes de células 4T1 tratadas com DPI e controlo **(A)** N $^{\circ}$ médio de vasos que invadem implantes tumorais tratados com DPI e controlo, N=3 $^*=0.0161$; **(B)** Dimensão média dos vasos que invadem implantes tumorais tratados com DPI e controlo, N=3 $^{**}=0.0034$.

De forma a investigar se o efeito da diminuição de H_2O_2 nas células tumorais no processo angiogénico ocorre devido à sua acção directa sobre as células endoteliais utilizou-se um ensaio angiogénico *in vitro*, no qual foi estabelecido um sistema de co-cultura de células endoteliais humanas e células 4T1 controlo ou com sobre-expressão de catalase, em matrigel (ver procedimento experimental 1.2.). Da observação microscópica deste sistema (Figura 9A), verificou-se que a presença de células com sobre-expressão de catalase reduz o número de estruturas tubulares formadas pelas células endoteliais humanas HUVEC (Figura suplementar 9B). Estes resultados *in vitro* indicam que a diminuição de H_2O_2 nas células tumorais regula directamente o comportamento das células endoteliais.

Análise da neovascularização tumoral

A análise do recrutamento vascular demonstrou que o recrutamento de vasos para implantes de células tumorais 4T1 com sobre-expressão de catalase é significativamente menor do que para implantes de células tumorais 4T1 controlo (Figura 10A e B). A análise da invasão vascular dos implantes com recrutamento revelou que a invasão vascular dos implantes de células 4T1 com sobre-expressão de catalase é significativamente menor que a dos implantes de células 4T1 controlo (Figura 10C e D).

Verificou-se também em maior detalhe, com recurso a reconstruções tridimensionais (Figura suplementar 4A e C), que os implantes com recrutamento vascular de células tumorais 4T1 com sobre-expressão de catalase apresentam menos vasos invasores do implante tumoral (Figura 11A), e menor dimensão dos mesmos (Figura 11B), sendo estas diferenças significativas relativamente aos implantes de células 4T1 controlo.

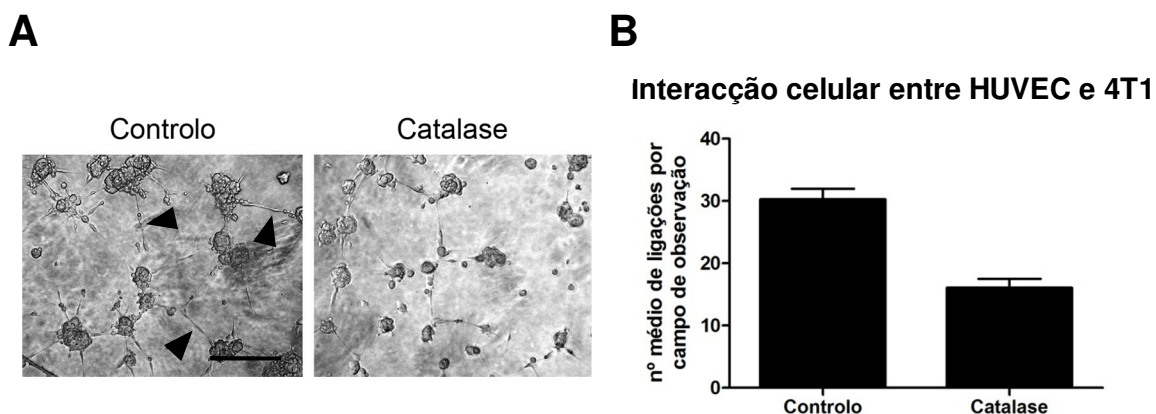


Figura 9: Análise das interacções entre células endoteliais HUVEC e células tumorais 4T1 controlo e com sobre-expressão de catalase **(A)**▲ Interacção entre células endoteliais e tumorais controlo e com sobre-expressão de catalase; **(B)** Número médio de ligações entre células endoteliais e tumorais controlo e com sobre-expressão de catalase por campo de observação, N=2. Barra de escala corresponde a 200 μ m.

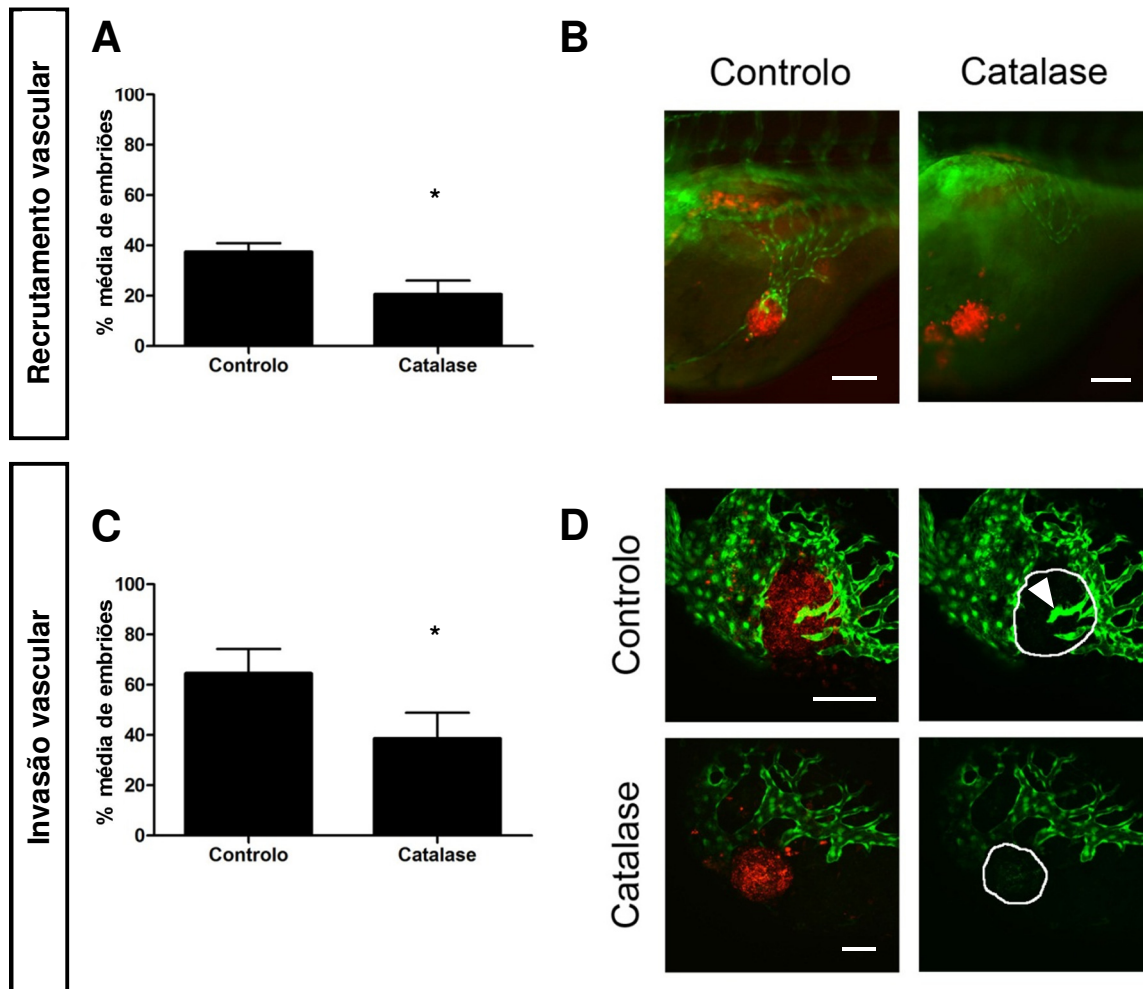


Figura 10: Análise do recrutamento e invaseão vascular de implantes tumorais com sobre-expressão de catalase e controlo **(A)** Percentagem média de embriões injectados que apresentam implantes com recrutamento vascular, N=4 $^*=0.0424$; **(B)** Recrutamento vascular para implantes de células tumorais 4T1 com sobre-expressão de catalase e controlo. Barra de escala corresponde a 100 μm ; **(C)** Percentagem média de embriões com recrutamento vascular tumoral que apresentam implantes com invaseão vascular, N=3 $^*=0.0134$; **(D)** Invaseão vascular de implantes de células tumorais 4T1 com sobre-expressão de catalase e controlo, o perímetro do tumor encontra-se delineado a branco nas imagens à direita e Δ indica invaseão vascular. Barra de escala corresponde a 100 μm .

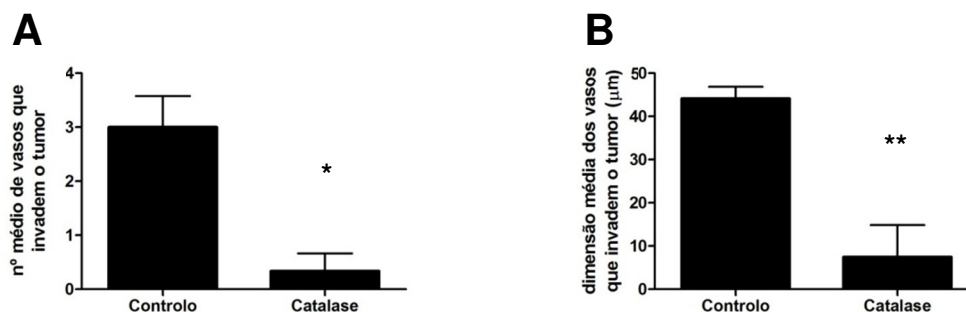


Figura 11: Análise da invaseão vascular nas reconstruções tridimensionais de implantes de células com sobre-expressão de catalase e controlo **(A)** Nº médio de vasos que invadem implantes tumorais com sobre-expressão de catalase e controlo, N=3 $^*=0.0161$; **(B)** Dimensão média dos vasos que invadem implantes tumorais com sobre-expressão de catalase e controlo, N=3 $^{**}=0.0099$.

3. Estudo do efeito do H_2O_2 no recrutamento de macrófagos para os implantes de células tumorais em embriões xenotransplantados

Para visualizar o comportamento dos macrófagos de embriões implantados com células tumorais foi realizada uma coloração com vermelho neutro (ver procedimento experimental 7.3.). O vermelho neutro é um corante vital incorporado pelas células por pinocitose, acumulando-se tipicamente nos lisossomas. Por este motivo, células com grande actividade endocítica, como os macrófagos, ficam preferencialmente corados a vermelho quando observados com luz transmitida. Opcionalmente, também podem ser observados com fluorescência (canal GFP), apresentando-se nesse caso a negro (Figura suplementar 6).

Com esta coloração conseguimos evidenciar os macrófagos que migram para o implante de células tumorais e se concentram à sua volta (Figura suplementar 7), acontecimento que na ausência de implante não se verificaria, estando os macrófagos nesse caso distribuídos na corrente sanguínea e arbitrariamente ao longo do espaço perivitelino (Herbomel, B. Thisse, & C. Thisse, 1999). Este procedimento permite investigar qual a possível acção do H_2O_2 no processo de recrutamento para o implante. Para tal, foi analisada a quantidade de macrófagos na vizinhança de implantes de células tumorais com níveis diminuídos de H_2O_2 . Esta análise foi realizada nos mesmos embriões em que se estudou previamente a neovascularização tumoral.

Análise do recrutamento de macrófagos para implantes tumorais com níveis de H_2O_2 diminuídos

Para verificar o efeito da diminuição de H_2O_2 das células tumorais no processo de recrutamento de macrófagos para o implante tumoral, foi analisada a quantidade de macrófagos na vizinhança de implantes com recrutamento vascular de células controlo, de células tratadas com DPI e de células com sobre-expressão de catalase.

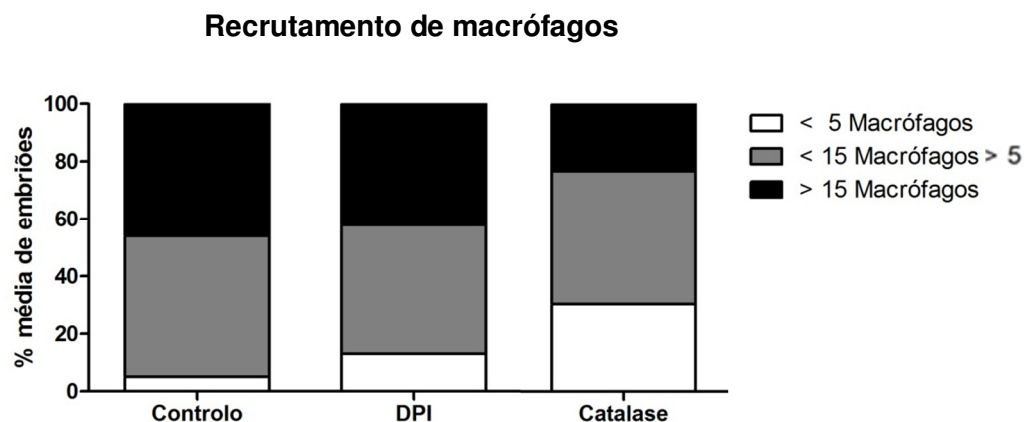


Figura 12: Percentagem média de embriões injectados com células tumorais controlo (N=6), tratadas com DPI (N=3) e com sobre-expressão de catalase (N=3), que apresentam menos de 5 (branco), entre 5 de 15 (cinzento) ou mais de 15 (preto) macrófagos recrutados para o implante tumoral.

Foi observado que a percentagem de embriões com menos de 5 macrófagos recrutados é maior para os implantes de células tratadas com DPI e com sobre-expressão de catalase, sendo a diferença maior nos segundos, face aos embriões controlo. Inversamente, a percentagem de embriões com mais de 15 macrófagos recrutados é menor para os implantes de células tratadas com DPI e com sobre-expressão de catalase, sendo novamente a diferença maior nos segundos (Figura 12).

4. Análise da expressão génica de células 4T1 com níveis reduzidos de H₂O₂

Após ter sido verificado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que a diminuição dos níveis de H₂O₂ nas células tumorais afecta o fenómeno de angiogénese tumoral, a nível do recrutamento (células tumorais com sobre-expressão de catalase) e da invasão vascular (células tumorais tratadas com DPI e células com sobre-expressão de catalase), decidimos determinar possíveis alvos moleculares do H₂O₂. Para isso foi analisada a expressão (ver procedimento experimental 5) dos genes *vegf* e *plgf*, envolvidos no processo de recrutamento vascular, e dos genes *dll1*, *dll4*, *jagged1*, *jagged2*, relacionados com a invasão e ramificação da rede vascular mediada pelo contacto célula-a-célula, em células 4T1 tratadas com DPI (Figura 13A) ou com sobre-expressão de catalase (Figura 13B). Pela análise por PCR em tempo real verificou-se que as células 4T1 tratadas com DPI não apresentam alterações significativas no padrão de expressão dos genes analisados, enquanto nas células 4T1 com sobre-expressão de catalase verifica-se uma diminuição significativa da expressão do *vegf*. Observaram-se também variações na expressão de outros genes, como a diminuição de *jagged1* e o aumento de *dll4* e *jagged2*, que embora não sejam significativas variam no mesmo sentido em todas as experiências.

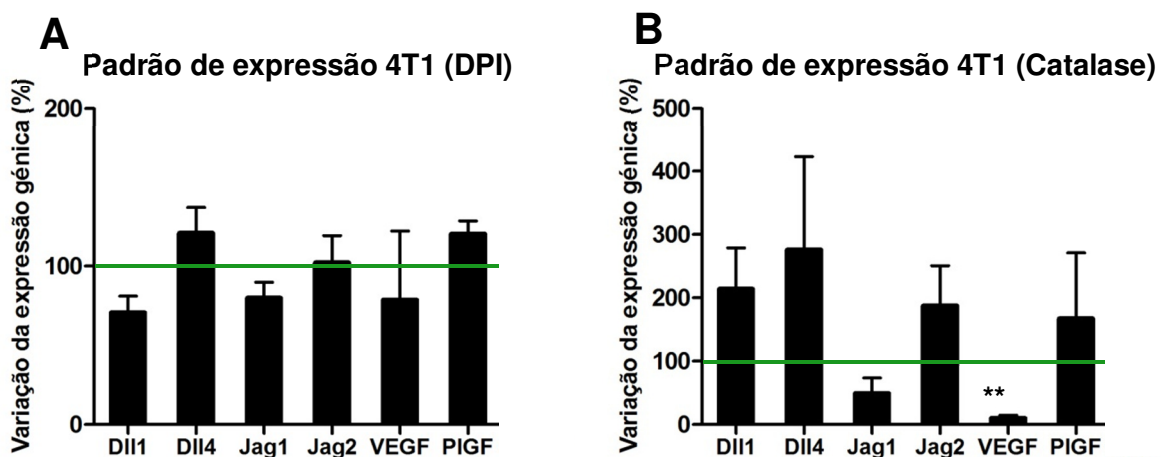


Figura 13: Análise por do padrão de expressão génica de células tumorais 4T1 com níveis reduzidos de H₂O₂, PCR em tempo real. **(A)** Padrão de expressão de células 4T1 tratadas com DPI; N=3 **(B)** Padrão de expressão de células 4T1 com sobre-expressão de catalase, N=3, **=0.0030. Valores de expressão normalizados face ao controlo, representado pela linha a verde.

Discussão

Apesar dos grandes avanços realizados no estudo da angiogénese tumoral, nomeadamente na compreensão das vias que a regulam, ainda existem muitas moléculas cuja função neste processo é desconhecida ou muito limitada, como é o caso do H_2O_2 . Um dos motivos responsáveis pelo atraso no seu conhecimento é o facto de não existirem bons modelos animais que permitam o estudo da sua acção *in vivo* neste processo. Por este motivo, pretendeu-se com este trabalho otimizar um modelo de embrião de peixe-zebra que permitisse revelar o papel regulador do H_2O_2 na angiogénese tumoral e na resposta imunitária tumoral.

Células 4T1 e U251 apresentam grande capacidade de recrutamento vascular no modelo *in vivo* de peixe-zebra

Das linhas celulares testadas, as células de cancro da mama de murgancho 4T1 e de glioblastoma humano U251 foram as células que apresentaram maior potencial de recrutamento vascular. Esta observação resulta do facto destas células serem provavelmente as mais eficientes a produzir factores pró-angiogénicos no embrião de peixe-zebra. Foi também observado, para as células HeLa, que as células implantadas tinham tendência a dispersar-se mais após a injeção (Figura suplementar 8) face às outras linhas celulares testadas, dispondo-se inclusivamente, em alguns casos, sobre as veias sub-intestinais. Por esta razão, esta linha celular pode ter interesse para estudar fenómenos de migração celular e intravasão vascular.

Os implantes de células tumorais tratadas com DPI apresentam menor invasão vascular

O DPI é um fármaco extensivamente utilizado com a finalidade de inibir a produção de H_2O_2 pelas NOXs, e foi utilizado neste estudo como uma abordagem inicial para investigar se a diminuição dos níveis de H_2O_2 de células tumorais teria efeito a nível da angiogénese tumoral. Foi observado que, apesar do tratamento com DPI não afectar o recrutamento vascular, os implantes tumorais constituídos por células tumorais 4T1 tratadas com DPI com recrutamento vascular apresentam invasão vascular significativamente menor que os implantes tumorais controlo, bem como menos vasos invasores e menor dimensão dos mesmos. Este resultado leva a crer que a inibição da produção de H_2O_2 pelas NOXs provocada pelo DPI nas células tumorais leva à alteração da remodelação vascular após contacto dos vasos com as células tumorais ou com o seu microambiente, não afectando no entanto o recrutamento vascular. Uma vez que o H_2O_2 já foi descrito como regulador da expressão génica por vários autores (Thannickal & Fanburg, 2000), foi decidido quantificar a expressão de genes relacionados com

o recrutamento vascular, como o vegf e o plgf, e genes relacionados com a remodelação vascular mediada pelo contacto célula-a-célula, como o dll1, dll4, jagged1 e jagged2. No entanto, foi observado que a expressão destes genes não é alterada pelo tratamento com DPI, indicando que outras vias poderão estar a ser reguladas.

Os implantes de células tumorais com sobre-expressão de catalase apresentam menor recrutamento e menor invasão vascular

A sobre-expressão de catalase nas células tumorais permite averiguar qual o efeito provocado pela diminuição prolongada e específica dos níveis de H_2O_2 na angiogénese tumoral, face ao tratamento com DPI, cujo efeito é menos específico e transitório. Foi observado que os implantes constituídos por células 4T1 com sobre-expressão de catalase apresentam ausência de recrutamento vascular num maior número de casos comparando com implantes constituídos por células controlo. A variabilidade deste resultado deve-se provavelmente à variabilidade do processo de transformação com pCF-hcatalase, uma vez que as células não foram sujeitas a um processo de selecção. Foi também observado que os implantes tumorais com sobre-expressão de catalase que têm recrutamento vascular apresentam invasão vascular significativamente menor que os implantes tumorais controlo, observando-se menos vasos invasores e menor dimensão dos mesmos. Este resultado mostra que a redução dos níveis gerais de H_2O_2 celular provocada pela sobre-expressão da catalase nas células tumorais leva à regulação independente de dois processos importantes na angiogénese: o recrutamento vascular e a remodelação vascular do tumor. Podemos também concluir, através do ensaio de matrigel, que a diminuição de H_2O_2 nas células tumorais regula directamente o comportamento das células endoteliais. A quantificação da expressão de genes relacionados com o processo angiogénico mostrou que as células com sobre-expressão de catalase apresentam uma diminuição significativa da expressão do gene do VEGF, que pode explicar a baixa percentagem de recrutamento vascular para os implantes constituídos por estas células. Adicionalmente verificaram-se variações na expressão de ligandos da via Notch, como a diminuição de jagged1 e o aumento de jagged2 e dll4. Foi mostrado que o aumento da expressão de ligandos da via Notch, em particular do dll4, inibe a angiogénese, ao contrário de jagged1 (Benedito et al., 2009). A variação da expressão destes ligandos aponta para a hipótese do H_2O_2 produzido pelas células tumorais regular a expressão de dll4 (Thurston, Noguera-troise, & Yancopoulos, 2007) e jagged2, favorecendo a invasão e ramificação dos vasos no tumor.

Estes resultados indicam que a diminuição de H_2O_2 pela sobre-expressão de catalase não só leva a uma redução dos níveis de factores pró-angiogénicos secretados responsáveis pelo recrutamento de vasos sanguíneos a longa distância, mas também afecta a produção de factores locais que regulam a remodelação vascular local.

Os níveis de H_2O_2 das células tumorais regulam o recrutamento de macrófagos para o implante tumoral

Durante o desenvolvimento tumoral são recrutadas células do sistema imunitário capazes de regular o crescimento tumoral e o processo angiogénico. Decidiu-se observar o recrutamento de macrófagos para o implante tumoral em condições de redução dos níveis de H_2O_2 nas células tumorais. Foi observado que o número de macrófagos recrutados para o implante tumoral é afectado negativamente pela diminuição dos níveis de H_2O_2 nas células tumorais implantadas, tanto pelo tratamento com DPI como pela sobre-expressão de catalase, embora este efeito seja mais evidente no segundo caso. Este resultado está de acordo com publicações anteriores onde foi sugerido o papel do H_2O_2 como mensageiro directo para a atracção de macrófagos para feridas (Niethammer, Grabher, Look, & Mitchison, 2009) e células tumorais (Y. Feng, Santoriello, Mione, Hurlstone, & Martin, 2010) . No entanto, foi também observado que os embriões que apresentavam implantes tumorais sem recrutamento e/ou invasão vascular possuíam menos macrófagos na vizinhança do implante tumoral (Figura suplementar 9). Esta observação, pode explicar em parte o efeito observado relativamente ao número de macrófagos recrutados em condições de diminuição dos níveis de H_2O_2 .

Considerações finais

Os resultados obtidos neste estudo, com o modelo de embrião de peixe-zebra desenvolvido, permitiram demonstrar *in vivo* que o H_2O_2 produzido pelo tumor é capaz de regular o processo angiogénico tumoral e o recrutamento de células do sistema imunitário. A regulação da expressão de VEGF pelo H_2O_2 observado neste trabalho está de acordo com os resultados obtidos com outras linhas celulares humanas utilizando o murganho e a galinha como modelo animal (Connor et al., 2005; Garrido-Urbani et al., 2011). Assim, foi possível comprovar que o modelo de peixe-zebra se assemelha ao murganho no que diz respeito ao controlo da angiogénese pelo H_2O_2 e que o tipo de células tumorais não é relevante para este efeito. Adicionalmente, foi possível com este modelo distinguir, através da análise das fases iniciais do processo de angiogénese tumoral e do recurso a ferramentas de imagem 3D, que o

efeito do H_2O_2 não se restringe apenas à regulação do VEGF, mas também de outros factores responsáveis pela remodelação vascular. Como foi verificado, os procedimentos que previnem a produção de H_2O_2 pelas células tumorais traduzem-se em menor angiogénese e menor recrutamento de macrófagos, dois eventos que em conjunto atrasam o crescimento do tumor.

No entanto, uma vez que os resultados obtidos com o DPI (inibição da produção próxima da membrana) e a catalase (inibição da produção no citoplasma e peroxissoma) apresentarem diferenças, pode colocar-se a hipótese do local de origem de produção do H_2O_2 ser importante para a sua função. Por estes motivos, o H_2O_2 apresenta-se como um alvo terapêutico promissor no tratamento do cancro e o modelo de peixe-zebra estabelecido apresenta vantagens importantes na pesquisa e determinação de estratégias que visem a inibição da progressão tumoral pela modulação dos níveis de H_2O_2 , produzido em diferentes localizações subcelulares pelas diversas células que intervêm neste processo.

Perspectivas

No futuro, pretende-se identificar outras vias de sinalização afectadas pelo H_2O_2 nas células tumorais. Para isso realizar-se-á uma análise do transcriptoma das células com sobre-expressão de catalase pela técnica de *microarray*. Irá também proceder-se à produção de peixes-zebra transgénicos capazes de sobre-expressar catalase de uma forma indutível em tecidos específicos de forma a avaliarmos a importância do H_2O_2 produzido por cada componente do microambiente tumoral, uma vez que foi observado em estudos preliminares que a diminuição dos níveis H_2O_2 nos embriões pelo tratamento com DPI (Figura suplementar 10) ou pela sobre-expressão de catalase (Figura suplementar 11) traduz-se em menor invasão vascular tumoral. Além da angiogénese tumoral, o recrutamento de macrófagos também demonstrou ser afectado em embriões com níveis diminuídos de H_2O_2 pelo tratamento com DPI (Figura suplementar 12).

Bibliografia

- Algire GH, Chalkley HW, Legallis FY, Park HD. J Natl Cancer Inst. 1945;6:73-85.
- Andrae, J., Gallini, R., & Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & Development*, 1276-1312.
- Antunes, F., & Cadenas, E. (2000). Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS letters*, 475(2), 121-6.
- Antunes, Fernando, & Cadenas, Enrique. (2001). Cellular titration of apoptosis with steady state induce apoptosis through fenton chemistry independent of the cellular thiol state. *Science*, 30(9), 1008 - 1018.
- Bartosz, G. (2009). Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochemical Pharmacology*, 77(8), 1303-1315.
- Benedito, R., Roca, C., Sørensen, I., Adams, S., Gossler, A., Fruttiger, M., & Adams, R. H. (2009). The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell*, 137(6), 1124-35.
- Bergers, G., & Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews. Cancer*, 3(6), 401-10.
- Betsholtz, C., Lindblom, P., & Gerhardt, H. (2005). Role of pericytes in vascular morphogenesis. *Exs*, (94), 115-25.
- Cai, H. (2005). Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovascular research*, 68(1), 26-36. doi:10.1016/j.cardiores.2005.06.021
- Connor, K. M., Subbaram, S., Regan, K. J., Nelson, K. K., Mazurkiewicz, J. E., Bartholomew, P. J., Aplin, A. E., et al. (2005). Mitochondrial H₂O₂ regulates the angiogenic phenotype via PTEN oxidation. *The Journal of biological chemistry*, 280(17), 16916-24.
- Couffinhal, T., Silver, M., Zheng, L. P., Kearney, M., Witzembichler, B., & Isner, J. M. (1998). Mouse model of angiogenesis. *The American journal of pathology*, 152(6), 1667-79.
- Drake, C. J. (2003). Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*, 69(1), 73-82.
- Dvorak, Harold F, Weaver, V. M., Tlsty, T. D., & Bergers, G. (2011). Tumor microenvironment and progression. *Journal of Surgical Oncology*, 103(6), 468-474. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.
- Eilken, H. M., & Adams, R. H. (2010). Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Current opinion in cell biology*, 22(5), 617-625. Elsevier Ltd.
- Evans, P., & Halliwell, B. (1999). Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 884, 19-40.
- Feitsma, H., & Cuppen, E. (2008). Zebrafish as a cancer model. *Molecular cancer research : MCR*, 6(5), 685-94.
- Feng, Y., Santoriello, C., Mione, M., Hurlstone, A., & Martin, P. (2010). Live imaging of innate immune cell sensing of transformed cells in zebrafish larvae: parallels between tumor initiation and wound inflammation. *PLoS biology*, 8(12), e1000562.
- Ferrara, N., & Kerbel, R. S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, 438(7070), 967-74.
- Ferrara, N., Gerber, H.-P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*, 9(6), 669-76.
- Finkel, T., Serrano, M., & Blasco, M. A. (2007). The common biology of cancer and ageing. *Nature*, 448(7155), 767-774. Nature Publishing Group.
- Garrido-Urbani, S., Jemelin, S., Deffert, C., Carnesecchi, S., Basset, O., Szyndralewicz, C., Heitz, F., et al. (2011). Targeting vascular NADPH oxidase 1 blocks tumor angiogenesis through a PPAR α mediated mechanism. *PloS one*, 6(2), e14665.
- Gerhardt, H., & Betsholtz, C. (2003). Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell and tissue research*, 314(1), 15-23.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., et al. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of Cell Biology*, 161(6), 1163-1177. The Rockefeller University Press.
- González-Fraguela, M. E., Castellano-Benítez, O., & González-Hoyuela, M. (2005). Oxidative stress in neurodegeneration. *Revista de Neurología*, 28(5), 504-511.

- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. a, Odenthal, J., et al. (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development (Cambridge, England)*, 123, 1-36.
- Hahn, W., Weinberg, R. (2002). Rules For Making Human Tumor Cells. *New England Journal of Medicine*, 347(20), 1593-1603.
- Halliwell, Barry. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 312-322.
- Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353-364.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., & Francisco, S. (2000). The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. *Hormone Research*, 100, 57-70.
- Herbert, S. P., & Stainier, D. Y. R. (2011). Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(9), 551-564. Nature Publishing Group.
- Herbomel, P., Thisse, B., & Thisse, C. (1999). Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development (Cambridge, England)*, 126(17), 3735-45.
- Juarez, J. C., Manuia, M., Burnett, M. E., Betancourt, O., Boivin, B., Shaw, D. E., Tonks, N. K., et al. (2008). Superoxide dismutase 1 (SOD1) is essential for H₂O₂-mediated oxidation and inactivation of phosphatases in growth factor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(20), 7147-52.
- Kullander, K., & Klein, R. (2002). Mechanisms and functions of eph and ephrin signalling. *Cell*, 3(7), 475-486.
- Li, L.-Y., Barlow, K. D., & Metheny-Barlow, L. J. (2005). Angiopoietins and Tie2 in health and disease. *Pediatric endocrinology reviews PER*, 2(3), 399-408.
- Li, Y., & Trush, M. a. (1998). Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. *Biochemical and biophysical research communications*, 253(2), 295-9.
- Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., Chadburn, a, et al. (2001). Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nature medicine*, 7(11), 1194-201.
- Miller, T. W., Isenberg, J. S., & Roberts, D. D. (2009). Molecular regulation of tumor angiogenesis and perfusion via redox signaling. *Chemical reviews*, 109(7), 3099-124.
- Moshal, K. S., Ferri-Lagneau, K. F., & Leung, T. (2010). Zebrafish model: worth considering in defining tumor angiogenesis. *Trends in cardiovascular medicine*, 20(4), 114-9. Elsevier Inc.
- Mu, P., Liu, Q., & Zheng, R. (2010). Biphasic regulation of H₂O₂ on angiogenesis implicated NADPH oxidase. *Cell Biology International*, 34(10), 1013-1020.
- Nicoli, S., & Presta, M. (2007). The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay. *Nature protocols*, 2(11), 2918-23.
- Niethammer, P., Grabher, C., Look, a T., & Mitchison, T. J. (2009). A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*, 459(7249), 996-9. Nature Publishing Group.
- Paulsen, C. E., & Carroll, K. S. (2010). Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *ACS chemical biology*, 5(1), 47-62.
- Pellet-Many, C., Frankel, P., Jia, H., & Zachary, I. (2008). Neuropilins: structure, function and role in disease. *The Biochemical journal*, 411(2), 211-26.
- Pettersson, a, Nagy, J. a, Brown, L. F., Sundberg, C., Morgan, E., Jungles, S., Carter, R., et al. (2000). Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 80(1), 99-115.
- Pugh, C. W., & Ratcliffe, P. J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature Medicine*, 9(6), 677-684.
- Rhee, S. G. (1999). Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Experimental molecular medicine*, 31(2), 53-59.
- Rhee, S. G. (2006). H₂O₂, a Necessary Evil for Cell Signaling. *Science*, 312(5782), 1882-3. American Association for the Advancement of Science, 1333 H St, NW, 8 th Floor, Washington, DC, 20005, USA.

- Ribatti, D., Vacca, a, Roncali, L., & Dammacco, F. (2000). The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on anti-angiogenesis. *Current pharmaceutical biotechnology*, 1(1), 73-82.
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386(6626), 671-674. Nature Publishing Group.
- Rosewicz, S., Detjen, K., Scholz, A., & Von Marschall, Z. (2004). Interferon-alpha: regulatory effects on cell cycle and angiogenesis. *Neuroendocrinology*, 80 Suppl 1, 85-93.
- Ruiz de Almodovar, C., Coulon, C., Salin, P. A., Knevels, E., Chounlamountri, N., Poesen, K., Hermans, K., et al. (2010). Matrix-binding vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms guide granule cell migration in the cerebellum via VEGF receptor Flk1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(45), 15052-66.
- Siekman, A. F., & Lawson, N. D. (2007). Notch signalling and the regulation of angiogenesis. *Cell adhesion migration*, 1(2), 104-106. Landes Bioscience.
- Soff, G. A. (2000). Angiostatin and angiostatin-related proteins. *Cancer metastasis reviews*, 19(1-2), 97-107.
- Stone, J. R., & Yang, S. (2006). Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxidants redox signaling*, 8(3-4), 243-270. Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA.
- Szatrowski, T. P., & Nathan, C. F. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Research*, 51(3), 794-798.
- Tang, J., & Zhang, J. H. (2000). Mechanisms of $[Ca^{2+}]_i$ elevation by H_2O_2 in islets of rats. *Life Sciences*, 68(4), 475-481.
- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 279(6), L1005-28.
- Thurston, G., Noguera-troise, I., & Yancopoulos, G. D. (2007). less tumour growth. *Cancer*, 7(May), 327-332.
- Zanetti, M., Katusic, Z. S., & O'Brien, T. (2002). Adenoviral-mediated overexpression of catalase inhibits endothelial cell proliferation. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*, 283(6), H2620-H2626.

Anexos

Materiais e Métodos suplementares

1.1. Condições de cultura celular

Composição dos meios de cultura:

- Meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) com GlutaMAX (Invitrogen), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (inativado por temperatura e filtrado) (Invitrogen), penicilina (100 unidades/ml) (Thermo scientific) e estreptomicina (100µg/ml) (Thermo scientific).
- Meio de cultura RPMI 1640 (Thermo scientific), suplementado com glutamina (2mM) (Thermo scientific) e soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina (em concentrações iguais às referidas para o meio celular anterior).
- Meio de cultura EBM-2 (Lonza) suplementado com EGM-2 SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factor (Lonza), e 5% (v/v) de soro fetal bovino (Thermo scientific).

3.2. Transformação de bactérias e verificação de clones recombinantes

De forma a isolar o plasmídeo recombinante foram transformadas bactérias com o produto da reacção de ligação. Para isso foram utilizadas bactérias competentes JM109. As bactérias competentes contendo a mistura da reacção de ligação foram colocadas no gelo durante 20 minutos, após os quais foram submetidas a um choque térmico de 90 segundos a 42 °C seguidos de 2 minutos no gelo. Seguidamente adicionou-se 600 µl de meio líquido LB e incubou-se as bactérias durante 1 hora a 37 °C numa estufa com agitação, para permitir a expressão do gene de resistência à ampicilina. Após este período centrifugaram-se as bactérias a 7000 rpm durante um minuto, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado de células em 100 µl de LB, que foram posteriormente plaqueados numa caixa de *petri* com meio sólido LB-Agar suplementado com ampicilina, deixada em posição invertida a 37 °C durante a noite. As colónias obtidas foram amplificadas em meio sólido LB-Agar suplementado com ampicilina, de forma a identificar os clones positivos através do procedimento de “cracking”. Este método consiste na obtenção de um lisado de uma colónia pela sua dissolução em 20 µl de um tampão composto por NaOH 50 mM; 0,5% (m/v) SDS e EDTA 5 mM. Em seguida incubou-se o lisado durante 30 minutos a 55 °C e levou-se ao vortéx durante um minuto na velocidade máxima. Por fim, foi adicionado um volume apropriado de tampão de amostra e analisaram-se os lisados num gel de agarose de 1% em tampão TAE, a 100V, paralelamente ao vector vazio pIC112, que serve de controlo. A avaliação dos clones positivos

foi realizada pela análise de diferenças na migração relativamente ao vector vazio. Os plasmídeos positivos foram então confirmados pela análise por electroforese em gel de agarose do perfil de bandas formado pela hidrólise enzimática.

5. Análise da expressão génica de células tumorais 4T1

Sequências dos primers utilizados no PCR:

DII1	DII1 F DII1 R	TTGAAGCCCTCCATACAGACTCT TGGTCAGGCGGCTGATG
DII4	DII4 F DII4 R	TTTGTGACCAAGATCTCAACTACTGTAC CTTTGGCCCACTGTTGGAA
Jag1	Jag1 F Jag1 R	CCAGCCAGTGAAGACCAAGT TCAGCAGAGGAACCAGGAAA
Jag2	Jag2 F Jag2 R	GAGGTCAAGGTGGAAACAGT TGTCCACCATACGCAGATAA
VEGF	VEGF F VEGF R	GCGGGCTGCCTCGCAGTC TCACCGCCTTGGCTTGTCAC
PLGF	PLGF F PLGF R	CTTGAAGGACCTTGGCTCTG ACCCACACTTCGTTGAAAG
β-actin	β -actinF β -actinR	AGCCATGTACGTAGCCATCC CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA

6.1. Linhas de peixe-zebra utilizadas e condições de criação

Composição do meio embrionário:

Solução stock 50x (diluído em do sistema): 14,69g NaCl; 0,63g KCl; 2,43g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 4,07g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; e com 1ml de uma solução de azul de metileno ($6,6 \times 10^{-3}$ g/l) para cada 10 litros.

Figuras suplementares

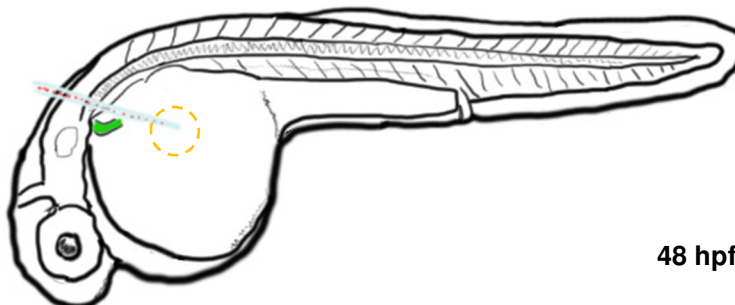


Figura S1: Local de injeção das células tumorais num embrião de 48 hpf. A agulha (azul) é introduzida no embrião no sentido antero-posterior e as células tumorais (vermelho) são implantadas no espaço perivitelino, numa zona (amarelo) próxima às veias sub-intestinais (verde) em desenvolvimento.

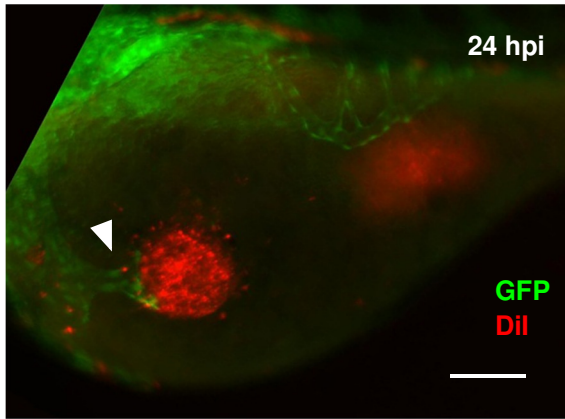


Figura S2: Recrutamento da veia comum cardinal (Δ), para implante tumoral de células 4T1. Barra de escala corresponde a 100 μm .

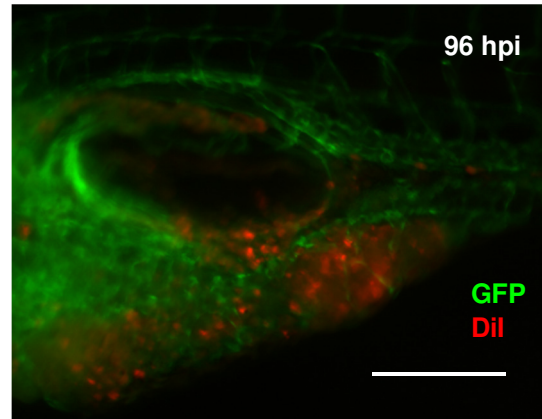


Figura S3: Estado de desenvolvimento dos vasos sanguíneos e de implante tumoral de células tumorais 4T1, com recrutamento vascular, às 96 hpi. Barra de escala corresponde a 200 μm .

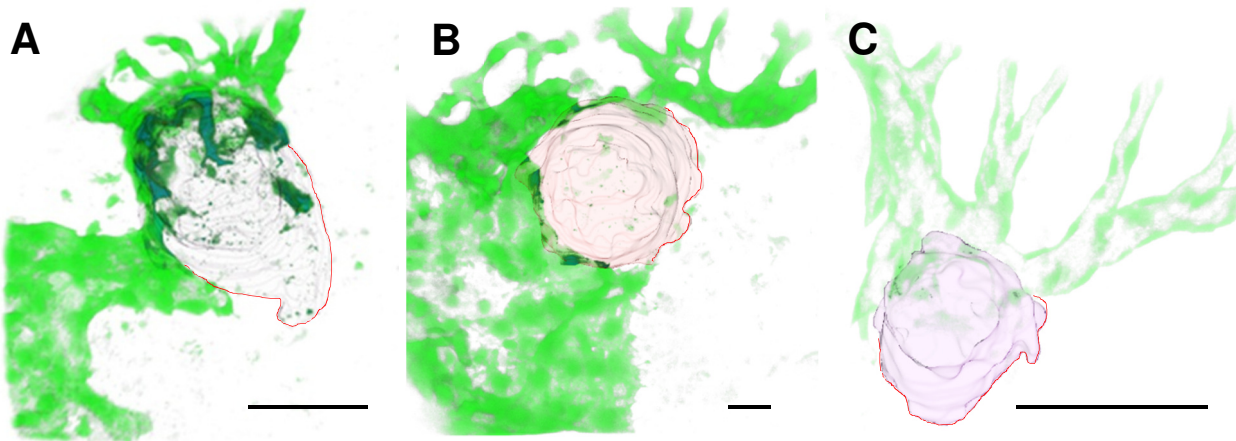


Figura S4: Análise de reconstruções tridimensionais dos vasos sanguíneos invasores (verde escuro) e dos vasos sanguíneos recrutados (verde) de implantes tumorais (rosa claro), constituídos por células 4T1 controle (A); células 4T1 tratadas com DPI (B); e células 4T1 com sobre-expressão de catalase (C). O perfil de determinadas zonas das reconstruções tridimensionais dos implantes tumorais foram delineados a vermelho para melhor distinção dos seus limites. Barra de escala corresponde a 100 μm .

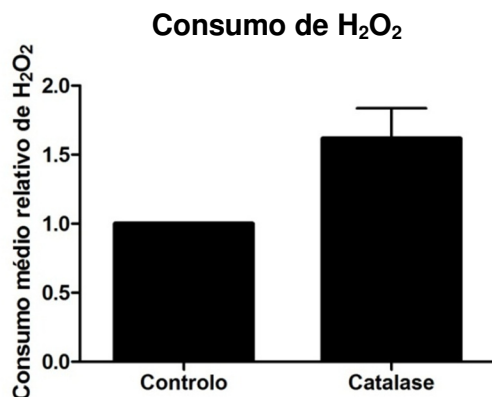


Figura S5: Consumo relativo de H_2O_2 obtido a partir das velocidades médias de consumo de células 4T1 controlo e células 4T1 com sobre-expressão de catalase, N=4.

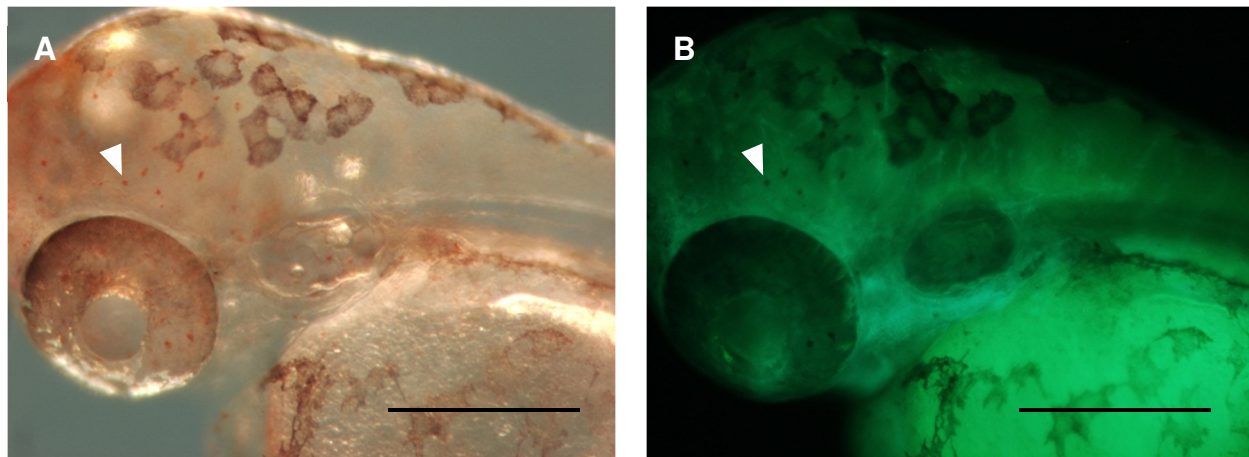


Figura S6: Marcação para o vermelho neutro em embriões com 72 hpf. Visualização em luz transmitida **(A)** e em fluorescência (canal GFP) **(B)**. Δ Indica macrófagos. Barra de escala corresponde a 250 μm .

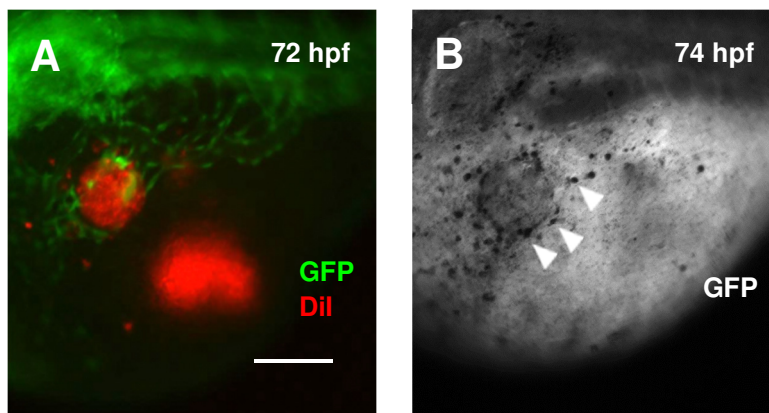


Figura S7: Observação dos macrófagos na vizinhança do implante tumoral **(A)** Recrutamento vascular para o implante de células tumorais 4T1 controle; **(B)** Recrutamento de macrófagos para o implante tumoral. Δ indica macrófago próximo do tumor. Barra de escala corresponde a 100 μm .

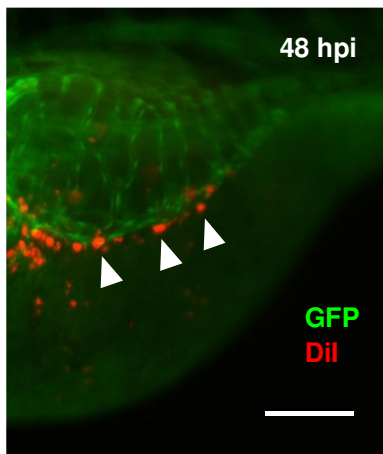


Figura S8: Δ Células tumorais HeLa dispostas sobre as veias sub-intestinais de um embrião implantado às 48 hpf. Barra de escala corresponde a 100 μ m.

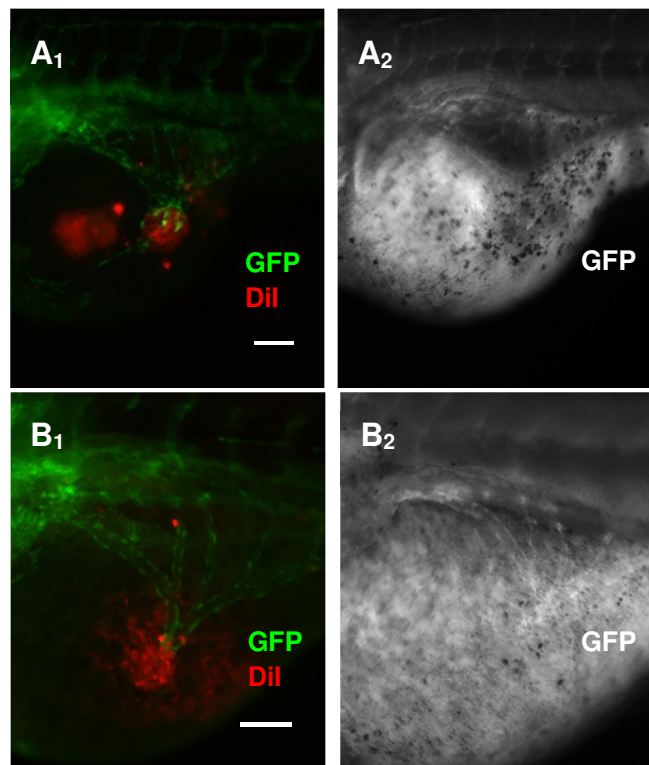


Figura S9: Observação do recrutamento de macrófagos para implante de células 4T1 com invasão vascular (**A**) e sem invasão vascular (**B**), 24 hpi. Barra de escala corresponde a 100 μ m.

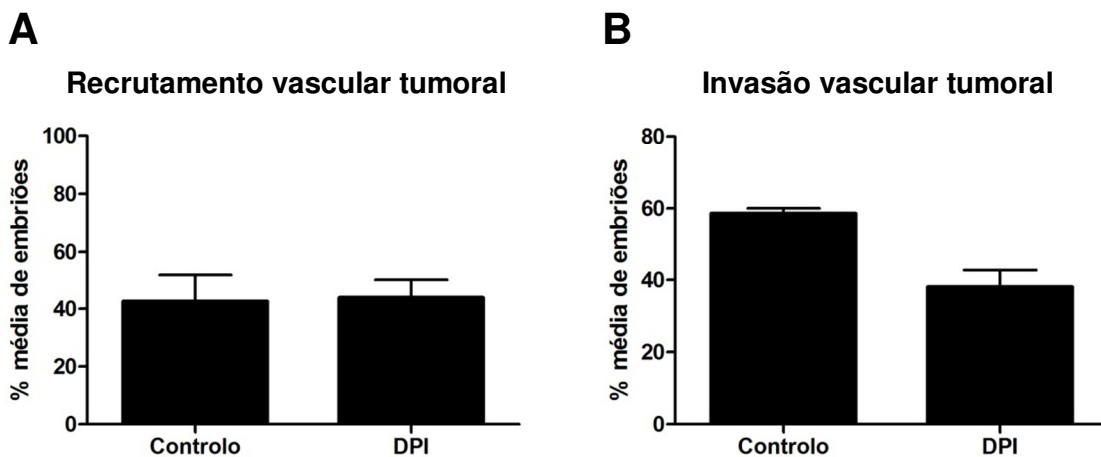


Figura S10: Análise do recrutamento e invasão vascular de implantes tumorais em embriões tratados com DPI (ver procedimento experimental 8.1.), e controlo (**A**) Percentagem média de embriões injectados que apresentam implantes com recrutamento vascular, N=2; (**B**) Percentagem média de embriões com recrutamento vascular tumoral que apresentam implantes com invasão vascular, N=2.

Nota figura S10: Como controlo para o tratamento com DPI foram utilizados embriões que foram sujeitos a uma solução de DMSO à mesma concentração da utilizada na solução de DPI, de modo a excluir potenciais efeitos derivados da toxicidade a este composto.

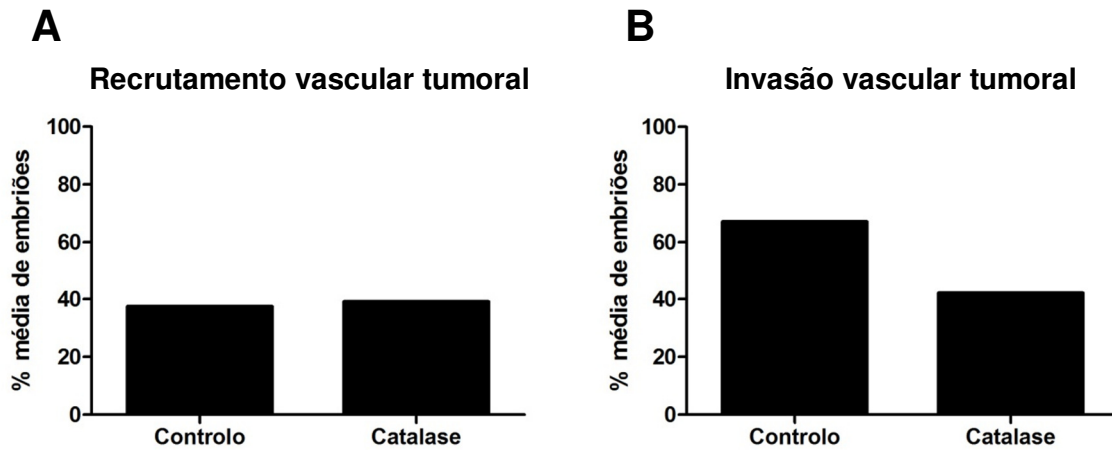


Figura S11: Análise do recrutamento e invasão vascular de implantes tumorais em embriões com sobre-expressão de catalase (ver procedimento experimental 8.2.), e controlo **(A)** Percentagem média de embriões injectados que apresentam implantes com recrutamento vascular, N=1; **(B)** Percentagem média de embriões com recrutamento vascular tumoral que apresentam implantes com

Nota figura S11: Como controlo para a sobre-expressão de catalase foram utilizados embriões implantados com células tumorais 4T1 que não foram injectados com RNA mensageiro de catalase no estágio de 1 célula.

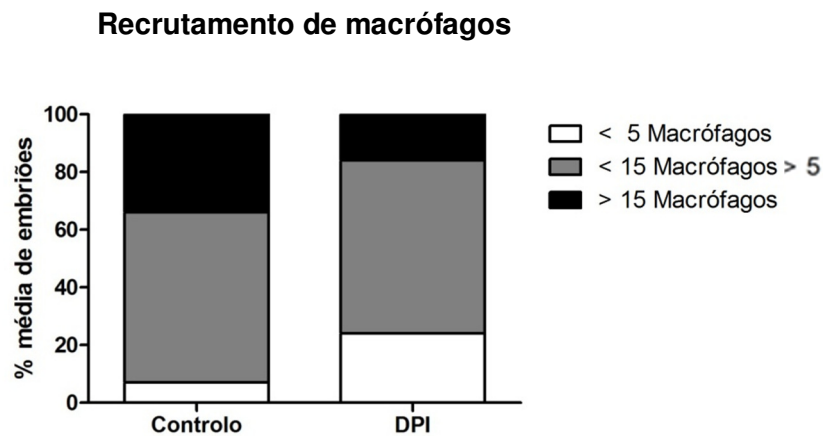


Figura S12: Percentagem média de embriões controlo (N=4) e tratados com DPI (ver procedimento experimental 8.1.), (N=2), que apresentam menos de 5 (branco), entre 5 e 15 (cinzento) ou mais de 15 (preto) macrófagos recrutados para o implante tumoral.