



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ANÁLISE DA FUNÇÃO DE DELTA4 NA REGULAÇÃO DA
ANGIOGÉNESE EMBRIONÁRIA E NEO-ANGIOGÉNESE TUMORAL

Alexandre José Neto Trindade

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Reitor da Universidade Técnica de Lisboa

VOGAIS

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Doutor António José de Freitas Duarte

Doutor Sérgio Jerónimo Rodrigues Dias

Doutor Domingos Manuel Pinto Henriques

ORIENTADOR

Doutor António José de Freitas Duarte

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

2008
LISBOA

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ANÁLISE DA FUNÇÃO DE DELTA4 NA REGULAÇÃO DA
ANGIOGÉNESE EMBRIONÁRIA E NEO-ANGIOGÉNESE TUMORAL

Alexandre José Neto Trindade

TESE DE DOUTORAMENTO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Reitor da Universidade Técnica de Lisboa

ORIENTADOR

Doutor António José de Freitas Duarte

VOGAIS

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Doutor António José de Freitas Duarte

Doutor Sérgio Jerónimo Rodrigues Dias

Doutor Domingos Manuel Pinto Henriques

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

2008
LISBOA

Declaração

Nome: Alexandre José Neto Trindade

Endereço electrónico: adtrindade@fmv.utl.pt

Telefone: 967276762

Número de bilhete de identidade: 11530930

Título da tese: “Análise da função de Delta4 na regulação da angiogénese embrionária e neo-angiogénese tumoral”

Orientador: Doutor António José de Freitas Duarte

Co-orientador: Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da UTL, 15/12/08

Assinatura: _____

Financiamento

Este trabalho foi financiado por uma bolsa de Doutoramento (BD 9006/2002) e pelos projectos de investigação POCTI/CVT/56015/2004 – *Arteriogenesis: identification of new members of the Notch pathway involved in arterial cell fate determination*, POCTI/CVT/34204/99 – *Use of mammalian transgenic techniques to address the function and regulation of mDelta-4* e POCTI/CVT/48766/2002 - *Use of transgenic conditional overexpression to address the function of a novel mammalian Delta homologue, mDll4*, concedidos pela Fundação para a Ciência e Tecnologia no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio do Fundo Social Europeu.

FCT

Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR



UNIÃO EUROPEIA
Fundos Estruturais

Ciência. Inovação 2010

Programa Operacional Ciência e Inovação 2010
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

GOVERNO DA REPÚBLICA
PORTUGUESA



Nome: Alexandre José Neto Trindade

Departamento: Departamento de Reprodução e Obstetrícia

Doutoramento no ramo de: Ciência e Tecnologia Animal

Orientador: Doutor António José de Freitas Duarte (Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa)

Co-orientador: Doutor Luís Filipe Lopes da Costa (Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa)

Data: 5/09/08

Título da dissertação: Análise da função de Delta4 na regulação da angiogénese embrionária e neo-angiogénese tumoral

Resumo

O correcto desenvolvimento dos embriões de metazoários segmentados depende do desenvolvimento de um sistema vascular sanguíneo, um processo regulado a vários níveis. Este passo do desenvolvimento embrionário passa por vários eventos morfogenéticos, que resultam na conversão funcional de células progenitoras, responsivas a factores pró-angiogénicos, em redes complexas de vasos sanguíneos, que cobrem todo o organismo e acompanham o crescimento do embrião.

O desenvolvimento do sistema vascular é um processo dinâmico, em que as células endoteliais integram continuamente sinais de expansão e amadurecimento da rede vascular. A presença de sinais conflituosos resulta num sistema altamente dinâmico, que responde rapidamente às necessidades mas que não se expande desnecessariamente. Existem várias vias de sinalização que estão envolvidas na regulação da remodelação do sistema vascular embrionário. Neste trabalho avaliou-se a importância de Dll4, um ligando da via de sinalização Notch, neste papel. Produziram-se linhas de ratinhos transgénicos com sobre-expressão condicional de *dll4*, que revelaram um papel importante deste gene na determinação da identidade endotelial arterial e na indução de quiescência e maturação do sistema vascular. Neste sentido, Dll4 reduz o perfil migratório das células endoteliais, inibe a formação de novas ramificações vasculares, estimula o recrutamento de células de músculo liso, aumenta a produção de matriz extracelular, aumenta a adesão celular homotípica e reduz a proliferação endotelial. Este papel é conseguido, pelo menos parcialmente, por Dll4, através da via Notch, actuar de forma negativa sobre o funcionamento de vias pró-angiogénicas, como a via VEGF e Wnt.

A análise da função de *Dll4* no desenvolvimento da vasculatura tumoral confirmou o papel anti-angiogénico deste gene. Os resultados revelaram que o bloqueio do funcionamento deste gene resulta numa vasculatura hiper-ramificada, mas hipo-perfundida, que não suporta o crescimento tumoral. Este facto sustenta a hipótese do controlo do funcionamento de Dll4 apresentar potencial terapêutico na luta contra o cancro.

Palavras-chave: Dll4, Notch, Transgénese, Desenvolvimento vascular, Angiogénese, Microarrays, Tumores

Thesis title: Analysis of Dll4 function in the regulation of embryonic angiogenesis and tumoral neo-angiogenesis

Abstract

The correct development of the segmented metazoan embryo depends on the development of a blood vascular system, a highly regulated process. This step in embryonic development goes through various morphogenetic events, which result in the functional conversion of angiogenic responsive progenitor cells into complex networks of blood vessels that span the entire organism and accompany the growth of the embryo.

Vascular system development is a dynamic process in which endothelial cells continuously integrate vascular expansion and maturation signs. The presence of conflicting signals results in a highly dynamic system, that responds quickly when is needed but doesn't grow uncontrolled. Various signalling pathways are involved in the regulation of the embryonic vascular system remodeling. In this work the importance of Dll4, a Notch pathway ligand, in this role is evaluated. *Dll4* conditional overexpression transgenic mouse lines were produced, which revealed an important function of the gene in the determination of arterial endothelial identity and in the induction of quiescence and maturation of the vascular system. Dll4 function is shown to reduce endothelial migration, sprouting and branching, recruitment of smooth muscle cells, endothelial proliferation and increase the production of extracellular matrix and homotypic cellular adhesion. These cellular functions are affected, at least partially, by Dll4 activated Notch signaling negatively regulating pro-angiogenic pathways, as VEGF and Wnt.

Analysis on the importance of *Dll4* in tumor vasculature development confirmed the anti-angiogenic role of this gene. Results revealed that Dll4 blockade leads to the formation of a hyper-ramified, but hypo-perfused, vasculature that cannot support tumor growth. This fact indicated Dll4 as a possible therapeutic target for cancer.

Key words: Dll4, Notch, Transgenics, Vascular development, Angiogenesis, Microarrays, Tumors

Esta tese é dedicada à minha esposa, Ângela, à minha mãe e irmão e, em especial, à memória do meu Pai, Manuel Barrão Trindade.

Para todos os que puderem fazer uso desta investigação.

"A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido; não na vitória propriamente dita." (Mahatma Gandhi)

"Só sabemos com exactidão quando sabemos pouco; à medida que vamos adquirindo conhecimentos, instala-se a dúvida." (Johann Goethe)

Agradecimentos

Nesta tese de doutoramento fica registada toda a metodologia e resultados do trabalho científico mais relevante que foi feito de Novembro de 2002 a Fevereiro de 2007 na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa. No entanto esse trabalho científico só foi possível graças à colaboração de várias pessoas, às quais deixo aqui os meus sinceros agradecimentos.

A pessoa mais importante à idealização, realização e análise de todas as experiências aqui relatadas foi, sem dúvida, o Prof. António Duarte. Foi com inteligência, perseverança e empenho que me conduziu através dos vários projectos realizados. Sempre soube estabelecer parcerias cirúrgicas nos momentos certos, que nos permitiram ultrapassar obstáculos mais rapidamente. Durante estes anos fizemos várias reuniões onde se discutia o progresso dos trabalhos conjuntamente com o Prof. Luís Costa, meu co-orientador. A ele agradeço a atenção que sempre dispendeu, o seu olhar clínico e objectivo sobre os resultados permitiu que se detectassem possíveis lacunas mais depressa e que estas fossem ultrapassadas. Agradeço também ao meu companheiro de bancada, e irmão científico, Dr. Rui Benedito. Partilhámos um longo percurso na ciência, com ele discuti todos os resultados e aprendemos todas as técnicas, sempre lado a lado, em ajuda mútua, para atingir o mesmo fim.

Ao longo deste trabalho e principalmente durante os primeiros dois anos tivemos a colaboração do laboratório do Prof. Domingos Henrique (Investigador Principal na Unidade de Biologia do Desenvolvimento do Instituto de Medicina Molecular), o qual foi fundamental para a aprendizagem de técnicas laboratoriais e para a sempre importante discussão científica. Devido ao facto de durante o doutoramento o núcleo do nosso grupo de investigação ter sido formado por apenas quatro pessoas, esta colaboração e troca de conhecimentos foi vital para a execução do projecto. Nos últimos dois anos tivemos o apoio do Instituto Gulbenkian de Ciência, local onde realizei dois cursos avançados, em imagiologia e bioinformática, que nos permitiu expandir consideravelmente o nosso círculo de discussão de resultados.

Agradeço ao Prof. Luís Tavares, na qualidade de coordenador científico do CIISA, FMV, UTL, por ter disponibilizado o laboratório do CIISA, local de execução de grande parte do

trabalho aqui relatado e por financiamento na fase final de preparação da tese. Agradeço à Eng^a. Patrícia Diniz por toda a ajuda dada na parte de cultura e manipulação de células eucariotas.

Agradeço ao Ministério da Ciência e Tecnologia pelo financiamento no âmbito do programa PRAXIS XXI (SFRH/BD/9006/2002) sem o qual a realização deste trabalho não teria sido possível.

Deixo também um agradecimento especial aos meus pais. A eles lhes devo tudo o que sou, pelo seu apoio incondicional, por me apoiarem e encorajarem ao longo de todos estes anos de estudos. Agradeço ao meu irmão pela sua ajuda, e por se interessar. Agradeço também a todos os meus amigos e colegas, com quem contactei ao longo destes anos, e que de uma forma ou outra, acabaram por influenciar o desenrolar destes trabalhos. Por último agradeço à minha esposa, Ângela, por toda a força e carinho dados no seu apoio, pela compreensão dos horários estranhos a que um trabalho destes obriga, pelo seu amor que me ilumina o caminho.

Finalizo dizendo a todas estas pessoas, que para sempre ficarei com esta dívida de gratidão.

Trabalhos científicos

Artigos em revistas de circulação internacional com arbitragem científica

Duarte, A.; Hirashima, M.; Benedito, R.; Trindade, A.; Diniz, P.; Bekman, E.; Costa, L.; Henrique, D e Rossant, J. (2004) *Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development. Genes Dev.*; 18, 2474-8.

Scehnet, J. S.; Jiang, W.; Kumar, S. R.; Krasnoperov, V.; Trindade, A.; Benedito, R.; Djokovic, D.; Borges, C.; Ley, E. J.; Duarte, A. e Gill, P. S. (2007) *Inhibition of Dll4 mediated signaling induces proliferation of immature vessels and results in poor tissue perfusion. Blood*; 109(11):4753-60.

Trindade, A.; Kumar, S. R.; Scehnet, J.S.; Costa, L.; Becker, J.; Jiang, W.; Liu, R.; Gill, P. S. e Duarte, A. (2008) *Overexpression of delta-like 4 induces arterialization and attenuates vessel formation in developing mouse embryos. Blood*; 112(5):1720-9.

Benedito, R.; Trindade, A.; Hirashima, M.; Henrique, D.; Costa, L.; Rossant, J.; Gill, P. S. e Duarte, A. (2008) *Loss of Notch signalling induced by the Dll4 causes arterial calibre reduction by increasing endothelial cell response to angiogenic stimuli. BMC Developmental Biology*; 8:117.

Comunicações orais

Trindade, A. *Dll4 overexpression causes arterial hypertrophy and loss of vascular identity in developing mouse embryos. PDIGC Annual meeting, Oeiras (2005).*

Trindade, A. *Overexpression of delta-like 4 attenuates vessel formation and induces arterialization in developing mouse embryos vasculature. First annual meeting of Gulbenkian Students, Oeiras (2006).*

Trindade, A.; Costa, L.; Duarte, A. *Sobre-expressão de dll4 provoca hipertrofia arterial e defeitos vasculares através do bloqueio de vias pró-angiogénicas*. Jornadas do ensino pós graduado da FMV, Simpósio do CIISA, Lisboa (2007).

Trindade, A.; Duarte, A. *Overexpression of delta-like 4 induces arterialization and attenuates vessel formation in developing mouse embryos*. MRC-IGC Student Meeting, Ericeira (2008).

Comunicações em painel

Trindade, A.; Duarte, A. *mDll4 overexpression causes arterial hypertrophy and loss of vascular identity in developing mouse embryos*. 1º Encontro da Sociedade Portuguesa de Biologia do desenvolvimento, IGC, Oeiras (2006).

Trindade, A.; Costa, L.; Duarte, A. *mDll4 overexpression causes arterial hypertrophy and loss of vascular identity in developing mouse embryos*, 1º Simpósio Nacional de Angiogénese, IMM, Lisboa (2006).

Trindade, A.; Costa, L.; Duarte, A. *mDll4 overexpression causes arterial hypertrophy and loss of vascular identity in developing mouse embryos*, Mouse Molecular Genetics Meeting, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA (2004).

Duarte, A.; Trindade, A.; Benedito, R.; Costa, L. *mDll4 overexpression causes arterial hypertrophy and loss of vascular identity in developing mouse embryos*. Proceedings of the British Society of Developmental Biology Annual Symposium, Warwick, UK, 2004

Trindade, A.; Benedito, R.; Diniz, P.; Costa, L.; Henrique, D.; Duarte, A. *mDll4 overexpression causes arterial hypertrophy and loss of venous identity in developing mouse embryos*. XXXI Jornadas da Portuguesas de Genética, ITQB, Oeiras, Portugal, 2004

Trindade, A.; Benedito, R.; Diniz, P.; Costa, L.; Henrique, D.; Duarte, A. *mDll4 overexpression causes arterial hypertrophy and loss of vascular identity in developing mouse embryos*. Gordon Conference, 2003

Duarte, A.; Diniz, P.; Pimenta, J.; Benedito, R.; Trindade, A.; Matos, M.; Rodriguez, T.; Henrique, D.; Costa, L. *Use of mammalian transgenic techniques to address the function of a novel endothelial specific Delta homologue, mDll4*. Proceedings of the Portuguese Veterinary Sciences Congress, Taguspark, Lisbon, 2002

Índice Geral

Objectivos	1
Capítulo 1 – Revisão bibliográfica	3
1.1 - Introdução ao estudo da genética de desenvolvimento em mamíferos.....	3
1.2 - Via Notch	5
1.2.1 - Ligandos DSL	11
1.2.2 - Regulação da sinalização Notch.....	13
1.2.3 - Delta-like 4.....	16
1.3 – Formação e regulação do sistema vascular.....	17
1.3.1 - Sinalização Hedgehog:	21
1.3.2 - Sinalização VEGF:	23
1.3.3 - Sinalização por Angiopoietinas.....	30
1.3.4 - Sinalização por TGF- β	31
1.3.5 - Sinalização por Ephrins	33
1.3.6 - Sinalização Wnt.....	34
1.3.7 - Sinalização Notch.....	36
1.3.8 - Função das células peri-endoteliais e da matriz extracelular	40
1.3.9 - Regulação por níveis de oxigénio	41
1.4 - Controlo de expressão génica	42
1.4.1 - Células Estaminais Embrionárias	44
1.4.2 – Uso de células estaminais embrionárias para produção de murganhos geneticamente modificados.....	45
1.4.3 - Recombinação sítio específica	46
1.4.4 - Sistema de transgénese baseado no operão da tetraciclina (sistema tet)	49
1.5 - Tecnologia GeneChip [®]	50
1.6 - Biologia tumoral	52
1.6.1 - Angiogénese tumoral.....	54
1.6.2 - A angiogénese na terapêutica do cancro.....	56
1.6.3 - Modelos animais de tumores.....	57

Capítulo 2 – Produção da linha de ratinhos transgênicos Z/EG-Dll4	60
2.1 – Objectivos	60
2.2 - Materiais e métodos	61
2.2.1 - pZ/EG-Dll4	61
2.2.2 - Amplificação e purificação de ADN plasmídico.	64
2.2.2.1 - Mini-preparações	64
2.2.2.2 - Midi-preparações	65
2.2.3 - Electroforese em géis de agarose	66
2.2.4 - Precipitação de ADN com etanol	66
2.2.5 - Digestão de ADN plasmídico com endonuclease de restrição.....	67
2.2.6 - Material biológico:	67
2.2.6.1 - Estirpes bacterianas usadas:	67
2.2.6.2 - Material de origem animal:	68
2.2.7 – Cultura, manutenção e manuseamento de fibroblastos	70
2.2.7.1 - Preparação de stocks de culturas primárias de fibroblastos embrionários.....	70
2.2.7.2 - Tratamento das culturas primárias de fibroblastos embrionários com mitomicina-C.	70
2.2.7.3 - Descongelção e passagem das ampolas de fibroblastos embrionários tratados com mitomicina.	71
2.2.8 - Preparação de placas gelatinizadas	71
2.2.9 – Cultura, manutenção e manuseamento de Células Estaminais Embrionárias	72
2.2.9.1 - Descongelção de células estaminais embrionárias	72
2.2.9.2 - Passagem de células estaminais embrionárias	73
2.2.9.3 - Electroporação de células estaminais embrionárias	74
2.2.9.4 – Selecção de colónias	76
2.2.9.5 - Passagem das CEE em placas de 96 poços.	76
2.2.9.6 - Congelção de células estaminais embrionárias	77
2.2.9.7 - Preparação de células estaminais embrionárias para a agregação.....	78
2.2.10 - Superovulação de fêmeas CD1.....	79
2.2.11 - Obtenção de fêmeas pseudo-gestantes, receptoras de embriões agregados.....	80
2.2.12 - Recolha de embriões no estágio de oito células	81
2.2.13 - Agregação de células estaminais embrionárias com embriões no estágio de oito células.	82

2.2.13.1 - Preparação das placas de agregação	82
2.2.13.2 - Remoção da zona pellucida.....	82
2.2.13.3 - Montagem das agregações	83
2.2.13.4 - Transferência de embriões para fêmeas receptoras pseudo-gestantes.....	84
2.2.14 - Genotipificação por coloração com X-Gal	85
2.3 - Resultados	86
2.3.1 - Produção da linha de ratinhos Z/EG-Dll4.....	86
2.3.1.1- Preparação do ADN-vector.....	86
2.3.2 – Electroporação de CEE	88
2.3.2.1 - Primeira sessão de electroporação.....	88
2.3.2.2 - Segunda sessão de electroporação.....	92
2.3.3 - Sessões de agregação.....	94
2.3.4.- Análise das quimeras	101
2.3.5 - Produção de linhas de ratinhos transgénicos Z/EG-Dll4 por microinjecção pronuclear	104
2.4 – Discussão	105

Capítulo 3 – Análise do efeito da sobre-expressão ubíqua de Dll4 no desenvolvimento embrionário..... 110

3.1 – Objectivos	110
3.2 – Materiais e métodos	110
3.2.1 - Material de origem animal:	110
3.2.2 - Estabelecimento de cruzamentos entre ratinhos.....	111
3.2.2.1 - Colheita e dissecção de embriões	111
3.2.3 - Extracção de ADN para genotipagem de ratinhos	112
3.2.3.1 - Genotipificação por PCR	112
3.2.4 - Fixação e inclusão de tecidos e embriões em gelatina	113
3.2.5 - Criosecções	115
3.2.6 – Produção de sondas de ARN	115
3.2.6.1 - Preparação de ADN molde para transcrição in vitro	115
3.2.6.2 - Transcrição in vitro.....	115
3.2.7 - Hibridação in situ	116

3.2.7.1 - Hibridação in situ de criosecções	117
3.2.8 - Imunohistoquímica e imunofluorescência de criosecções	118
3.2.9 - Marcação de núcleos mitóticos com BrdU	119
3.2.10 – Detecção de células apoptóticas – Método TUNEL.....	121
3.2.11 - Coloração de embriões com X-Gal	123
3.2.12 - Hibridação in situ de embriões in toto	123
3.2.13 - Imunohistoquímica de embriões in toto.....	125
3.2.14 – Microscopia	126
3.3 – Resultados	126
3.3.1 - Cruzamento das linhas pCAGGS-Cre com a linha Z/EG-Dll4.....	126
3.4.3 - Análise imunohistoquímica de embriões inteiros e criosecções	130
3.4.4. - Microangiografia em embriões	134
3.4.5 - Estudo da expressão de marcadores moleculares do endotélio arterial e/ou venoso ...	135
3.4.5.1 - Produção de sondas de ARN antisense.....	135
3.4.5.2 - Resultados de hibridação in situ	137
3.4.6 – Estudo da estrutura cardíaca.....	141
3.4.7 - Estudo da formação e recrutamento de células de músculo liso	142
3.4.8 - Estudo do efeito da sobre-expressão de Dll4 na proliferação das células endoteliais..	142
3.4.9 - Análise da estrutura da matriz extracelular.....	146
3.4.10 – Localização de Dll4 e possível importância para a sua função	148
3.5 – Discussão	151
3.5.1 - Análise do efeito da sobre-expressão ubíqua de Dll4 no desenvolvimento embrionário	151
3.5.2 - Defeitos cardio-vasculares dos embriões DT.....	154
Capítulo 4 – Sobre-expressão endotelial de dll4	161
4.1 – Objectivos	161
4.2 – Materiais e métodos.....	161
4.2.1 - Material de origem animal:	161
4.2.2 - Estabelecimento de bactérias DH5 α competentes.....	162
4.2.3 - Transformação de bactérias	163
4.2.4 - Clonagem em vectores plasmídicos	164
4.2.4.1 - Teste rápido de recombinação.....	166

4.2.5 - Microinjecção pronuclear	167
4.2.6 – Administração de doxiciclina	168
4.3 – Resultados.....	168
4.3.1 - Cruzamento da linha Z/EG-Dll4 com linhas Cre endoteliais	168
4.3.2 - Produção de uma linha de ratinhos transgênicos com sobre-expressão condicional indutível de Dll4.....	172
4.3.2.1 – Microinjecção pronuclear de pTetO ₇ -Dll4	174
4.3.2.2 - Análise do efeito da sobre-expressão endotelial de dll4 no desenvolvimento vascular embrionário	174
4.4 – Discussão	179
Capítulo 5 - Análise transcriptómica	182
5.1 – Introdução	182
5.2 – Materiais e métodos	183
5.2.1 - Dissociação e imunomarcacção de embriões para citometria	183
5.2.1.1 - Citometria de fluxo	184
5.2.1.2 - Isolamento de células endoteliais por FACS	184
5.2.2 - Extracção de ARN de células endoteliais isoladas.....	185
5.2.2.1 - Análise da qualidade do ARN	185
5.2.3 - Amplificação das amostras de ARN e hibridação com GeneChips	186
5.2.3.1 - Controlo de qualidade dos microarrays	186
5.2.3.2 - Normalização	187
5.2.3.3 - Análise dos níveis de expressão	187
5.2.4 - Análise de expressão génica por PCR em tempo real semi-quantitativo	188
5.3 – Resultados.....	190
5.3.1 - FACS de células endoteliais de embriões	190
5.3.2 – Processamento dos ARN e hibridação com GeneChips	193
5.3.3 - Resultados dos GeneChip	194
5.3.3.1 - Regulação de progressão no ciclo celular	196
5.3.3.2 - Via Notch	197
5.3.3.3 – Receptores membranares associados a vias angiogénicas	198
5.3.3.4 – Via MAPK/ERK	199

5.3.3.5 – Via Bcl2.....	199
5.3.3.6 – Via PKC/PI3K	199
5.3.3.7 – Via mTOR	199
5.3.3.8 – Migração celular	200
5.3.3.9 - Adesão celular e matriz extracelular.....	200
5.3.3.10 - Wnt signaling	202
5.3.3.11 - Genes sem mutantes de perda de função conhecidos, com possível interesse.....	203
5.3.4 - Análise de variação de expressão gênica por PCR em tempo real (RT-PCR).....	206
5.4 – Discussão	210

Capítulo 6 - Análise da influência da haploinsuficiência em Dll4 no desenvolvimento da vasculatura tumoral..... 215

6.1 - Objectivos.....	215
6.2 – Materiais e métodos.....	216
6.2.1 - Xenotransplante subcutâneo de células S180	216
6.2.1.1 - Recolha e fixação dos tumores.....	216
6.2.1.2 - Medição da densidade vascular	216
6.3 – Resultados.....	217
6.3.1 - Análise da influência da haploinsuficiência em Dll4 no desenvolvimento da vasculatura tumoral.....	217
6.4 – Discussão	220

Capítulo 7 – Discussão geral e Conclusões 222

Bibliografia..... 230

Anexo I – Meios e soluções..... 261

I.1 - Meios de Cultura 261

I.1.1 - Meios de cultura líquidos para microbiologia.....	261
I.1.2 - Meios de cultura sólidos para microbiologia	262
I.1.3 – Meios de cultura para células eucariotas	262
I.1.3.1 - Meio de cultura para culturas primárias de fibroblastos embrionários.	262
I.1.3.2 - Meio de cultura para células estaminais embrionárias	263
I.1.3.3 - Meio de congelamento de células estaminais embrionárias.....	263
I.1.3.4 - Meio KSOM, para cultura de embriões em fase de pré-implantação	263
I.1.3.4.1 - Stock A (10x) (100mL)	264
I.1.3.4.2 - Stock B (10x) (100mL).....	264
I.1.3.4.3 - Stock C (100x) (10mL).....	265
I.1.3.4.4 - Stock D (100x) (10mL)	265
I.1.3.4.5 - Stock F (100x) (100mL)	265
I.1.3.4.6 - Stock G (200x).....	265
I.1.3.4.7 - Produção do meio KSOM.....	266
I.4 - Armazenamento de clones bacterianos.....	266
I.5 - Marcadores de pesos moleculares para ADNds	266
I.6 - Enzimas de restrição	268
I.7 - Soluções	269
I.7.1 - Tampão de Electroforese.....	269
I.7.2 - Tampão TE	269
I.7.3 - PBS (“phosphate-buffered saline”)	269
I.7.4 - Soluções para coloração com X-Gal.....	269
I.7.4.1 - Tampão NaPO ₄ 0,1M (500mL).....	269
I.7.4.2 - Solução de fixação (50mL).....	269
I.7.4.3 - Tampão de lavagem (500mL).....	270
I.7.4.4 - Solução de coloração com X-Gal(75mL).....	270
I.7.4.5 - Solução com 25mg/mL de X-Gal	270
I.7.5 - Avertina	270
I.7.5.1 - Stock 100% de avertina	270
I.7.5.2 - Solução de trabalho de Avertina (2,5%).....	271
I.7.6 - FSB.....	271
I.7.7 - Soluções de in situ em criosecções	271
I.7.8 - Soluções de imunohistoquímica e imunofluorescência	272
I.7.9 - Soluções de BrdU.....	273

I.7.10 - Soluções de hibridação in situ de embriões in toto.....	273
Anexo II - Sequências de oligonucleótidos iniciadores	274
II.1 - Sequências de oligonucleótidos iniciadores usados em reacções de PCR:.....	274
II.2 - Sequências de oligonucleótidos iniciadores usados em reacções de PCR em tempo real:	274
II.3 – Condições de reacção de PCR	276

Índice de figuras

Figura 1 – Indentações em asas de <i>D. Melanogaster</i> com mutações em membros da via Notch.	6
Figura 2 – Modelo de inibição lateral.....	7
Figura 3 – Modelo de decisão de linhagens	7
Figura 4 – Modelo de indução.....	8
Figura 5 – Representação esquemática de Notch	8
Figura 6 – Esquema simplificado da sinalização Notch	10
Figura 7 – Representação esquemática de Delta.	11
Figura 8 – Representação esquemática de Jagged.....	11
Figura 9 – Distinção estrutural entre artérias e veias.....	18
Figura 10 – Mapa de tecidos embrionários em gastrulação	20
Figura 11 – Modelo de transdução de sinal Hedgehog em <i>D. melanogaster</i>	22
Figura 12 – Isoformas de VEGF-A.....	23
Figura 13 – Esquema representando a família de ligandos e receptores VEGF	25
Figura 14 – Esquema simplificado da via de transdução de sinal a jusante de VEGF-R2	29
Figura 15 – Esquema simplificado da sinalização Wnt	35
Figura 16 – Locais de reconhecimento de recombinasse Cre e Flp.	47
Figura 17 – Complexo sináptico entre moléculas de recombinasse e dois locus alvo	48
Figura 18 – Esquema representativo do funcionamento básico do sistema tet.....	49
Figura 19 – Aspecto visual de um GeneChip® array da Affymetrix e de uma imagem pseudo-colorida obtida após uma experiência de hibridação.....	50
Figura 20 – Esquema representativo do percurso que as amostras de ARNm passam num protocolo de microarrays.....	52
Figura 21 – Formação da vasculatura tumoral	55
Figura 22 – Representação gráfica do vector pZ/EG.....	62
Figura 23 – Esquema do pZ/EG-Dll4, antes de ocorrer recombinação por Cre (topo) e depois de ocorrer recombinação por Cre (baixo).	64
Figura 24 – Resultado de uma electroforese a 0,9% de agarose do resultado da digestão com SfiI de ADN de pZ/EG-Dll4	67
Figura 25 – Comparação de cor de pelagem.	69

Figura 26 - Aspecto normal de uma colónia de CEE a crescer sobre PEFs.....	69
Figura 27 - Fotografia de uma cultura de CEE, a crescer em PEFs, com cerca de 40% de confluência.	74
Figura 28 – Esquema de um oviduto	81
Figura 29 - Esquema de uma placa de agregações.	82
Figura 30 - À esquerda, uma mórula com zona pelucida e à direita sem <i>zona pellucida</i>	83
Figura 31 - Depressão com uma mórula e um agregado de CEE lado a lado.....	83
Figura 32 – Electroforese do resultado da restrição de Z/EG-Dll4 com SfiI e BsaI.	87
Figura 33 - Quimera Nv6.1.	102
Figura 34 - Quimera Nv3.2 com uma das suas ninhadas	103
Figura 35 – Marcação com X-Gal de embriões Z/EG-Dll4 com 8 dpc	104
Figura 36 – Expressão generalizada de EGFP nos embriões DT aos 8 dpc.....	126
Figura 37 – Imunofluorescência para PECAM (vermelho) em embriões DT com 9,25 dpc...	127
Figura 38 – Defeitos na somitogénese dos embriões DT.....	128
Figura 39 – Embriões DT com 9,0 dpc revelando ambiguidade na direcção de rotação corporal e cardíaca.....	129
Figura 40 – Embriões DT com 9 dpc.....	129
Figura 41 – Criosecções de embriões controlo (esq.) e DT (dir.) aos 8,75 dpc com imunohistoquímica para PECAM	130
Figura 42 - Embriões controlo (A) e DT (B) aos 9 dpc com imunohistoquímica para PECAM.	130
Figura 43 - Embriões controlo (esq.) e DT (dir.) aos 9,5 dpc com imunohistoquímica para PECAM.	131
Figura 44 – Membranas vitelinas de embriões controlo (esq.) e DT (dir.) aos 9 dpc com imunohistoquímica para PECAM.	131
Figura 45 – Vasculatura cefálica de embriões controlo (esq.) e DT (dir.) aos 9,5 dpc com imunohistoquímica para PECAM.	132
Figura 46 – Malformações artério-venosas em embriões DT.	133
Figura 47 – Criosecções de embriões controlo (esq.) e DT (dir.) aos 10 dpc com imunohistoquímica para PECAM.	133
Figura 48 - Criosecções de embriões DT aos 10,5 dpc com imunohistoquímica para PECAM.	134
Figura 49 - Microangiografia em embriões controlo (A) e DT (B) aos 9 dpc.	135

Figura 50 - Esquema dos ADNc de notch1 e eph-B4 com referência aos domínios proteicos codificados por estes.	136
Figura 51 – Expressão de notch1, hey1 e notch4 em embriões controlo com 8 dpc.....	138
Figura 52 – Expressão de notch1, hey1 e notch4 em embriões controlo com 8,5 dpc.....	138
Figura 53 – Expressão de notch1, hey1 e notch4 em embriões controlo com 9,5 dpc.....	138
Figura 54 - Hibridação in situ de criosecções de embriões controlo e DT com 9.0 dpc.	139
Figura 55 – Expressão de endoglin e alk1 permanece nas AD e nas VCA dos embriões DT.	140
Figura 56 - Hibridação in situ com ribosonda para dll1 em embriões com 9,5 dpc.	140
Figura 57 – Defeitos cardíacos em embriões DT.	141
Figura 58 - Marcação de células de músculo liso com anticorpo específico para actina de músculo liso	142
Figura 59 - Gráfico de frequência de proliferação de células endoteliais arteriais	143
Figura 60 – Gráfico de frequência de apoptose em células endoteliais arteriais.....	144
Figura 61 – Defeitos migratório endoteliais e defeitos na ramificação vascular.	145
Figura 62 - Deposição de matriz extracelular à volta das AD.....	147
Figura 63 – Imunofluorescência para Dll4.....	149
Figura 64 – Imunofluorescência para Dll4.....	150
Figura 65 – A proteína Dll4 não tem uma deposição constante.....	151
Figura 66 - Resultado de imunofluorescência para GFP (verde) em embriões DT para Tie2-Cre e Z/EG-Dll4 a E8.75.....	169
Figura 67 – Embriões DT para Tie2-Cre e Rosa26 reporter com coloração com X-Gal e imunohistoquímica para PECAM.....	170
Figura 68 - Resultado de imunofluorescência para PECAM (vermelho) e GFP (verde) em membros anteriores de embriões DT para Tie2-Cre e Z/EG-Dll4 e controlo.....	171
Figura 69 - Resultado de imunofluorescência para PECAM (vermelho) e GFP (verde) em membros posteriores de embriões DT para Tie2-Cre e Z/EG-Dll4 e controlo.	171
Figura 70 - Resultado de imunofluorescência para PECAM (vermelho) e GFP (verde) em membros anteriores de embriões DT para Tie2-Cre e Z/EG-Dll4.	172
Figura 71 – Esquema do vector tetO7-Dll4.	173
Figura 72 – Esquema do vector tetO7-Dll4-IRES-GFP.....	173
Figura 73 – Nos embriões Dll4e, dll4 é expresso em todo o endotélio.	175
Figura 74 – Imunofluorescência para PECAM de criosecções de embriões Dll4e e controlo.....	176

Figura 75 - Embrião Dll4e apresentando hipertrofia das AD na região posterior.....	176
Figura 76 – Gráfico de frequência de proliferação de células endoteliais arteriais.....	177
Figura 77 – Malformações artério-venosas em embriões Dll4e.....	177
Figura 78 – Recrutamento de músculo liso nas aortas dorsais.....	178
Figura 79 – Imunofluorescência para Fibronectina e PECAM em criosecções de embriões controlo e Dll4e.	178
Figura 80 - Fotografia ilustrativa do padrão quadriculado característico formado nos quatro cantos do <i>chip</i> e do padrão alternado existente ao longo do bordo exterior, resultantes da hibridação do controlo Oligo B2.	187
Figura 81 – Gráficos de pontos relativos à análise em citometria de fluxo de amostras de células extraídas, por dissociação, de embriões controlo, marcadas com anticorpo anti-PECAM-APC.....	190
Figura 82 - Gráficos de pontos relativos à análise em citometria de fluxo de amostras de células extraídas, por dissociação, de embriões DT, marcadas com anticorpo anti-PECAM-APC.....	191
Figura 83 - Gráficos de pontos relativos à análise em citometria de fluxo de amostras de células extraídas, por dissociação, de embriões controlo, marcadas com anticorpo anti-PECAM-APC.....	192
Figura 84 - Gráficos de pontos relativos à análise em citometria de fluxo de amostras de células resultantes de sorting de embriões DT.....	192
Figura 85 - Histogramas representam os valores de média de variação de expressão (gene de interesseDT / gene de interesseWT; normalizado para β -actina)	207
Figura 86 - Gráfico representando os valores de variação de expressão entre amostras de células endoteliais DT e controlo usando GeneChips ou RT-PCR.....	211
Figura 87 – Gráfico representando o volume tumoral no dia 10 após implantação de tumores em murganhos Dll4 ^{+/-} e controlo.....	217
Figura 88 – (cima) Imunofluorescência anti-PECAM em tumores implantados em murganhos controlo e Dll4 ^{+/-} demonstrando o aumento na densidade vascular nos tumores implantados em murganhos Dll4 ^{+/-}	218
Figura 89 – A maior parte da vasculatura tumoral, formada de novo, expressa Dll4.	218
Figura 90 – Gráfico representando a área de campo de microscopia ocupada por endotélio em secções de tumores implantados em murganhos Dll4 ^{+/-} e controlo.....	219
Figura 91 – Imunofluorescência para SMA e PECAM revelaram que na vasculatura tumoral em murganhos Dll4 ^{+/-} há uma diminuição no recrutamento de células de músculo liso, indicando a existência de um defeito na maturação vascular.....	220
Figura 92 – Esquema de interacções entre diferentes vias de sinalização que regulam a angiogénese.	229

Índice de tabelas

Tabela 1 – Descrição das características específicas de cada mistura de electroporação.....	88
Tabela 2 – Relação entre a quantidade de ADN em cada cuvete e o número de clones picados no dia +7, da respectiva placa.	89
Tabela 3 – Descrição do número de clones picados no dia +8.....	90
Tabela 4 – Número total de clones repicados, com descrição da sua placa de origem e placa de destino.	91
Tabela 5 – Localização na respectiva placa de 96 poços dos clones considerados positivos para coloração com X-Gal.	91
Tabela 6 – Resumo das características dos diferentes clones considerados positivos para integração estável do vector de transgénese.....	92
Tabela 7 – Características específicas de cada mistura de electroporação.....	93
Tabela 8 – Relação entre a quantidade de ADN em cada cuvete com o número de clones picados da respectiva placa.	93
Tabela 9 – Resultado da coloração com X-Gal das células na placa de 96 poços.....	94
Tabela 10 – Relação entre o peso das fêmeas superovuladas e o número de fêmeas com rolhão vaginal após cruzamento com machos reprodutores.	95
Tabela 11 – Descrição detalhada do primeiro processo de agregação e transferências.....	96
Tabela 12 – Resumo da eficiência do primeiro protocolo de agregação e transferências.	97
Tabela 13 – Descrição detalhada do segundo processo de agregação e transferências.	97
Tabela 14 – Resumo da eficiência do segundo protocolo de agregação e transferências.....	98
Tabela 15 – Descrição detalhada do terceiro processo de agregação e transferências.	99
Tabela 16 – Resumo da eficiência do terceiro protocolo de agregação e transferências.....	99
Tabela 17 – Descrição detalhada do quarto processo de agregação e transferências	100
Tabela 18 – Resumo da eficiência do quarto protocolo de agregação e transferências.....	100
Tabela 19 – Descrição da medida subjectiva da percentagem de células de folículos pilosos que descendem da linhagem do clone de CEE usado na agregação com o embrião que deu origem a cada uma das quimeras macho.	101
Tabela 20 – Descrição da medida subjectiva da percentagem de células de folículos pilosos que descendem da linhagem do clone de CEE usado na agregação com o embrião que deu origem a cada uma das quimeras fêmea.	101

Tabela 21 – Descrição da origem e conteúdo dos plasmídeos usados para produzir sondas de ARNc para hibridação <i>in situ</i>	116
Tabela 22 – Organização dos genes considerados mais interessantes, após análise da literatura específica e domínios proteicos codificados pelo gene, em classes.	195
Tabela 23 – Comparação entre os valores de variação de expressão génica derivados dos <i>GeneChips</i> e de RT-PCR.....	208

Índice de abreviaturas e símbolos

+/-.....	Heterozigota
μF.....	MicroFarad
μg.....	Micrograma
μl.....	Microlitro
μV.....	MicroVolt
A.....	Adenina
a.a.	Aminoácidos
AD.....	Aortas dorsais
ADAM.....	”A desintegrin and metalloproteinase”
ADN.....	Ácido desoxiribonucleico
ADNase...	Desoxiribonuclease
ADNc.....	Ácido desoxirribonucleico complementar
Akt.....	”Thymoma viral proto-oncogene”
ALK.....	”Activin-like kinase
Ang.....	”Angiopoietin”
Ank.....	”Ankyrin”
AP.....	Adaptor protein
APC.....	”adenomatosis polyposis coli”
APC.....	” Allophycocyanin “
Aph.....	”Alphaprotein”
App.....	”amyloid precursor protein”
ARN.....	Ácido ribonucleico
ARNc.....	”Ácido ribonucleico complementar”

ARNm.....ácido ribonucleico mensageiro
BBR....."Boehringer blocking reagent"
Bcl....."B-cell leukemia/lymphoma"
bHLH....."Basic Helix-loop-helix domain"
bl.....Blastocistos
BMP....."Bone morphogenetic protein"
BrdU..... 5-bromo-2'-desoxiuridina
BSA....."Bovine Serum Albumine"
C.....Citosina
Ca²⁺.....Iões bivalentes Cálcio
CaCl₂.....Cloreto de Cálcio
CADASIL....."Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy"
CAGGS....."Chicken beta-actin and cytomegalvirus composite promoter"
CBF.....Cp-binding factor
c-Cbl....."Casitas B-lineage lymphoma"
cdk....."Cyclin-dependent kinase"
CEE.....Células estaminais embrionárias
Cél.....Célula
CFU....."Colony Forming Unit"
CHAPS....."3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic Acid"
Ci....."Cubitus interruptus"
CIAP....."Calf Intestine Alkaline Phosphatase"
CK....."Casein kinase"
cm.....Centímetros
CMV.....Citomegalovirus

CO₂.....Dióxido de carbono
Co-R.....Co-repressor
Cos.....”Costal”
CPOS.....Células progenitoras dos órgãos sensoriais
Cre.....”Cyclization recombination”
CSL.....Domínio proteico presente em CBF1, Supressor of hairless e LAG-1
C_T.....”Cycle threshold”
Cx.....”Connexin”
DAB.....Diaminobenzidina
DAPI..... 4,6-diamino-2-fenil indol
ddCTP.....Dideoxi.citosina-5^a-trifosfato
ddUTP.....Dideoxi-uridina-5A-trifosfato
Dec.....Defective chorion
dHAND.....”Heart and neural crest derivatives expressed transcript”
DIG.....Digoxigenina
Dll.....”Delta-like”
Dll4e.....Duplo transgênico com sobre-expressão endotelial de *dll4*
DMEM.....”Dulbeccos’s Modified Eagles’s Medium”
DMF.....Dimetilformamida
DMSO.....Dimetil sulfóxido
dNTPs.....Desoxiribonucleótido
Dpc.....dias *post coitum*
DRC.....Domínio rico em cisteínas
DSL.....Homólogo de *delta/serrate/lag-2*”
DT.....Duplo transgênico

Dta.....Direita
DTT....."Dithiothreitol"
e.....Carga eléctrica de um electrão
E(spl)....."Enhancer-of-split"
EDTA.....Ácido etilenodiaminotetraacético
EGF....."epidermal growth factor"
EGFP....."Enhanced green fluorescent protein"
ERK....."Extracellular signal-regulated kinase"
Esq.....Esquerda
EUA.....Estados Unidos da América
FACS....."Fluorescent-Activated Cell Sorting"
FAK....."Focal adhesion kinase"
Fbn.....Fibronectina
FGF....."Fibroblast Growth Factor"
FL.....Fluorescência
Flk....."Flt related tyrosine kinase"
FLP....."Flippase"
Flt....."Fms-like tyrosine kinase"
FML.....Faculdade de Medicina de Lisboa
FN.....Domínio de fibronectina
Foxc....."Forkhead box C"
Frt....."FLP recombinase target"
FSB.....Frozen Storage Buffer
FSH....."Folicle stimulating hormone"
Fu....."Fused"

G.....Guanina

g.....Gramas

g.....Força centrífuga relativa

GAPDH.....”Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase”

GEF.....”GTP Exchange Factor”

Gli.....”Gliotactin”

GPI.....”glycosylphosphatidylinositol”

Grb.....”Growth factor receptor bound protein”

GSK.....”glycogen synthase kinase”

GTP.....”Guanosine triphosphate”

h.....Horas

HBSS.....”Hank’s Buffered Salt Solution”

hCG.....”Human chorionic gonadatrophin”

HCl.....Cloro de hidrogénio

HEPES.....”4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid”

Hes.....”Hairy and enhancer of split”

Het.....Heterozigota

Hey.....”Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif”

HIF.....”Hypoxia inducible factor”

HRP.....”Horseradish peroxidase”

HSP.....”Heat-shock protein”

HUVEC.....”Human umbilical vein endothelial cells”

IGC.....Instituto Gulbenkian de Ciência

Il.....”interleukin”

IMAGE.....”Integrated Molecular Analysis of Gene Expression”

Int.....”Frequent target for insertional activation by MMTV proviral DNA”

IRES.....”Internal ribosomal entry site”

K₂HPO₄.....Monohidrogenofosfato de potássio

Kb.....Kilobases

KCl.....Cloreto de potássio

kDa.....Kilodalton

Kg.....Kilograma

KH₂PO₄.....Dihidrogenofosfato de potássio

KSOM.....”potassium simplex optimized medium”

L.....Litro

LA.....Los Angeles

LacZ.....Beta-galactosidase

LAG.....”Lin-12 and Glp-1 phenotype”

LB.....”Luria Bertani Broth”

Lef.....”Lymphoid enhancer binding factor”

LH.....”Luteinizing hormone”

LIF.....”Leukemia inhibitory factor”

LIN.....”Notch/Lin12”

Lmn.....Laminina

LoxP.....”Locus of X-over P1”

LRP.....”low density lipoprotein receptor”

M.....Molar

m.....Minutos

Mam.....”Mastermind”

MAP.....”mitogen activated protein”

MAPK.....”mitogen activated protein kinase”
MAPKKKK....”Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase”
MEK.....”MAP kinase or ERK kinase”
MgCl₂.....Cloreto de magnésio
MgSO₄.....Sulfato de magnésio
ml.....Mililitro
MM.....”Mismatch”
mm.....Milímetros
mm².....Milímetro quadrado
mm³.....Milímetros cúbicos
MMP.....”Matrix metalloproteinase”
mo.....Mórulas
MQ.....MilliQ
mTOR.....”Mammalian target of Rapamycin”
Na₂HPO₄.....Monohidrogenofosfato de sódio
NaCl.....Cloreto de sódio
NaH₂PO₄.....Dihidrogenofosfato de sódio
NaHCO₃.....Hidrogenocarbonato de sódio
NaOH.....Hidróxido de sódio
Ncd.....”Notch intracellular domain”
NiCl.....Cloreto de Níquel
NIH.....”National Institutes of Health”
NIMR.....”National Institute for Medical Research”
Nm.....Nanómetros
Nº.....Número

NTMT.....”NaCl, MgCl₂, Tris, Tween-20 Solution”

°.....Graus de inclinação

°C.....Graus Celsius

Ofut.....” O-fucosyltransferase”

p/v.....Peso/volume

PAK.....”p21-activated kinase”

pb.....Pares de bases

PBS.....”Phosphate buffered saline”

PBSW.....”Phosphate buffered saline-Tween-20”

Pcm.....”PECAM”

PCR.....”Polymerase Chain Reaction”

PDGF.....”Platelet derived growth factor”

PE.....”Phycoerithrin”

PECAM.....”Platelet-endothelial cell adhesion molecule”

PEF.....Primary embryonic fibroblasts

Pen.....”presenilin enhancer”

PEST.....”Proline, glutamate, serine, threonine rich sequence”

PFA.....Paraformaldeído

pH.....Potencial de hidrogénio

PI.....”Propidium iodide”

PKA.....”Protein kinase A”

PKC.....”Protein kinase C”

PLC γ”Phospholipase C, gamma”

PIGF.....Placental Growth Factor

PLVAP.....”Plasmalemma vesicle associated protein”

PM.....”Perfectly complementary”
PMSG.....”Pregnant mare serum gonadotrophin”
Ptc.....”Patched”
Pyk.....”Protein tyrosine kinase”
QC.....”Quality check”
Rab.....Ras oncogene family
Rac.....”GTP-binding proteins”
Raf.....”V-raf-leukemia viral oncogene”
RAM.....”RBP-jk-associated molecules”
Ras.....”Ras oncogene family”
Rho.....”GTP-binding proteins”
RIN.....”RNA Integrity Number”
RLT.....”RNeasy Lysis Buffer”
Rpm.....Rotações por minuto
RT-PCR.....”Real-time-Polymerase Chain Reaction”
rtTA.....”Reverse tetracycline-controlled transactivator”
s.....Segundos
S180.....Sarcoma 180
SDS.....”Sodium dodecyl phosphate”
SMA.....”Smooth muscle actin”
SMAD.....”MAD (Mothers against Dpp) homolog”
Smo.....”Smoothened”
Src.....”Rous sarcoma oncogene”
SREBP.....”Sterol regulatory element binding protein”
SSC.....”Sodium chloride-sodium citrate buffer”

Stra.....”stimulated by retinoic acid”
Su(fu).....”Supressor-of-fused”
SV.....Seio venoso
T.....Timina
TACE.....”TNF-alpha converting enzyme”
TAE.....Tris-acetato-EDTA
Taq.....Polimerase de *Thermus aquaticus*
TB.....”Terrific Broth”
TBST.....”Tris buffered saline-Tween-20”
Tcf.....”Transcription factor”
TE.....Tris-EDTA
TG.....Transgénico
TGF.....”Transforming growth factor”
Tie.....”Tirosine kinase receptor”
TM.....Transmembranar
Tm.....Temperatura de dissociação
TRE.....”Tetracyclin Responsive Element”
Tris.....Tris(Hidroximetil)aminometano
TSC.....Tracto de saída do coração
tTA.....”Tetracycline-controlled transactivator”
Tween.....” polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate”
TyrKc.....”Tyrosine kinase”
TβR.....”Transforming growth factor β receptor”
U.....Uracilo
U.....Unidade de enzima

USA....."United States of America"
UV.....Radiação ultra-violeta
v/v.....Volume/volume
VCA.....Veias cardinais anteriores
VEGF....."Vascular endothelial growth factor"
VEGFR..... "Vascular endothelial growth factor receptor"
Wnt....."Wingless-related MMTV integration site"
WT....."Wild-type"
x.....Vezes
X-Gal..... 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopiranosídeo
Z/EG....."LacZ and EGFP"

Objectivos

O sistema vascular é o primeiro órgão que se forma nos vertebrados. É essencial para a sobrevivência dos organismos complexos pois permite levar nutrientes e oxigénio e escoar metabolitos de regiões que se encontram muito além do limite de difusão dessas moléculas a partir do exterior. O seu desenvolvimento é muito estruturado e regulado por factores genéticos e físicos pois este sistema tem de acompanhar o desenvolvimento e crescimento de um organismo e tem de ser capaz de responder rápida e organizadamente a lesões e necessidades geradas por estímulos patológicos.

A investigação associada ao desenvolvimento vascular assume uma grande importância na compreensão da etiologia de malformações vasculares letais em humanos e de doenças associadas ao desenvolvimento de uma vasculatura anormal. As doenças com maior impacto social e humano, doenças cardiovasculares, cancro, diabetes, etc., estão associadas, directa ou indirectamente, à ocorrência de alterações na função vascular. Especificamente, o cancro compreende um conjunto de doenças caracterizadas pela evolução de uma população de células com características hiperproliferativas e invasivas, cujo desenvolvimento depende da formação de uma nova vasculatura de suporte, por um processo designado de neo-angiogénese. A neo-angiogénese tumoral recapitula, pelo menos em parte, o desenvolvimento vascular embrionário. Este facto levou a que nas últimas três décadas se desenvolvessem inúmeros estudos de cariz genéticos sobre genes envolvidos, ou suspeitos de estarem envolvidos, na regulação do desenvolvimento vascular embrionário. O sistema vascular embrionário permite uma avaliação relativamente rápida da função de um gene, permitindo avaliar funções de diferenciação, proliferação, sobrevivência, migração, ramificação e determinação. A evolução de técnicas de análise genómica e transcriptómica permitiram também que se consiga estudar interacções entre genes e vias de sinalização neste sistema. Estudos neste sistema permitem descobrir e rastrear genes relevantes para que depois se possam passar os dados descobertos para estudos em animais adultos em situações patológicas, de modo a avaliar a translação dos resultados e respectiva importância para o desenvolvimento de novas possíveis terapêuticas.

A via Notch é uma via de sinalização intercelular com funções regulatórias em diversos processos celulares, nos diversos tecidos em que é expressa. É conhecido o seu papel na regulação do desenvolvimento vascular devido à descrição de fenótipos vasculares letais embrionários em mutantes de perda- e ganho-de-função dos seus receptores transmembranares. Em mamíferos conhecem-se cinco ligandos transmembranares para os

receptores Notch, no entanto apenas *Dll4* tem expressão no endotélio arterial embrionário nos estádios em que se reportou o fenótipo vascular letal com os seus receptores. Este facto levou a que se propusesse Dll4 como sendo o ligando responsável pela activação dos receptores Notch no endotélio embrionário. Para comprovar essa teoria desenharam-se estudos com mutantes de perda- e ganho-de-função em *dll4*.

Os trabalhos descritos nesta tese relatam as experiências de ganho-de-função em *Dll4*, mediante a produção e análise de embriões de murganho transgénicos com sobre-expressão condicional de *Dll4* ubíqua e restrita ao endotélio. A análise dos embriões foi feita ao nível da morfologia macroscópica das estruturas vasculares primárias, as principais artérias, veias e redes capilares, e ao nível celular, no endotélio e suas células de suporte. A análise compreende uma componente molecular, a nível genético e proteico, tentando não só elucidar a função de Dll4 na regulação do desenvolvimento vascular e na determinação da identidade endotelial arterial, como também ajudar a compreender as redes de regulação genica que se encontrem sob controlo da via Dll4-Notch.

Por fim, este trabalho pretende abrir caminho para a translação clínica ao, procurar confirmação da importância de Dll4 na regulação da neo-angiogénese tumoral. Espera-se que estes resultados, associados aos resultados de outros grupos com quem temos colaborado, permitam indicar Dll4 como um forte candidato a alvo terapêutico para patologias associadas a anomalias vasculares.

Capítulo 1 – Revisão bibliográfica

1.1 - Introdução ao estudo da genética de desenvolvimento em mamíferos.

Desde o início dos estudos da genética animal que se testaram vários modelos animais. Hoje em dia, os estudos em ratinho (*mus musculus*) assumem uma importância elevada. Tal advém, em particular, do desenvolvimento de técnicas robustas para manipulação genética e da conclusão dos trabalhos de sequenciação do genoma (Waterston, *et al.*, 2002) e, em geral, de se tratar do animal modelo, geneticamente manipulável, mais próximo da espécie humana.

Existem vários animais modelo ao dispor da comunidade científica. Modelos como *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta), *Caenorhabditis elegans* (nemátode) ou *Danio rerio* (peixe-zebra) têm vantagens face aos ratinhos, em especial no intervalo de geração, mas também por serem animais com menor complexidade genómica. Juntando a isto, temos o facto de na generalidade terem embriões mais acessíveis às técnicas de imagiologia correntes e uma gestação externa ao corpo da mãe, o que leva a que o progresso da análise genética do desenvolvimento embrionário nestas espécies seja mais expedito do que no ratinho. Apesar das contrariedades, reconhece-se um desafio único na tentativa de compreender a regulação génica do crescimento e diferenciação do embrião de mamíferos. Grande parte desse interesse prende-se com o reconhecimento de que o desenvolvimento embrionário do ratinho tem muitas semelhanças com o desenvolvimento embrionário humano e com o facto de se saber que os ratinhos podem apresentar doenças semelhantes às que afligem os humanos. A compreensão da mecânica da causalidade de processos como o cancro e os defeitos congénitos no ratinho, entre outros, produz normalmente informação que é directamente aplicável ao homem, sendo este o principal factor motivador da investigação em ratinho face aos modelos mais simples.

Os primeiros trabalhos experimentais em embriologia de mamíferos, ainda no Século XIX, foram essencialmente executados em embriões de coelho (Oppenheimer, 1967), embora só na segunda década do Século XX é que estes estudos tivessem começado a tomar conotações mais científicas (Hogan, *et al.*, 1994). Esta escolha prendeu-se com o facto de os embriões de coelho serem grandes e fáceis de manipular, devido à espessa camada de muco que os reveste, e com o facto de a ovulação ser induzida pelo acto da cópula, o que facilitava o estabelecimento da idade dos embriões. No entanto estas vantagens foram ultrapassadas

quando se começou a conhecer melhor a fisiologia e a genética dos ratinhos (Hogan, *et al.*, 1994).

Os trabalhos com embriões de ratinho começaram na década de quarenta, embora só em 1956 é que se tenha conseguido manter em cultura um embrião recém-fertilizado até ao estágio de blastocisto (Whitten, 1957). Foi nesta década ainda que se definiram com precisão os requisitos nutricionais dos embriões de ratinho na fase de pré-implantação, assim como se estabeleceram as técnicas de transferência uterina e para o oviduto, que permitiriam o desenvolvimento a termo de embriões cultivados. Com estes avanços tornou-se possível iniciar estudos reprodutíveis com grande número de embriões, um requisito essencial para o avanço científico.

Ainda nesta década fizeram-se as primeiras quimeras embrionárias por agregação (McLaren ; Biggers, 1958). Os primeiros métodos envolviam a quebra mecânica da *zona pellucida*, o que tornava a técnica extremamente difícil de executar sem danificar os embriões. A descoberta da enzima pronase e da sua actividade degradativa da *zona pellucida* tornou esta técnica mais acessível.

A década de setenta viu o início dos estudos de cariz genético em embriologia, entre eles destacam-se estudos em que se transferia ARN (ácido ribonucleico) para embriões e estudos em que se transferiam núcleos entre óvulos fertilizados (Brinster, *et al.*, 1980). Mais para o fim desta década a atenção dos investigadores virou-se para a morfogénese embrionária e a sua regulação, em particular para a formação das três linhas germinativas embrionárias. Neste sentido executaram-se experiências em que se injectavam células isoladas em blastocistos e outras em que se colocavam porções específicas de embriões em locais ectópicos (Papaioannou ; V.E, 1977). A grande descoberta decorrente destas experiências foi a da existência de células pluripotentes na ectoderme primitiva. Estas células, que mais tarde viriam a ser chamadas de células estaminais embrionárias (CEE) tinham a capacidade invulgar de contribuir para qualquer uma das linhagens germinativas. Estes estudos sobre a pluripotencialidade de certas células embrionárias foram complementados pelo uso de teratocarcinomas (Jacob, 1983). Os teratocarcinomas são tumores das gónadas, sendo compostos por células de diferentes tipos, todas derivadas de uma população de células estaminais, conhecidas por células do carcinoma embrionário. Como era relativamente fácil obter este tipo de células, estas foram usadas em várias experiências e mais tarde provou-se que podiam ser mantidas em cultura como uma mistura de células diferenciadas e indiferenciadas. A posterior descoberta que estas células podiam ser transferidas para blastocistos e contribuir para vários tecidos adultos veio então trazer esta técnica para a ribalta

da embriologia experimental, ainda na década de setenta. (Brinster, 1974, Mintz ; Illmensee, 1975).

O isolamento de linhas de células estaminais embrionárias (CEE) (Evans ; Kaufman, 1981, Martin, 1981) levou a que se tentasse fazer transferência de CEE para blastocistos, da mesma maneira que faziam com teratocarcinomas, permitindo uma integração na linha germinal estável, eficiente e reprodutível. Mais recentemente surgiu um método alternativo de integração de CEE em embriões, a agregação embrionária, que permite uma poupança de tempo e equipamento face a técnicas baseadas em injeção (Wood, *et al.*, 1993). A manipulação genética dessas células permitiu que se iniciassem estudos de função génica em grande número e com relativa facilidade, permitindo relacionar alteração génica com alterações fenotípicas para inúmeros genes até ao momento. Este sistema foi usado especialmente para produzir animais com perda de função génica, fazendo recurso à tecnologia de recombinação homóloga (Capecchi, 1989). As CEE também podem ser usadas para produzir animais transgênicos de ganho de função (Wood, *et al.*, 1993), mas o método mais popular é a microinjeção pronuclear, apesar de exigir mais equipamento (Rulicke ; Hubscher, 2000).

1.2 - Via Notch

Já se conheciam mutantes para o gene *Notch* em *D. melanogaster* desde o princípio do Século XX, com os estudos de Morgan e Moohr (Moohr, 1919, Morgan, 1917), devido à existência de moscas mutantes com perda de função parcial de Notch, que têm indentações na ponta das asas.

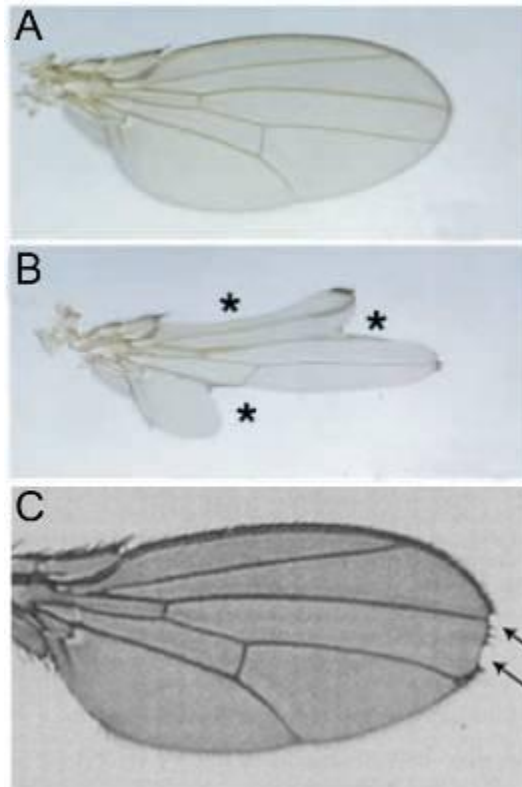


Figura 1 – Indentações em asas de *D. Melanogaster* com mutações em membros da via Notch. A) Asas de *D. melanogaster* controlo. B) Asas de *D. melanogaster* com mutações em *Supressor of hairless*. C) Asas de *D. melanogaster* com mutações em *Notch*. Adaptado de (Lai, 2004) e (Artavanis-Tsakonas, *et al.*, 1995)

O gene *Notch* de *D. melanogaster* codifica um receptor transmembranar de tipo I, com um único domínio transmembranar e foi identificado como sendo um gene neurogénico (Dietrich ; Campos-Ortega, 1984, Poulson, 1937).

Nos últimos vinte anos descobriu-se que *Notch*, e genes homólogos de *Notch* em outros organismos, estão envolvidos em variados processos celulares, tais como comunicação célula a célula, regulação da proliferação celular, regulação da sobrevivência celular, decisões de destino celular, na diferenciação de tecidos e morfogénese, quer em situações de desenvolvimento normal como em situações patológicas (Schweisguth, 2004). *Notch* engloba-se num sistema de sinalização, conhecido por Sinalização Notch ou Via Notch, que envolve, canonicamente, a existência de um ligando de superfície, Delta ou Serrate, em *D. melanogaster*, numa célula, que sinaliza para um receptor Notch numa célula vizinha.

Existem vários modelos de sinalização Notch, os mais conhecidos são:

- Inibição lateral, por exemplo explica a diferenciação de neuroblastos de *D. melanogaster* a partir de agregados homogéneos de células proneurais. Este modelo baseia-se no facto de todas as células envolvidas expressarem níveis basais de *Notch* e *Delta* e existirem variações, possivelmente aleatórias, no nível de activação de Notch nas diferentes células do grupo homogéneo. Em células em que o nível de Notch activado for mais alto vai ocorrer uma maior

inibição da expressão de *Delta* e indução de *Notch*, desequilibrando assim o grupo homogéneo. No caso dos agregados proneurais, as células que acabam a expressar mais *Delta* tornam-se neuroblastos e inibem as células que acabam a expressar mais *Notch* de diferenciar também, mantendo-se estas como epidermoblastos (Artavanis-Tsakonas, *et al.*, 1995). Inicialmente este tipo de sinalização foi atribuído a efeitos de retro-sinalização positiva e negativa de Notch em relação a si próprio e a Delta (Heitzler ; Simpson, 1993).

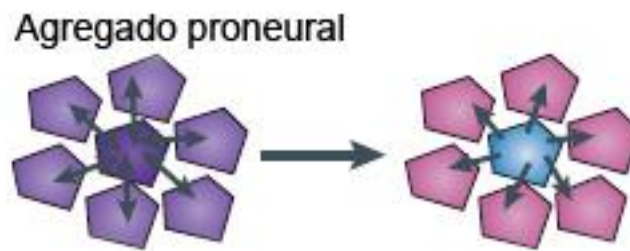


Figura 2 – Modelo de inibição lateral. As células com maior actividade de Notch assumem um destino diferente das células com menor actividade de Notch. Adaptado de (Bray, 2006).

- Modelo de decisão de linhagens, em que a sinalização Notch entre duas células filhas é dependente da herança assimétrica de reguladores de sinalização Notch. No caso das células precursoras dos órgãos sensoriais de *D. melanogaster*, este sistema depende da herança assimétrica de Numb entre as células filhas.

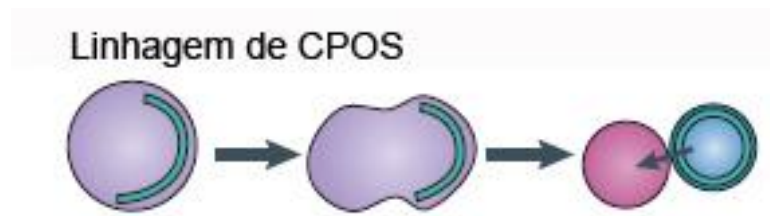


Figura 3 – Modelo de decisão de linhagens, em que células filhas assumem destinos celulares distintos consoante herdem assimetricamente reguladores da via Notch. Adaptado de (Bray, 2006).

- Modelo de Indução, em que a sinalização ocorre entre duas populações e pode estabelecer um organizador e/ou segregar as duas. Este tipo de sinalização pode ocorrer em zonas de fronteira entre tecidos ou entre nichos de células progenitoras e as células de estroma rodeantes (Bray, 2006).

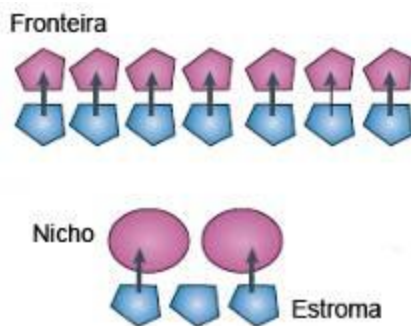


Figura 4 – Modelo de indução, em que a sinalização ocorre entre duas populações de células. Adaptado de (Bray, 2006).

Notch funciona como receptor na membrana celular e como regulador transcricional no núcleo da célula. Esta dupla funcionalidade requer um processo de proteólise intramembranar (Brown, *et al.*, 2000), que é comum a outros receptores membranares não relacionados, tais como SREBP, APP e N-caderina (Brown, *et al.*, 2000, Marambaud, *et al.*, 2003), apesar de ser uma forma de transdução de sinal pouco comum (Schweisguth, 2004).



Figura 5 – Representação esquemática de Notch. Na porção extracelular existem repetições do domínio EGF (factor de crescimento epidermal) e LIN (Notch/Lin12). Na porção intracelular existe o domínio RAM, repetições de domínio de ankirina e domínio PEST. Adaptado de (Bray, 2006).

Notch é traduzido como um péptido precursor com cerca de 300kDa, e na passagem pela região luminal do trans-Golgi, antes de ser transferido para a membrana, é clivado por uma *secretase semelhante-a-furina*. Essa clivagem separa a região extracelular da região transmembranar/intracelular (Fortini, 2002), que são ligadas de novo, por ligações não-covalentes, dependentes de Ca^{2+} (Rand, *et al.*, 2000), na superfície celular, formando um receptor heterodimérico, que é a principal forma detectada à superfície celular (Blaumueller, *et al.*, 1997, Logeat, *et al.*, 1998). Esta clivagem é chamada de S1 e não é dependente da ligação a um ligando. Quando o receptor Notch heterodimérico, na superfície celular, se liga a

um ligando da família Delta/Serrate/Jagged (Kimble ; Simpson, 1997), situado na superfície celular de uma célula vizinha, através das repetições de domínios EGF, torna-se então possível ocorrer a clivagem S2. A clivagem S2 é resultado da acção da desintegrina/metaloprotease TACE (enzima conversora de TNF-alfa, da família das metaloproteases ADAM) (Brou, *et al.*, 2000) em vertebrados e possivelmente Kuzbanian/SUP-17 em invertebrados (Weinmaster, 2000). A clivagem ocorre a doze resíduos do início do domínio transmembranar, libertando o domínio extracelular da membrana celular, que fica associado ao ligando. Esta clivagem é essencial para que ocorra a clivagem endomembranar S3 e S4, pois esta actividade proteolítica só pode acontecer se o domínio extracelular da proteína tiver menos que trinta resíduos de aminoácidos (Vooijs, *et al.*, 2004, Weinmaster, 2000). É provável que a presença do domínio extracelular de Notch induza uma conformação proteica que impede o acesso dos complexos de gama-secretase aos locais de proteólise em Notch (Vooijs, *et al.*, 2004).

Para que ocorram as clivagens S3 e S4 é também necessário que ocorra endocitose do ligando e correspondente transendocitose do domínio extracelular de Notch, que estão ligados (Le Borgne, *et al.*, 2005). Mutantes de perda de função em genes envolvidos em vias de endocitose e de ubiquitinação (Emery, *et al.*, 2005, Koo, *et al.*, 2005, Kramer, 2001, Lai, *et al.*, 2005) resultam em bloqueio na sinalização Notch (Le Borgne, *et al.*, 2005), apesar de o ligando estar presente na membrana celular. No entanto, a ubiquitinação de ligandos pode ter uma função dupla e antagonista, pois pode regular quer a endocitose de ligandos, ligados ou não ligados a receptor, para reciclagem para a membrana (Le Borgne, *et al.*, 2005), como para degradação do ligando. Provavelmente esta decisão de destino dos ligandos face à sua internalização depende do nível de ubiquitinação e este pode depender do contexto celular, embora ainda não seja conhecido como este mecanismo é regulado (Le Borgne, *et al.*, 2005). Com a transendocitose do domínio extracelular de Notch a extremidade carboxi-terminal que ficou ligada à membrana é então clivada nos locais S3 e S4 por um complexo de gamma-secretase, que contém presenilina, nicastrina, Aph1, Pen2 e outros componentes putativos (Fortini, 2002, Lai, 2004, Ray, *et al.*, 1999), libertando o domínio intra-celular de Notch para o citosol. O domínio intra-celular de Notch é a sua forma activa, como co-activador transcricional, e é então translocado para o núcleo, onde forma um complexo ternário com a proteína de ligação ao ADN CSL (CBF1 nos humanos, Supressor of hairless em *D. melanogaster* e LAG-1 em *C. elegans*) (Bray ; Furriols, 2001), e o co-activador Mastermind (Mam)/Lag-3 (Petcherski ; Kimble, 2000a, Petcherski ; Kimble, 2000b), actuando como um activador transcricional de genes alvo da Via Notch, genes homólogos de *Hairy* e *enhancer of*

split em *D. melanogaster* (Bailey ; Posakony, 1995, Iso, *et al.*, 2003b, Jarriault, *et al.*, 1995, Leimeister, *et al.*, 1999, Nakagawa, *et al.*, 2000, Nakagawa, *et al.*, 1999, Oellers, *et al.*, 1994).

Em ratinho os homólogos de *Hairy* e *enhancer of split* agrupam-se em quatro sub-famílias, *Hairy*, *E(spl)*, *Hey* e *Stra13* (Davis ; Turner, 2001). Na sub-família *hairy*, encontra-se apenas *hes1*. Na sub-família *E(spl)* existem cinco membros, *Hes2,3,5,6 e 7*. Na sub-família *Hey* existem três membros, *Hey1,2 e L*. Na sub-família *Stra13* existem dois membros, *Stra13 e dec2*. Na ausência de Notch este complexo recruta co-repressores transcripcionais que vão bloquear a expressão de genes alvo da Via Notch.

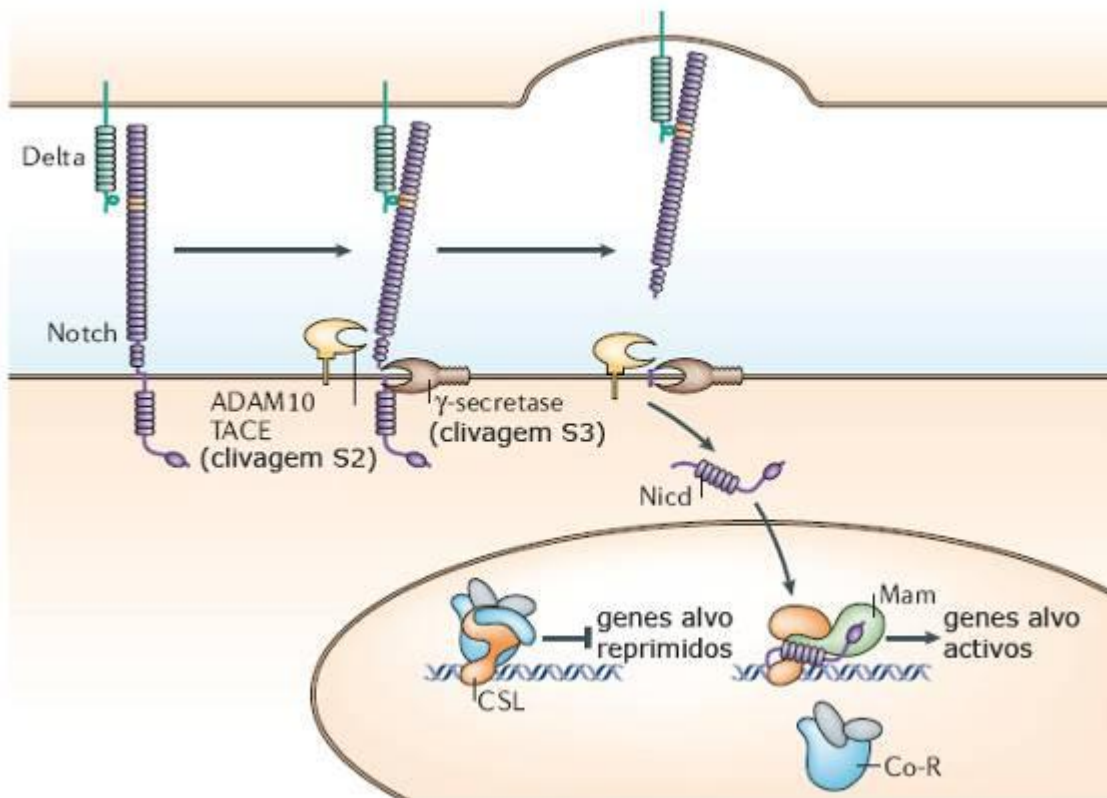


Figura 6 – Esquema simplificado da sinalização Notch, indicando as clivagens que ocorrem após a ligação do ligando Delta e o percurso e actividade do domínio intracelular de Notch após a clivagem S3. Adaptado de (Bray, 2006).

Em *D. melanogaster*, onde o gene foi primeiro identificado, existe apenas um receptor Notch, enquanto em ratinho existem quatro receptores Notch, Notch1, 2, 3 e 4 (Gridley, 1997).

1.2.1 - Ligandos DSL

Os ligandos para os receptores Notch pertencem à família de ligandos DSL (homólogos de *Delta* e *Serrate* de *D. melanogaster* e *Lag-2* de *C. elegans*) (Artavanis-Tsakonas, *et al.*, 1995). Estão descritos dois ligandos distintos em *D. melanogaster*, *Delta* e *Serrate*, e em ratinhos estão descritos cinco ligandos para receptores Notch, *Delta-like 1, 3 e 4* e *Jagged 1 e 2* (com maior homologia a *serrate*) (Artavanis-Tsakonas, *et al.*, 1999). Os ligandos DSL são muito variados mas todos codificam proteínas transmembranares de tipo I. A região extracelular é muito pouco conservada mas as regiões extracelulares de todos os ligandos contêm um domínio DSL, responsável pela ligação a Notch, e um número variável de repetições do domínio EGF (factor de crescimento epidérmico) (Le Borgne, *et al.*, 2005).

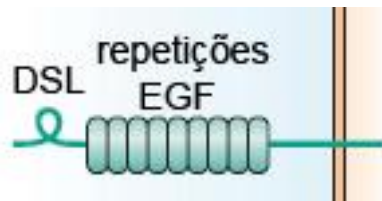


Figura 7 – Representação esquemática de Delta. Observam-se os domínios DSL (Delta-Serrate-Lag-2) e repetições de domínio EGF. Adaptado de (Bray, 2006).

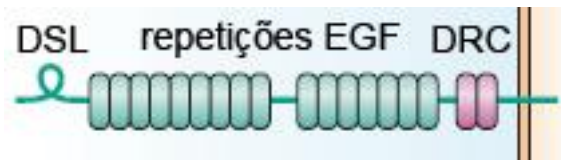


Figura 8 – Representação esquemática de Jagged. Observam-se os domínios DSL (Delta-Serrate-Lag-2), repetições de domínio EGF e domínio rico em cisteínas. Adaptado de (Bray, 2006).

Estudos com mosaicos genéticos, em *D. Melanogaster*, revelaram que a acção de Delta é não-autónoma e a curta distância, o que é consistente com a noção de que Delta é um ligando transmembranar que só afecta a actividade de células adjacentes que expressem o receptor Notch (Heitzler ; Simpson, 1991). Estudos mais recentes levantam a hipótese de a sinalização Notch ser bi-direcional e haver uma funcionalidade para o domínio intracelular de Delta (Bland, *et al.*, 2003, Ikeuchi ; Sisodia, 2003, Klueg, *et al.*, 1998, LaVoie ; Selkoe, 2003, Mishra-Gorur, *et al.*, 2002, Pintar, *et al.*, 2007, Qi, *et al.*, 1999, Sapir, *et al.*, 2005, Six, *et al.*, 2003), que é detectado no núcleo das células que expressam Delta, em *D. melanogaster* (Bland, *et al.*, 2003).

Delta, de modo similar a Notch, é clivado em três locais, embora de forma independente de sinalização (Six, *et al.*, 2003). Um local é na região extracelular, a dez resíduos de aminoácidos da região transmembranar, e é dependente da acção da metaloprotease ADAM (proteínas membranares com domínio de desintegrina e metaloprotease), Kuzbanian (Bland, *et al.*, 2003, Six, *et al.*, 2003). Os outros dois locais são na região transmembranar e são alvo de uma actividade de gama-secretase, em complexo com presenilina (Six, *et al.*, 2003), resultando na libertação do domínio intracelular de Delta, que se dirige para o núcleo de células em cultura (este resultado ainda não foi observado *in vivo*), e na libertação da região extracelular de Delta, uma forma solúvel de Delta, cuja função, a existir, é ainda desconhecida (Sapir, *et al.*, 2005). Estas clivagens aparentam ser regulatórias, pois são independentes da ligação ao receptor Notch, mas dependentes de sinalização Notch activada (Sapir, *et al.*, 2005), sendo potencialmente usadas pela célula para potenciar as diferenças entre células sinalizadoras (com maior expressão de ligando DSL) e células sinalizadas (com maior expressão do receptor Notch), através de diminuição da actividade/disponibilidade de Delta (Mishra-Gorur, *et al.*, 2002, Sapir, *et al.*, 2005). A função da região extracelular de Delta, quando liberta da membrana por Kuzbanian (Qi, *et al.*, 1999), é incerta. Há relatos de que terá uma função sinalizadora em células de mamíferos (Fitzgerald ; Greenwald, 1995, Hicks, *et al.*, 2002, Li, *et al.*, 1998, Morrison, *et al.*, 2000, Ohishi, *et al.*, 2000, Qi, *et al.*, 1999, Sestan, *et al.*, 1999, Varnum-Finney, *et al.*, 1998, Wang, *et al.*, 1998b) e relatos de que terá uma função reguladora como dominante negativo em *D. melanogaster* (Fleming, *et al.*, 1997, Hukriede ; Fleming, 1997, Hukriede, *et al.*, 1997, Qi, *et al.*, 1999, Sun ; Artavanis-Tsakonas, 1997).

Alguns estudos relatam a existência de variantes solúveis de ligandos DSL (Hicks, *et al.*, 2002, Li, *et al.*, 1998). Os resultados parecem indicar que estas variantes solúveis por si não conseguem activar o receptor Notch, apesar de conseguirem ligar-se a ele (Hicks, *et al.*, 2002). Para estas variantes conseguirem activar o receptor é necessário que os ligandos se oligomerizem, formando agregados (Hicks, *et al.*, 2002). É ainda incerto se estes resultados podem ser extrapolados para as formas membranares dos ligandos.

Outro estudo levanta a questão da sinalização Notch à distância (De Joussineau, *et al.*, 2003). Segundo esse estudo, a expressão de Delta nas células precursoras dos órgãos sensoriais, células pertencentes a grupos proneurais de células epiteliais, leva à formação de filopódios (De Joussineau, *et al.*, 2003), sendo que a perda de um alelo de Delta leva a uma diminuição na densidade de filopódios nessas células (De Joussineau, *et al.*, 2003). Não se sabe qual o mecanismo que conduz a esta observação, nem se esta mecanística entre Delta e filopódios provém de uma relação directa ou indirecta/secundária. Segundo este estudo, os

filopódios destas células, com presença de Delta ao longo dos processos, são responsáveis pela formação de um campo inibidor de diferenciação de células epiteliais em células mecanosensoriais, por um processo de inibição lateral, à volta das células precursoras dos órgãos sensoriais, com um raio equivalente ao diâmetro de três a cinco células (De Jossineau, *et al.*, 2003). Como nem todas as células com expressão de genes da Via Notch formam estruturas filopodiais, é provável que este mecanismo não seja generalizado nos diferentes sistemas que recorrem a Notch.

1.2.2 - Regulação da sinalização Notch

A sinalização Notch é regulada a diversos níveis, tais como transcricionais, pós-traducionais, reciclagem endossômica, entre outros (Le Borgne, *et al.*, 2005, Schweisguth, 2004).

Ofut codifica uma O-fucosiltransferase que adiciona O-fucose a resíduos de serina e treonina em regiões de consenso nas repetições de domínios de EGF do receptor Notch (Schweisguth, 2004, Xu, *et al.*, 2005). A região de consenso é $C^2XXX(G/A/S)(T/S)C^3$, sendo que C^2 e C^3 são, respectivamente, a segunda e terceira cisteína dos domínios EGF (Lei, *et al.*, 2003). 23 Das 36 repetições de domínio EGF no receptor Notch de *D. melanogaster* têm esta região de consenso e são potencialmente O-fucosiláveis (Lei, *et al.*, 2003). A adição de O-fucose a estes resíduos é um pré-requisito para a glicosilação por Fringe (Lei, *et al.*, 2003). *Fringe* codifica uma β -1,3-N-acetilglucosaminil transferase residente no complexo de Golgi (Fleming, *et al.*, 1997, Jacobsen, *et al.*, 1998, Panin, *et al.*, 1997, Xu, *et al.*, 2005) que glicosila a O-fucose nos resíduos específicos de serina e treonina em domínios de EGF (Yang, *et al.*, 2005), incluindo a repetição 12, que está envolvida na ligação aos ligandos DSL (Bruckner, *et al.*, 2000, Ju, *et al.*, 2000, Lei, *et al.*, 2003, Schweisguth, 2004, Shao, *et al.*, 2003). Estas glicosilações do receptor Notch são regulatórias embora seja incerto a que nível serão mais importantes. Existem relatos de que a sua função é regular a eficiência de activação por Delta ou Serrate, e seus homólogos em outras espécies (Lei, *et al.*, 2003, Schweisguth, 2004). Em *D. melanogaster*, *fringe* é expresso nas células dorsais da asa, tornando essas células mais sensíveis a Delta, que é expresso nas células ventrais e menos sensível a Serrate, que é expresso dorsalmente (Panin, *et al.*, 1997, Schweisguth, 2004). A glicosilação da repetição 12 de domínio EGF é mais importante para a diminuição da capacidade de interacção de Notch com Serrate (Lei, *et al.*, 2003, Schweisguth, 2004). Estes

resultados indicam que a afinidade do receptor Notch para um determinado ligando é dependente da glicosilação de que foi alvo numa determinada célula (Schweisguth, 2004), e que tal é alvo de regulação. Outros artigos indicam a função de Fringe como sendo a de regular a capacidade de Delta e Serrate inibirem em *cis* o receptor Notch (Katsube ; Sakamoto, 2005, Lei, *et al.*, 2003, Panin, *et al.*, 1997, Schweisguth, 2004) impedindo a formação de complexos heteroméricos em compartimentos intracelulares. Não se sabe se estas funções são exclusivas ou se Fringe terá esta dupla funcionalidade.

Os próprios ligandos DSL podem actuar como agentes reguladores da sinalização Notch. Estudos recentes indicam que Dll3 não funciona como um activador de nenhum receptor Notch, mas sim como um inibidor da activação de receptores Notch (Ladi, *et al.*, 2005). Não se sabe exactamente como funciona este efeito regulatório mas é possível que tenha a função de balancear a função potenciadora da actividade de Dll1 por Lunatic fringe, um dos homólogos de Fringe em mamíferos (Ladi, *et al.*, 2005).

Os receptores Notch e os seus ligandos são alvos de endocitose, quer com fins regulatórios, como até possivelmente com fins funcionais (Le Borgne, 2006, Le Borgne, *et al.*, 2005, Schweisguth, 2004). Em mamíferos são conhecidas várias E3 ligases de ubiquitina (d'Azzo, *et al.*, 2005) que têm como alvo o receptor Notch, marcando-o para internalização por endocitose, Itch, c-Cbl, Nedd4 e Deltex (Jehn, *et al.*, 2002, Le Borgne, 2006, Le Borgne, *et al.*, 2005, Schweisguth, 2004). O destino de Notch pode ser a reciclagem de volta para a membrana celular através de exocistos, no caso de ter sido ubiquitinado por Deltex (Le Borgne, *et al.*, 2005) ou, no caso de Itch, Nedd4 e c-Cbl, o seu encaminhamento para os corpos multivesiculares e de seguida para o proteasoma, onde é degradado, isto tendo em conta uma função regulatória para a endocitose de Notch (d'Azzo, *et al.*, 2005, Jehn, *et al.*, 2002, Le Borgne, 2006, Le Borgne, *et al.*, 2005, Schweisguth, 2004). Se a endocitose de Notch terá uma importância funcional é ainda incerto, no entanto, existem evidências para que a clivagem de Notch pelo complexo de gama-secretase ocorra em vesículas de endocitose (Gupta-Rossi, *et al.*, 2004, Le Borgne, *et al.*, 2005, Schweisguth, 2004). Existem também evidências para que a internalização dos ligandos DSL por endossomas de reciclagem positivos para *rab11* seja necessária para a sua funcionalidade ou “activação” (Emery, *et al.*, 2005, Le Borgne, 2006).

Numb é um regulador negativo de sinalização por Notch, actuando em vesículas citoplasmáticas (Jafar-Nejad, *et al.*, 2002, Le Borgne, 2006, O'Connor-Giles ; Skeath, 2003). Numb interactua com Notch, Alpha-adaptina (faz parte do complexo AP-2, promove a interacção entre substratos de endocitose e a clatrina de vesículas endocíticas (Jafar-Nejad, *et al.*, 2002, Le Borgne, 2006)) e com Itch, promovendo a ubiquitinação de Notch por Itch e

consequente encaminhamento para uma via endocítica degradativa (Le Borgne, 2006). Numb também interacciona com Sanpodo (Le Borgne, 2006, O'Connor-Giles ; Skeath, 2003). *Sanpodo* codifica uma proteína transmembranar que interacciona com Notch e com Numb (O'Connor-Giles ; Skeath, 2003). Sanpodo é um regulador positivo da sinalização Notch (Hutterer ; Knoblich, 2005, O'Connor-Giles ; Skeath, 2003) que na presença de Numb é endocitado, deixando de exercer a sua acção positiva sobre o receptor Notch (Hutterer ; Knoblich, 2005). Não é conhecido um homólogo de Sanpodo em mamíferos (Le Borgne, 2006).

A sinalização por Notch também é regulada ao nível dos ligandos DSL, é necessário que ocorra endocitose dos ligandos DSL nas células sinalizadoras para que ocorra activação de Notch nas células sinalizadas (Chitnis, 2006, Lai, *et al.*, 2005, Le Borgne, 2006, Le Borgne, *et al.*, 2005, Pitsouli ; Delidakis, 2005, Wang ; Struhl, 2005). Existem duas teorias que tentam explicar como um evento endocítico numa célula pode afectar o funcionamento de uma via de sinalização noutra célula. Uma teoria refere que a força gerada pela internalização de ligandos DSL ligados ao receptor Notch é necessária para expôr o local S2 de Notch a metaloproteases, de modo que ocorra essa clivagem (Le Borgne, 2006, Wang ; Struhl, 2005, Wilkin ; Baron, 2005). A endocitose de Delta é necessária para que ocorra a trans-endocitose do domínio extracelular de Notch mas é ainda incerto se a trans-endocitose é um evento essencial à activação de Notch (Le Borgne, 2006, Parks, *et al.*, 2000, Wang ; Struhl, 2005). Um artigo recente diz que os ligandos DSL ligam-se ao receptor Notch e exercem força sobre o receptor de modo a separar as duas partes do receptor heterodimérico (formado pela clivagem S1). Segundo estes resultados este evento é independente de metaloproteases, precedendo a clivagem S2. Assim sendo, a endocitose de Delta, e consequente trans-endocitose do domínio extracelular de Notch, são independentes da clivagem S2, que ocorre após este evento, ocorrendo simplesmente por força física gerada pela endocitose (Nichols, *et al.*, 2007).

A outra teoria baseia-se na suposição que Delta tem de passar por um compartimento intracelular antes de se tornar competente a gerar um sinal (Le Borgne, 2006, Wang ; Struhl, 2005, Wilkin ; Baron, 2005). Foi proposto que Epsina (*liquid facet* em *D. melanogaster*) (Le Borgne, 2006, Wendland, 2002), uma proteína endocítica que se liga a fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfato na membrana celular, a Clatrina, ao complexo AP-2 e a outras proteínas acessório em vesículas endocíticas e tem um domínio de ligação a mono-ubiquitina (Wang ; Struhl, 2005, Wendland, 2002), liga-se a ligandos DSL mono-ubiquitinilados, recrutando-os para endossomas de reciclagem onde estes são convertidos de uma forma inactiva para uma forma activa (Le Borgne, 2006, Wang ; Struhl, 2005, Wilkin ; Baron, 2005). Esta transformação poderá ser bioquímica ou poderá ser baseada na oligomerização dos ligandos DSL em

exocistos (Le Borgne, 2006, Le Borgne, *et al.*, 2005, Wang ; Struhl, 2005, Wilkin ; Baron, 2005).

São conhecidas duas E3 ligases de ubiquitina que têm a capacidade de mono-ubiquitinar ligandos DSL, *Mind-bomb* e *Neuralized* (Le Borgne, 2006, Wang ; Struhl, 2005, Wilkin ; Baron, 2005). A ubiquitinação de ligandos DSL é essencial para que ocorra a endocitose mediada por Epsina e este passo é essencial à activação de Notch (Wang ; Struhl, 2005).

1.2.3 - Delta-like 4

O gene *Delta-like 4* (*Dll4*) foi identificado e clonado em pelo menos 5 laboratórios (Mailhos, *et al.*, 2001, Rao, *et al.*, 2000, Shutter, *et al.*, 2000, Yoneya, *et al.*, 2001), incluindo a Unidade de Biologia do Desenvolvimento, FML, (dados não publicados), que foi o local de origem do clone usado neste estudo.

A expressão de *dll4* inicia-se aos 7,5 dias *post coitum* (dpc), onde é restrita ao tecido extra-embrionário, como a membrana de Reicherts e a células gigantes do trofoblasto (Duarte, *et al.*, 2004, Mailhos, *et al.*, 2001).

Aos 8 dpc *dll4* é expresso na região do crescente cardíaco e nos primórdios das aortas dorsais (Mailhos, *et al.*, 2001).

Aos 8,5 dpc *dll4* é expresso no endotélio das aortas dorsais, na artéria umbilical, artérias carótidas internas, artéria vitelina, nos vasos sanguíneos da metade posterior da membrana vitelina (região arterial) e no tubo cardíaco em desenvolvimento (Duarte, *et al.*, 2004, Mailhos, *et al.*, 2001).

Aos 9,5 dpc a expressão é aparente nos grandes vasos arteriais, como a aorta, arcos branquiais, artérias umbilical e mesentérica, vasos inter-somáticos e no endocárdio (Duarte, *et al.*, 2004, Mailhos, *et al.*, 2001).

A expressão de *dll4* vai desaparecendo dos grandes vasos e do coração até aos 14 dpc, contudo continua a haver expressão nos pequenos vasos arteriais e capilares (Benedito ; Duarte, 2005) .

Entre os 9,5 e os 13 dpc encontra-se expressão de *Dll4* numa pequena faixa de células dispersas no tubo neural ventral, pensa-se que marque neurónios recém-diferenciados (Mailhos, *et al.*, 2001), possivelmente interneurónios V2 (Benedito ; Duarte, 2005). Aos 12,5 dpc observam-se células positivas dispersas na retina neural, de novo pensa-se que marque

neurónios recém-diferenciados que migram da região intra-ventricular para a região ventricular externa (Benedito ; Duarte, 2005, Mailhos, *et al.*, 2001).

O gene *Dll4* também é expresso no timo em desenvolvimento, no epitélio pulmonar, córtex adrenal, baço, nódulo linfático, intestino, sistema olfactório e nos glomérulos renais (Benedito ; Duarte, 2005, Mailhos, *et al.*, 2001, Shutter, *et al.*, 2000).

No adulto encontramos expressão no rim, em células endoteliais de vasos localizados entre os túbulos e a medula (Shutter, *et al.*, 2000), no pulmão, no coração, no ovário e no intestino (Mailhos, *et al.*, 2001).

A expressão deste gene de forma complementar a Notch1 e 4 no sistema vascular arterial embrionário e no sistema vascular arterial e capilar de ratinhos adultos, incluindo expressão na vasculatura tumoral (Mailhos, *et al.*, 2001), foi altamente sugestiva da grande importância que este gene poderia ter na regulação do desenvolvimento vascular e a razão pela qual tantos trabalhos foram feitos acerca da sua função (Benedito ; Duarte, 2005, Claxton ; Fruttiger, 2004, Diez, *et al.*, 2006, Dorsch, *et al.*, 2002, Duarte, *et al.*, 2004, Gale, *et al.*, 2004, Hellstrom, *et al.*, 2007, Iso, *et al.*, 2006, Krebs, *et al.*, 2004, Leslie, *et al.*, 2007, Liu, *et al.*, 2003, Noguera-Troise, *et al.*, 2006, Patel, *et al.*, 2005, Ridgway, *et al.*, 2006, Siekmann ; Lawson, 2007, Sugimoto, *et al.*, 2006, Villa, *et al.*, 2001, Williams, *et al.*, 2006). (Lobov, *et al.*, 2007, Scehnet, *et al.*, 2007, Suchting, *et al.*, 2007).

1.3 – Formação e regulação do sistema vascular

Todos os vertebrados necessitam de um sistema de distribuição de oxigénio e nutrientes, que também é usado para o escoamento de dióxido de carbono e outros metabolitos para os sistemas de excreção. Esse sistema é o sistema circulatório vascular e linfático e é essencial a uma correcta embriogénese, pois todos os tecidos dependem dele para um correcto desenvolvimento e crescimento (Eichmann, *et al.*, 2005, Roman ; Weinstein, 2000).

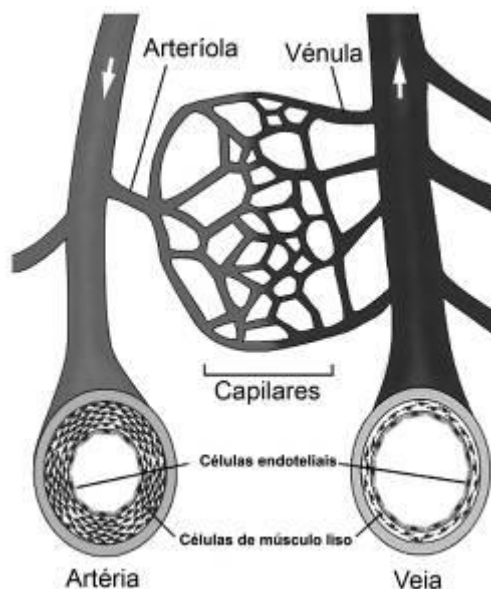


Figura 9 – Distinção estrutural entre artérias e veias. Os vasos sanguíneos são compostos por uma camada endotelial rodeada por camadas de células de músculo liso cobertas por tecidos fibrosos conectivos. As artérias têm uma camada de músculo liso mais grossa e são mais elásticas, as veias têm uma camada mais fina de músculo liso. Arteriolas e vénulas são, respectivamente, pequenas artérias e veias que se ligam a redes de capilares. Os capilares compõem redes de pequenos vasos sanguíneos que permitem a ocorrência de trocas de oxigénio, nutrientes e metabolitos entre o sangue e os tecidos rodeantes. O fluxo sanguíneo está indicado por setas brancas. Adaptado de (Hirashima ; Suda, 2006).

Em animais primitivos, como *C. elegans* ou *D. melanogaster*, o oxigénio consegue chegar a todas as células do corpo por difusão (Carmeliet, 2005, Eichmann, *et al.*, 2005). Como o limite de difusão de moléculas é limitado (100-200 μ m no caso do oxigénio) (Eichmann, *et al.*, 2005) a formação do sistema circulatório no embrião vertebrado tem de ocorrer muito cedo no desenvolvimento embrionário. Com efeito, o sistema cardiovascular é o primeiro a formar-se durante o desenvolvimento embrionário (Eichmann, *et al.*, 2005, Rossant ; Hirashima, 2003).

O componente mais essencial dos vasos sanguíneos é a célula endotelial. Todos os vasos sanguíneos, desde os capilares à aorta, consistem de uma monocamada de células endoteliais, o endotélio, organizadas em mosaico à volta de um lúmen central, através do qual ocorre a circulação sanguínea (Plank ; Sleeman, 2003). O endotélio saudável representa uma população muito estável de células, com junções célula-célula muito apertadas e um período de semi-vida que se mede em meses ou anos (Han ; Liu, 1999). Externamente ao endotélio encontra-se a membrana basal, que separa o endotélio do tecido conjuntivo circundante e células peri-endoteliais, perícitos nos capilares e células de músculo liso nos vasos maiores (Plank ; Sleeman, 2003). Ambas estas estruturas extra-endoteliais têm funções na estabilização dos vasos sanguíneos e manutenção do estado quiescente do endotélio (Plank ; Sleeman, 2003).

A formação do sistema cardiovascular inicia-se com a especificação de progenitores mesodérmicos, que se diferenciam, migram e em seguida se agregam para formar um plexo vascular disperso (Coultas, *et al.*, 2005, Rossant ; Howard, 2002). Este plexo é então reorganizado, através de processos de proliferação e regressão localizados e processos de ramificação e migração para diferentes partes do organismo (Coultas, *et al.*, 2005, Rossant ; Howard, 2002). Estes vasos precisam também de se diferenciar e subdividir em artérias, arteríolas, capilares, vénulas e veias (Coultas, *et al.*, 2005), que conseqüentemente precisam também de estabilizar estruturalmente, tal sendo conseguido à custa do recrutamento de células de músculo liso e perícitos (Carmeliet, 2005, Coultas, *et al.*, 2005, Eichmann, *et al.*, 2005, Risau, 1998, Roman ; Weinstein, 2000, Rossant ; Howard, 2002). Ainda não se conhecem todos os factores responsáveis pela organização e orientação destes processos mas do que se sabe estes são regulados por programação genética (Adams, 2003, Carmeliet, 2005, Conway, *et al.*, 2001, Jain, 2003, Rossant ; Hirashima, 2003, Rossant ; Howard, 2002, Shih, *et al.*, 2002, Shima ; Mailhos, 2000, Sullivan ; Bicknell, 2003) e factores extrínsecos, como a hipóxia (Ramirez-Bergeron, *et al.*, 2004) (Pugh ; Ratcliffe, 2003) e o fluxo hemodinâmico (le Noble, *et al.*, 2004).

São conhecidos dois mecanismos responsáveis pela formação de vasos sanguíneos, a vasculogénese e a angiogénese (Carmeliet, 2005, Conway, *et al.*, 2001, Drake, 2003, Risau, 1998), ambas as palavras têm o mesmo significado mas descrevem processos biológicos distintos (Drake, 2003).

A vasculogénese (Risau, 1998) descreve um processo em que células mesodérmicas se diferenciam em progenitores endoteliais, chamados angioblastos quando migram para o embrião próprio e hemangioblastos quando migram para a membrana vitelina (Coultas, *et al.*, 2005, Drake, 2003, Drake ; Fleming, 2000), que então migram para locais pré-determinados, onde tipicamente se formam os vasos sanguíneos, e se agregam formando cordões que mais tarde se lumenizam formando estruturas tubulares (Coultas, *et al.*, 2005, Drake, 2003, Patan, 2000, Risau, 1998), por vezes organizadas em plexos (Yancopoulos, *et al.*, 2000). Por este processo formam-se as camadas endoteliais dos plexos perineural e do saco vitelino, assim como as veias cardinais e artérias dorsais (Roman ; Weinstein, 2000).

A diferenciação de progenitores endoteliais é primeiro observada durante a gastrulação quando células invaginam através da crista primitiva e formam a mesoderme (Eichmann, *et al.*, 2005). Essas células mesodérmicas organizam-se em mesoderme axial (notocorda), mesoderme paraxial (sómicos), mesoderme intermédia (rins e gónadas) e a placa mesodérmica lateral (que dá origem ao coração, endotélio e células sanguíneas) (Eichmann, *et al.*, 2005).

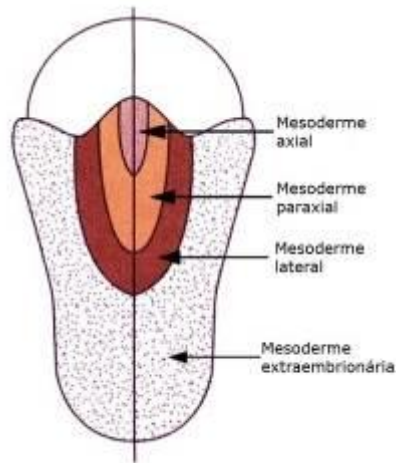


Figura 10 – Mapa de tecidos embrionários em gastrulação. Adaptado de (Eichmann, *et al.*, 2005).

A placa mesodérmica lateral divide-se em duas camadas após a formação do celoma, a somatopleura (dorsal) e a esplancnopleura (ventral). A parte posterior da mesoderme vai dar origem à mesoderme extra-embriónica (Eichmann, *et al.*, 2005). Os primeiros progenitores endoteliais originam na mesoderme lateral e posterior e têm a capacidade de diferenciar células endoteliais e hematopoiéticas, podendo assumir o nome de hemangioblastos (Eichmann, *et al.*, 2005). Estes precursores migram para a membrana vitelina onde diferenciam células endoteliais e células hematopoiéticas nas ilhotas sanguíneas (Eichmann, *et al.*, 2005). Durante a migração estes precursores formam agregados hemangioblásticos em que o núcleo interior tem precursores hematopoiéticos rodeados por uma camada externa de precursores endoteliais (Eichmann, *et al.*, 2005). A camada interna dá origem a eritrócitos e a camada externa dá origem à vasculatura da membrana vitelina por anastomose de ilhotas sanguíneas (Eichmann, *et al.*, 2005), formando um plexo primário de capilares sanguíneos. Ao mesmo tempo, no embrião formam-se as aortas dorsais e uma rede de capilares difusa e um pouco mais tarde formam-se as veias cardinais (Drake ; Fleming, 2000, Eichmann, *et al.*, 2005).

A diferenciação de células endoteliais no embrião neste período ocorre independentemente de hematopoiese, que só se inicia por volta dos onze *dias post coitum* (dpc) em agregados hematopoiéticos situados nas artérias da região aorta-gónadas-mesonefros (Eichmann, *et al.*, 2005, Hamaguchi, *et al.*, 1999, Marshall, *et al.*, 1999). As células endoteliais dos novos vasos do embrião podem provir também de progenitores que viajam desde as ilhotas sanguíneas da membrana vitelina (Drake, 2003).

A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de células endoteliais pré-existentes e representa, no embrião, a remodelação do plexo vascular primário criado pela vasculogênese (Carmeliet, 2005, Eichmann, *et al.*, 2005, Roman ; Weinstein, 2000). A angiogênese é um mecanismo complexo composto por vários processos, tais como: vasodilatação, permeabilidade celular, suporte periendothelial, proliferação, migração, lumenização, sobrevivência, diferenciação e remodelação (Carmeliet, 2000). Em situações fisiológicas a angiogênese só ocorre no embrião, durante o seu desenvolvimento, e no adulto durante o ciclo éstrico. Em situações patológicas a angiogênese pode ocorrer em processos de cicatrização de feridas e em processos tumorais, entre outros (Carmeliet, 2005, Carmeliet, 2000, Papetti ; Herman, 2002).

Inicialmente, para os vasos sanguíneos gerarem novos brotos/rebentos, as células murais (perícitos e células de músculo liso) têm de ser removidas. Em seguida a matriz extracelular é degradada por metaloproteases (Papetti ; Herman, 2002) e as membranas basais das células endoteliais são remodeladas. As células do estroma circundante criam então uma nova matriz extracelular, que em conjunto com a presença de factores de crescimento solúveis gera um ambiente propício à migração e proliferação de células endoteliais (Papetti ; Herman, 2002). Após terem gerado suficientes células endoteliais a sua divisão é bloqueada e estas formam uma monocamada em estrutura tubular (Papetti ; Herman, 2002). Em seguida são recrutadas células murais para a superfície abluminal do endotélio e inicia-se a perfusão sanguínea (Papetti ; Herman, 2002). O processo angiogénico pode, alternativamente, ocorrer por divisão terminal de um vaso crescente ou intussuscepção (divisão longitudinal de um vaso pré-existente com células peri-endoteliais) (Carmeliet, 2000, Papetti ; Herman, 2002). Resumindo, a angiogênese tem sempre por objectivo a estruturação do sistema vascular de modo a que o sangue chegue de forma organizada a todos os tecidos e órgãos de um organismo.

Conhecem-se várias vias de sinalização com influência no estabelecimento, maturação e estabilização da vasculatura, entre as quais se destacam as vias VEGF, Angiopoietin, Hedgehog, Ephrin, TGF-beta, Wnt e Notch (Rossant ; Howard, 2002).

1.3.1 - Sinalização Hedgehog:

Em vertebrados existem três homólogos do gene *hedgehog* de *D. melanogaster*, *Sonic hedgehog* (o que tem um padrão de expressão mais extenso no embrião), *Desert hedgehog* e *Indian hedgehog* (Murone, *et al.*, 1999, Sullivan ; Bicknell, 2003). Estes genes codificam ligandos solúveis que se ligam ao receptor Patched1, impedindo que este iniba a

sinalização pelo receptor Smoothened, levando a que factores de transcrição da família Gli se dirijam para o núcleo onde regulam a expressão de genes responsáveis por eventos morfogénicos (Murone, *et al.*, 1999, Sullivan ; Bicknell, 2003).

Em *D. rerio*, *Hedgehog* é expresso na notocorda e activa a expressão de *VEGF* nos sómitos (Lawson, *et al.*, 2002). A perda de função deste gene faz com que não haja expressão de *VEGF* nos sómitos e leva a que só se forme um vaso dorsal axial, com características venosas (pelo posicionamento e expressão de marcadores endoteliais venosos) (Lawson, *et al.*, 2002, Roman ; Weinstein, 2000). Esta ligação tão forte entre a sinalização Hedgehog e VEGF no desenvolvimento vascular embrionário ainda não foi provada *in vivo* em mamíferos pois nenhum mutante de perda de função individual para os genes *Hedgehog* em ratinho tem um fenótipo equivalente ao dos mutantes de *D. rerio* (Pola, *et al.*, 2001). No entanto, no adulto, a expressão ectópica de *Sonic hedgehog* tem a capacidade de induzir a ocorrência de hipervascularização, através da indução da expressão de *Vegf* e *Angiopietinas* (Pola, *et al.*, 2001).

Recentemente surgiram evidências que podem apontar para que a sinalização Hedgehog possa regular directamente a expressão de *Dll4* e *Notch1* através dos factores de transcrição *Foxc1* e *Foxc2* (Seo, *et al.*, 2006). Mutantes de perda de função em *Sonic hedgehog* têm defeitos na vascularização do pulmão (Pepicelli, *et al.*, 1998). Mutantes de perda de função em *Indian hedgehog* e *Smoothened* têm defeitos na diferenciação de hemangioblastos, produzem menos ilhotas sanguíneas (que são mais pequenas) e têm defeitos angiogénicos na membrana vitelina, não ocorrendo a remodelação do plexo primário da membrana vitelina, no entanto não têm influência na especificação de angioblastos para a formação dos vasos dorsais axiais (Byrd, *et al.*, 2002).

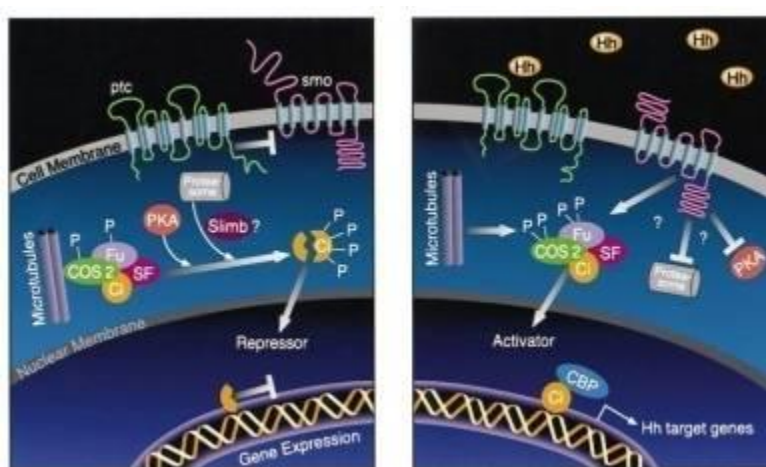


Figura 11 – Modelo de transdução de sinal Hedgehog em *D. melanogaster*. À esquerda. Na ausência de estimulação por Hedgehog, Patched (Ptc) reprime a actividade latente de Smoothened (Smo), evitando assim a activação dos genes alvo de Hedgehog. Membros da família *cubitus interruptus/Gli* (*Ci/Gli*) são integrados num complexo associado aos microtúbulos em que também se encontra Cos-2, Fu e Su(fu), e convertidos numa forma repressora por PKA e o proteassoma. À direita. Quando Hedgehog se liga a Patched permite que ocorra sinalização por Smoothened. A sinalização Hedgehog inibe a proteólise de Ci e conduz à dissociação do complexo proteico Cos-2/Fu/Su(fu) dos microtúbulos e permite a conversão de Ci na forma de activador transcripcional. Adaptado de (Murone, *et al.*, 1999).

1.3.2 - Sinalização VEGF:

O *factor de crescimento endotelial vascular* (VEGF) foi o primeiro factor de crescimento específico da vasculatura a ser caracterizado e mantém-se ainda hoje como o factor mais crítico em processos vasculares, tanto na formação de vasos imaturos, na vasculogénese, como no brotar de novos vasos em processos angiogénicos embrionários e no adulto (Yancopoulos, *et al.*, 2000).

A família VEGF codifica glicoproteínas homodiméricas (Rossant ; Howard, 2002). São conhecidos quatro genes *Vegf* em ratinho, *Vegf* A, B, C e D, e um factor de crescimento relacionado, *factor de crescimento placentário* (PlGF) (Neufeld, *et al.*, 1999, Rossant ; Howard, 2002). *Vegf-A* é o gene da família mais relevante para o desenvolvimento vascular embrionário. Mutantes de perda de função para este gene morrem entre os 8,5 e os 9,5 dpc (Carmeliet, *et al.*, 1996) e mutantes heterozigóticos para a mutação de perda de função deste gene morrem entre os 11 e os 12 dpc (Carmeliet, *et al.*, 1996, Ferrara, *et al.*, 1996). Tal indica que a regulação da expressão deste gene é crucial para o correcto desenvolvimento vascular embrionário (Rossant ; Howard, 2002).

O gene *Vegf-A* murino é transcrito em pelo menos três ARNm diferentes. Os três transcritos mais comuns são traduzidos em três proteínas (isoformas) com peso molecular diferente, com 120 resíduos de aminoácidos (aa), 164 aa e 188 aa (Ferrara ; Davis-Smyth, 1997, Shima, *et al.*, 1996). VEGF₁₂₀ não consegue ligar-se a heparina na matriz extracelular, sendo um ligando totalmente solúvel; VEGF₁₆₄ consegue ligar-se a heparina, também é secretado mas uma porção fica retida na membrana celular e matriz extracelular; VEGF₁₈₈ tem uma afinidade muito alta para heparina, tem muito baixa solubilidade e fica quase inteiramente retido na matriz extracelular e membrana celular (Ferrara ; Davis-Smyth, 1997).

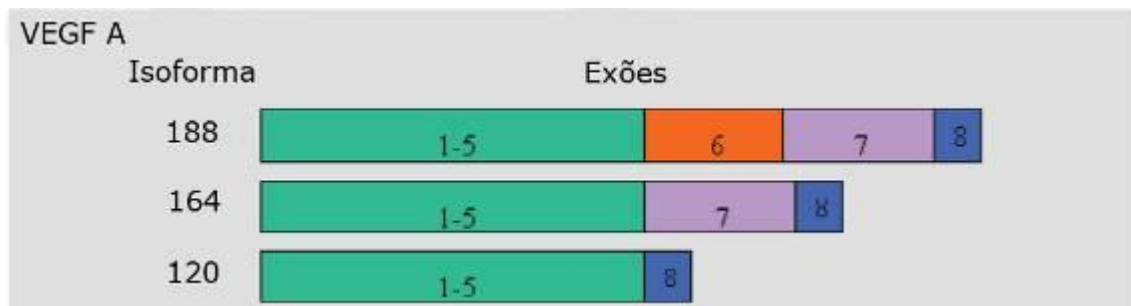


Figura 12 – Isoformas de VEGF-A. Existem várias isoformas de VEGF-A, formadas por *splicing* alternativo. As formas com 120, 164 e 188 aa são as mais comuns. Adaptado de (Byrne, *et al.*, 2005).

A capacidade de VEGF se ligar a heparina está directamente relacionada com a sua capacidade mitogénica. Assim, as variantes mais solúveis têm menos capacidade mitogénica que as menos solúveis, criando um gradiente de actividade deste factor de crescimento (Ferrara ; Davis-Smyth, 1997). O facto da capacidade de ligação a heparina afectar a capacidade de uma molécula migrar através dos tecidos também ajuda a formar este gradiente de actividade de VEGF.

Conhecem-se três receptores transmembranares com domínio de cinase de tirosina para ligandos VEGF, VEGFR-1/Flt1, VEGFR-2/KDR/Flk1 e VEGFR-3/Flt4 (Neufeld, *et al.*, 1999) e dois receptores acessórios, Neuropilina-1 e Neuropilina-2 (Neufeld, *et al.*, 2002). Tal como outros receptores transmembranares com domínio de cinase de tirosina, pensa-se que os VEGFRs dimerizem após contacto com os ligandos VEGF e que ocorra trans-autofosforilação em resíduos de tirosina que se pensa regular a actividade cinásica dos receptores e criarem locais de ancoragem para as moléculas sinalizadoras citoplasmáticas a serem fosforiladas (Veikkola, *et al.*, 2000). A expressão embrionária de *Vegfr-1* e *2* começa aos 7,0 dpc nos angioblastos da região cefálica, estendendo-se depois a todas as células endoteliais diferenciadas (Drake ; Fleming, 2000, Dumont, *et al.*, 1995), enquanto a expressão extra-embrionária inicia-se aos 6,5 dpc em células hemangioblásticas (Drake ; Fleming, 2000) A expressão embrionária de *Flt4* inicia-se aos 7,0 dpc em angioblastos da região cefálica, tornando-se específico do endotélio venoso e mais tarde do endotélio linfático (Kaipainen, *et al.*, 1995).

Os mutantes de perda de função para qualquer um dos *Vegfrs* têm um fenótipo de letalidade embrionária (Veikkola, *et al.*, 2000). Embriões com perda de função para *Vegfr-1* morrem aos 8,5 dpc (Hiratsuka, *et al.*, 1998) com um aumento no número de células endoteliais nas regiões embrionárias e extra-embrionárias e defeitos na organização dessas células em vasos funcionais (Fong, *et al.*, 1995). O aumento no número de células endoteliais é devido a uma alteração no padrão de diferenciação das células mesodérmicas em hemangioblastos (Fong, *et al.*, 1999). Embriões em que se deletou apenas o domínio de cinase de tirosina do receptor formam vasos normais e sobrevivem com defeitos na migração de macrófagos (Hiratsuka, *et al.*, 1998). Este resultado indica que VEGFR-1 parece funcionar como uma armadilha para VEGF-A, regulando a sua disponibilidade para o VEGFR-2 à superfície celular (Hiratsuka, *et al.*, 1998, Hiratsuka, *et al.*, 2005, Veikkola, *et al.*, 2000) e não como um transdutor de sinal VEGF. É conhecido que *Vegfr-1* dá origem a dois ARN mensageiros, um codifica o receptor inteiro e o outro codifica apenas o domínio extracelular, sendo possível que esta forma extracelular solúvel actue também como armadilha para VEGF (Kendall ; Thomas, 1993, Shibuya, *et al.*, 1990).

Embriões com perda de função para *Vegfr-2* morrem aos 8,5 dpc (Shalaby, *et al.*, 1995) com um bloqueio na diferenciação de células endoteliais e hematopoiéticas e sem formação de vasos sanguíneos (Shalaby, *et al.*, 1995). A sinalização por VEGFR-2 não parece ser essencial à formação de hemangioblastos mas sim para a sua migração, dependente de VEGF, para os locais apropriados no embrião e no empenhamento na diferenciação para células endoteliais (Shalaby, *et al.*, 1995, Veikkola, *et al.*, 2000).

Embriões com perda de função em *Vegfr-3* morrem aos 9,5 dpc com um bloqueio na angiogénese e lúmenes colapsados (Dumont, *et al.*, 1998). Este fenótipo sugere que este receptor seja necessário para a maturação dos vasos sanguíneos após a formação do plexo primário (Veikkola, *et al.*, 2000). A expressão de *Vegfr-3* nos vasos linfáticos sugere que este receptor também seja necessário à diferenciação destes vasos mas a letalidade precoce destes embriões mutantes não permite confirmar esta ilação (Veikkola, *et al.*, 2000).

VEGFR-1 liga-se a VEGF-A e B , VEGFR-2 liga-se a VEGF-A, C e D (Gale ; Yancopoulos, 1999), VEGFR-3 liga-se a VEGF-C e D (Achen, *et al.*, 1998, Joukov, *et al.*, 1996). Todos eles são expressos na vasculatura embrionária precoce e *Vegfr-3* passa a específico das células endoteliais venosas e células precursoras dos vasos linfáticos aos 12,5 dpc e (Kaipainen, *et al.*, 1995, Kukk, *et al.*, 1996). *Vegfr-2* também é expresso em alguns neurónios do tubo neural (Meirer, *et al.*, 2001, Ogunshola, *et al.*, 2002) e progenitores de células de músculo (Motoike, *et al.*, 2003) com função ainda desconhecida.

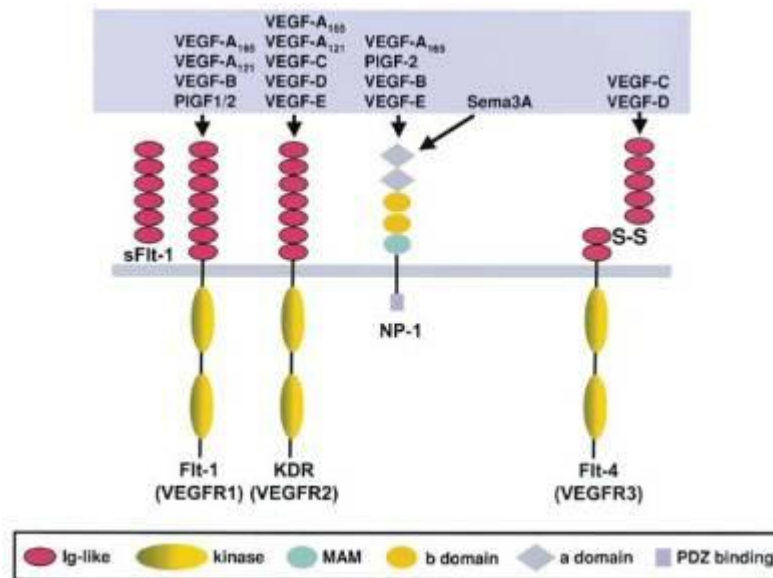


Figura 13 – Esquema representando a família de ligandos e receptores VEGF. Estão representados os vários receptores e quais os respectivos ligandos que se ligam a cada um deles. Adaptado de (Zachary, 2003).

Assim sendo, VEGFR-1 parece actuar como um regulador negativo de sinalização por VEGF-A através de VEGFR-2 (Rossant ; Howard, 2002) e VEGFR-3 parece actuar como uma armadilha para VEGF-C que tem a capacidade de potenciar a sinalização por VEGF-A através de VEGFR-2 (Hamada, *et al.*, 2000). No conjunto revela-se um esboço de uma via regulatória de sinalização por VEGF-A (Rossant ; Howard, 2002), cuja sensibilidade à dose é revelada pela haploinsuficiência letal em mutantes de perda de função deste gene (Carmeliet, *et al.*, 1996, Shalaby, *et al.*, 1995).

A activação de VEGFR-2 em células sem VEGFR-1 induz proliferação celular mas a activação de VEGFR-1 em células sem VEGFR-2 não induz uma resposta mitogénica (Seetharam, *et al.*, 1995, Waltenberger, *et al.*, 1994). Isto indica que as vias de transdução de sinal por estes dois receptores de VEGF-A são algo diferentes, mesmo quando o ligando é o mesmo.

As células endoteliais também expressam outros receptores, específicos para a variante VEGF₁₆₄, Neuropilina-1 e Neuropilina-2, conhecidos receptores transmembranares de mediadores de migração neuronal, semaforinas/colapsinas de classe 3 (Byrne, *et al.*, 2005, Neufeld, *et al.*, 2002). Estes receptores, ao contrário dos VEGFRs, não possuem domínio de cinase de tirosina e por isso não sinalizam por si, tendo que actuar em conjunto com outro receptor para mediar sinalização por VEGF (Byrne, *et al.*, 2005). Neuropilina 1 e 2 conseguem ligar-se a VEGFR-2, potenciando a capacidade de VEGF-A se ligar a VEGFR-2 e também se ligam a VEGFR-1, sendo que neste caso a ligação impede que as neuropilinas se liguem a VEGF-A (Fuh, *et al.*, 2000, Soker, *et al.*, 1996, Soker, *et al.*, 2002, Whitaker, *et al.*, 2001). Aqui, de novo, VEGFR-1 está a actuar como um regulador negativo da disponibilidade de VEGF-A para sinalização por VEGFR-2 (Byrne, *et al.*, 2005). Está descrito que *neuropilina-1* é específico do endotélio arterial e que *Neuropilina-2* é específico do endotélio venoso e linfático (também se consegue ligar a VEGF-C) (Mukouyama, *et al.*, 2002, Yuan, *et al.*, 2002). Como a expressão de *Neuropilina-1* é regulada por VEGF-A é possível que a sua função seja a de criar um sistema de retro-alimentação positiva, aumentando a sensibilidade de células arteriais nascentes a VEGF e estabelecendo-se como o marcador endotelial arterial mais precoce que se conhece (Mukouyama, *et al.*, 2005).

Embriões com perda de função em *Neuropilina-1* morrem aos 12,5 dpc com defeitos na vascularização do tubo neural, defeitos na morfogénese das artérias dos arcos branquiais e dos grandes vasos torácicos e desorganização da vasculatura da membrana vitelina (Kawasaki, *et al.*, 1999, Takashima, *et al.*, 2002).

Embriões com perda de função de *Neuropilina-2* têm defeitos na formação de capilares sanguíneos e linfáticos mas sobrevivem o tempo de gestação (Kawakami, *et al.*, 1996, Yuan, *et al.*, 2002).

Embriões com perda de função de *Neuropilina-1* e *-2* têm defeitos vasculares mais graves que os embriões com perda de função em *Neuropilina-1* e morrem aos 8,5 dpc com um fenótipo muito semelhante ao dos embriões com perda de função de *Vegfr-2* (Takashima, *et al.*, 2002).

A capacidade cinásica de VEGFR-1 é muito reduzida em relação a VEGFR-2, devido à presença de um domínio repressor na região justamembranar (Gille, *et al.*, 2000). O facto de mutantes com expressão de uma variante de *Vegfr-1* com o domínio cinásico inactivado, na ausência de *Vegfr-1*, conseguirem inverter o fenótipo de perda de função (Hiratsuka, *et al.*, 1998) reforça a ideia de que, em termos de angiogénese embrionária, a sua função como cinase de tirosinas é dispensável. Conhecem-se várias proteínas que são fosforiladas por VEGFR-1 mas os seus efeitos não estão bem caracterizados ou são conflituosos (Cebe-Suarez, *et al.*, 2006). A função de VEGFR-1 está mais bem caracterizada na migração e diferenciação de monócitos, no recrutamento de progenitores endoteliais da medula óssea, na migração e invasão de células de carcinoma, na produção de factores de crescimento por células endoteliais do fígado e na adesão de células *natural killer* a células endoteliais (Cebe-Suarez, *et al.*, 2006).

O VEGF induz a síntese de ADN e proliferação celular através de VEGFR-2 fazendo recurso de duas vias de sinalização, a via das proteínas cinásicas activadas por mitogénicos (MAPK) e a via de Ras/Raf/MEK/ERK (Byrne, *et al.*, 2005). A via de Ras/Raf/MEK/ERK pode ser activada por fosforilação de Grb-2 por VEGFR-2, que vai activar Sos e este activa Ras. A via também pode funcionar num modo independente de Ras em que VEGFR-2 fosforila PLC γ -1, o que promove a hidrólise de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) para dar origem a 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e DAG tem a capacidade de activar PKC resultando na activação de Raf independente de Ras (Cebe-Suarez, *et al.*, 2006).

A activação de VEGFR-2 também regula a organização de citoesqueleto e migração celular. VEGFR-2 activado fosforila FAK (cinase de adesões focais), que regula a montagem e desmontagem de adesões focais e organização de actina, que interagindo com paxilina e outras proteínas associadas a actina, como talina ou vinculina, é recrutado para as adesões focais (Abedi ; Zachary, 1997, Kanno, *et al.*, 2000). A fosforilação de p38 por VEGFR-2 induz a reorganização de actina filamentosa e migração celular (Rousseau, *et al.*, 2000b, Rousseau, *et al.*, 1997). A actividade de p38 é regulada por Src e RAFTK/Pyk2 (McMullen, *et al.*, 2004) e a via de transdução de sinal a jusante acaba por conduzir à libertação de HSP27

fosforilado da extremidade tapada dos filamentos de actina, promovendo a reorganização de actina e formação de fibras de *stress* e *lamelipodia*, que promovem a migração celular (Rousseau, *et al.*, 2000a). VEGFR-2 também regula a actividade das pequenas GTPases Rho e Rac, que modulam a dinâmica de actina e contração celular na migração de células endoteliais (Zeng, *et al.*, 2002).

VEGFR-2 activo fosforila PI 3-cinase que regula a produção de fosfatidilinositol(3,4,5)trifosfato (PIP₃) que é necessário para a activação da proteína cinase Akt (Brazil ; Hemmings, 2001). A activação de Akt é responsável pelo bloqueio de vias de apoptose, VEGF promove assim a sobrevivência celular do endotélio (Cebe-Suarez, *et al.*, 2006). Esta via de sinalização de sobrevivência por Akt depende da integridade das junções aderentes, que contêm um complexo transiente composto por VEGFR-2, PI 3-cinase, VE-caderina e β -catenina (Carmeliet, *et al.*, 1999, Spagnuolo, *et al.*, 2004). VEGF também regula a sobrevivência celular por induzir a expressão de proteínas anti-apoptóticas, tais como os inibidores de caspases Bcl-2 e A1 (Gerber, *et al.*, 1998) e proteínas da família IAP (inibidores de apoptose) (Tran, *et al.*, 1999).

VEGF também regula a fosforilação de proteínas cinásicas da família Src, tais como c-Src e c-Yes (Eliceiri, *et al.*, 1999). Estas cinases regulam a permeabilidade vascular, sendo que quando fosforiladas promovem a formação de organelos vesiculo-vacuolares (Dvorak ; Feng, 2001) e fenestras (Esser, *et al.*, 1998, Roberts ; Palade, 1995, Roberts ; Palade, 1997). Estes organelos são responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular, pois estas regiões especializadas da membrana celular são altamente permeáveis a macromoléculas (Cebe-Suarez, *et al.*, 2006). PI 3-cinase e p38 regulam a expressão de PLVAP (*proteína associada a vesículas do plasmalemma*), um componente das fenestras endoteliais (Strickland, *et al.*, 2005). Em vasos maduros VEGF também regula a permeabilidade vascular por inibir a formação de junções entre células endoteliais. Em resposta a VEGF, VE-caderina, β -catenina, ocludina, zonula ocluden 1 e conexina43 são fosforilados, sendo estas moléculas componentes dos três tipos de junções celulares, junções apertadas, junções aderentes e junções de hiato (Cebe-Suarez, *et al.*, 2006).

VEGFR-2 interactua com várias integrinas, receptores transmembranares que servem de ponto de ligação à matriz extracelular (Hynes ; Zhao, 2000), que assim ajustam o resultado da activação do receptor por VEGF às necessidades da matriz extracelular e das células envolventes (Cebe-Suarez, *et al.*, 2006). É possível que as integrinas funcionem para prevenir a estimulação aberrante dos receptores em células endoteliais quiescentes em situações não patológicas ou para facilitar a angiogénese em situações patológicas (Carmeliet, 2002, Cebe-Suarez, *et al.*, 2006).

VEGFR-2 associa-se a VE-caderina, uma interação regulada por β -catenina, nas junções aderentes. Em situações de alta densidade celular/vascular, a fosfatase CD148 associa-se a VE-caderina e atenua a capacidade cinásica de VEGFR-2, atenuando a sinalização por PI 3-cinase, cinases MAP e PLC γ -1 (Cebe-Suarez, *et al.*, 2006, Grazia Lampugnani, *et al.*, 2003). Em condições de baixa densidade celular, como na ponta de vasos em desenvolvimento, VEGFR-2 associa-se com a integrina $\alpha_v\beta_3$ e o resultado do sinal gerado por VEGF é dirigido no sentido do aumento da proliferação e migração celular (Carmeliet, 2002). Em certa medida, a homeostasia de um vaso é determinada por junções célula-célula, que têm uma função muito importante na formação de um complexo mecanossensório que regula a resposta das células endoteliais ao *stress* causado pelo fluxo sanguíneo (Cebe-Suarez, *et al.*, 2006).

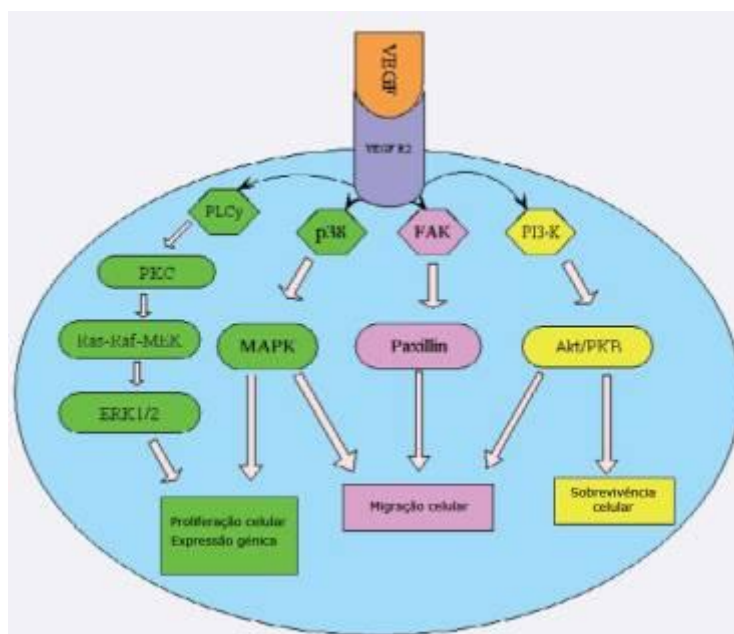


Figura 14 - Esquema simplificado da via de transdução de sinal a jusante de VEGFR-2. VEGF regula proliferação celular, expressão gênica, migração celular e sobrevivência celular. Adaptado de (Byrne, *et al.*, 2005).

VEGFR-3 promove a migração celular e sobrevivência em células endoteliais linfáticas ao induzir a activação de proteínas cinase MAP, numa via dependente de PKC e numa via dependente de Wortmannin, PI 3-cinase e Akt (Cebe-Suarez, *et al.*, 2006, Makinen, *et al.*, 2001, Wang, *et al.*, 2004).

1.3.3 - Sinalização por Angiopoietinas

Existem quatro genes que codificam angiopoietinas, *Ang1-4* (Ward ; Dumont, 2002). As angiopoietinas são glicoproteínas solúveis, que funcionam na forma de dímeros ou agregações de ordem superior (Procopio, *et al.*, 1999). As Angiopoietinas ligam-se ao receptor transmembranar com domínio de cinase de tirosina Tie2/Tek, que pertence à família Tie, da qual se conhece outro membro, Tie1 (Jones, *et al.*, 2001). Até há pouco tempo não se conheciam ligandos para Tie1 (Gale ; Yancopoulos, 1999), no entanto recentemente demonstrou-se que Ang1 e 4 conseguem ligar-se a Tie1 e activá-lo (Saharinen, *et al.*, 2005). Foi demonstrado também que Tie1 pode formar heterodímeros com Tie2 (Saharinen, *et al.*, 2005) e que este processo é regulado por VEGF (Tsiamis, *et al.*, 2002).

A sinalização por Ang1 induz migração, formação de tubos, formação de novas ramificações e inibe a apoptose (Eklund ; Olsen, 2006). A maioria destes efeitos é mediada por PI 3-cinase e pela via das cinases MAP (Eklund ; Olsen, 2006). Ang2 parece actuar como um antagonista para Ang1, interferindo com o seu efeito estabilizador e por sua vez deixando esses vasos mais sensíveis aos sinais de outros factores, tais como VEGF (Eklund ; Olsen, 2006). Ang3 e 4 parecem ter o mesmo relacionamento que, respectivamente Ang2 e 1, mas têm um nível de expressão mais baixo e ainda se sabe pouco sobre a sua função e regulação (Eklund ; Olsen, 2006).

Estudos de competição entre ligandos e receptor indicaram que Ang1 e 4 têm a capacidade de estimular a autofosforilação de Tie2 e iniciar a transdução de sinal a jusante, enquanto Ang2 e 3 têm uma actividade muito mais fraca como activadores de Tie2, sendo essencialmente antagonistas da via (Rossant ; Howard, 2002).

Ambos estes receptores são expressos especificamente em células endoteliais, desde a fase embrionária até à fase adulta (Dumont, *et al.*, 1995, Korhonen, *et al.*, 1995). No embrião a expressão destes receptores inicia-se a 7,5 dpc para *tie2* e a 8,0 dpc para *Tie1*, sendo que a expressão de ambos só se torna generalizada no endotélio a partir de 8,5 dpc (Dumont, *et al.*, 1995).

A perda de função de *Tie1* produz um fenótipo letal embrionário, com morte entre os 13,5 dpc e os momentos pós-parto. Este fenótipo é caracterizado por um aumento na densidade vascular, levando a hemorragias e edema (Patan, 1998, Puri, *et al.*, 1995).

A perda de função de *Tie2* produz um fenótipo letal embrionário, com morte entre os 9,5 e os 12,5 dpc. Este fenótipo é caracterizado por uma diminuição de brotagem vascular e ramificação vascular, redução da sobrevivência endotelial, defeitos no recrutamento de

células peri-endoteliais e defeitos no desenvolvimento do coração (Dumont, *et al.*, 1994, Patan, 1998).

A perda de função em *Ang1* produz um fenótipo letal embrionário, com morte aos 12,5 dpc. Este fenótipo é caracterizado por diminuição de brotação vascular e ramificação vascular, defeitos no desenvolvimento do endocárdio, defeitos na trabeculação do miocárdio e defeitos no recrutamento de células peri-endoteliais (Suri, *et al.*, 1996).

A perda de função de *Ang2* não produz um fenótipo embrionário letal, os ratinhos nascem vivos mas desenvolvem uma acumulação de fluido ascítico nos pulmões e abdômen, indicando a presença de um problema na drenagem do sistema linfático. Este fenótipo raramente permite que um ratinho *Ang2*^{-/-} atinja a idade adulta (Ward ; Dumont, 2002).

1.3.4 - Sinalização por TGF- β

A superfamília TGF- β (*factor de crescimento transformante -beta*) é composta por um grupo de factores de crescimento que incluem factores de crescimento transformantes, activinas e proteínas morfogenéticas de osso (BMPs) (Rossant ; Howard, 2002). O ligando TGF- β é uma citoquina multifuncional que está envolvida na regulação de proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência em muitos tipos celulares (Lebrin, *et al.*, 2005). Conhecem-se três isoformas do ligando TGF- β (TGF- β 1, 2 e 3), dos quais TGF- β 1 tem uma função essencial para o desenvolvimento vascular embrionário (Pepper, 1997).

Conhecem-se três classes de receptores de ligandos TGF- β , os de tipo I (ALK-1 e 5), os de tipo II (T β RII) e os de tipo III (endoglina e betaglicano) (Lebrin, *et al.*, 2005).

TGF- β tem maior afinidade para os receptores de tipo II. Ao ligar-se aos receptores de tipo II promove a formação de um complexo heteromérico de dois receptores de tipo II e dois receptores de tipo I, que quando formado leva a que os receptores de tipo II transfosforilem os receptores de tipo I (Wrana, *et al.*, 1994), conduzindo à fosforilação de proteínas SMAD, que vão funcionar como factores de transcrição (Wieser, *et al.*, 1995). Os receptores de tipo III têm uma função moduladora da sinalização por TGF- β . Betaglicano funciona como um potenciador de resposta por TGF- β 2, que tem baixa afinidade para receptores de tipo II (Sankar, *et al.*, 1995).

Endoglina estimula a sinalização por TGF- β /ALK-1 e inibe a sinalização por TGF- β /ALK-5 (Lebrin, *et al.*, 2004). Estudos recentes indicaram que a sinalização por ALK-1 e ALK-5 tem resultados contraditórios, enquanto a sinalização por ALK-1 induz um aumento

na proliferação e migração de células endoteliais, a sinalização por ALK-5 conduz a uma inibição da proliferação e migração de células endoteliais (Goumans, *et al.*, 2002). Estes efeitos contraditórios reflectem uma diferença a nível de via de transdução de sinal, enquanto TGF- β /ALK-1 fosforilam Smad-1 e -5 (Oh, *et al.*, 2000), TGF- β /ALK-5 fosforilam Smad-2 e -3 (Labbe, *et al.*, 1998). Esta diferença de sinalização propõe uma função importante para a via TGF- β , a de regular o momento em que um sistema vascular pára de crescer e ramificar (fase de activação) e começa a estabilizar, secretar proteínas da matriz extracelular e a recrutar células peri-endoteliais, a fase de resolução, através do recurso a um receptor ou outro (Rossant ; Howard, 2002).

A análise de mutantes de perda de função para genes da via TGF- β confirmou uma clara importância para o desenvolvimento vascular. A perda de função de *Tgf- β 1* resultou em letalidade embrionária de metade dos embriões homocigóticos para a mutação de perda de função aos 10,5 dpc, com defeitos na diferenciação de células endoteliais e hematopoiéticas na membrana vitelina, resultando em defeitos vasculares vitelinos sem defeitos vasculares óbvios na vasculatura do embrião próprio (Dickson, *et al.*, 1995).

A perda de função de *T β RII* resulta numa fenocópia da perda de função em TGF- β 1 (Oshima, *et al.*, 1996).

A perda de função de *Alk-5* resulta num fenótipo idêntico ao de *tgf- β 1* e *T β RII* mas neste caso detectaram-se defeitos na vasculatura do embrião próprio, que apresenta vasos dilatados, defeitos no recrutamento de células peri-endoteliais, defeitos na produção de fibronectina, defeitos na migração de células endoteliais e pericárdio distendido (Larsson, *et al.*, 2001).

A perda de função de *Alk-1* resulta em defeitos na remodelação da vasculatura da membrana vitelina, dilatação dos vasos e formação de fusões entre as aortas dorsais e veias cardinais anteriores, defeitos no recrutamento de células peri-endoteliais (Urness, *et al.*, 2000) e perda de expressão de *Ephrin-B2*, um marcador de endotélio arterial (Sorensen, *et al.*, 2003).

A perda de função de *Endoglin* resulta num fenótipo semelhante ao da perda de função em *alk-1*, mas em que não se observa dilatação dos vasos sanguíneos e em que não ocorre alteração na expressão de *Ephrin-B2* (Li, *et al.*, 1999, Sorensen, *et al.*, 2003).

A perda de função de *Betaglicano* também resulta num fenótipo letal embrionário no fim da gestação com defeitos na proliferação de células do miocárdio e aumento na apoptose de células hepáticas (Stenvers, *et al.*, 2003).

1.3.5 - Sinalização por Ephrins

Os receptores Eph constituem uma grande família de receptores com domínio de cinase de tirosina cujos ligandos transmembranares pertencem à família Ephrin (Flanagan ; Vanderhaeghen, 1998). Os receptores e ligandos desta família são normalmente expressos reciprocamente em regiões de fronteira de tecidos e participam em sinalização bidirecional (Gale, *et al.*, 1996, Henkemeyer, *et al.*, 1996, Holland, *et al.*, 1996). As Ephrins constituem uma grande família que se subdivide em tipo A e B baseado na sua forma de ligar à membrana. As Ephrins A ligam-se à membrana através de uma âncora GPI e as Ephrins B têm um domínio transmembranar (Davis, *et al.*, 1994). Os receptores Eph também se subdividem em dois tipos, A ou B, conforme se liguem preferencialmente a Ephrins de tipo A ou B (Gale, *et al.*, 1996).

O sistema Eph/Ephrin está envolvido na regulação de segmentação, migração celular, direccionamento de axónios, plasticidade sináptica e diferenciação entre endotélio arterial e venoso (Hirashima ; Suda, 2006).

A implicação do sistema Eph/Ephrin no desenvolvimento vascular surgiu quando se identificou o padrão de expressão de *Ephrin-b2* e *Eph-b4* como sendo especificamente e respectivamente, endotelial arterial e endotelial venoso (Wang, *et al.*, 1998a). A perda de função em *Eph-b4* e em *Ephrin-b2* produziu um fenótipo muito semelhante, com defeitos na remodelação angiogénica do embrião e da membrana vitelina, conduzindo a letalidade aos 10,5 dpc (Gerety, *et al.*, 1999). *Eph-b2* e *Eph-b3* são expressos no mesênquima e em células endoteliais venosas, respectivamente, e mutantes com perda de função em ambos estes genes têm um fenótipo semelhante ao obtido com a perda de função em *Ephrin-b2* ou *Eph-b4*, embora com baixa penetrância (Adams, *et al.*, 1999), sugerindo que devem existir múltiplos membros do sistema Eph/Ephrin a mediar interações durante o desenvolvimento vascular embrionário (Hirashima ; Suda, 2006). Mais especificamente, a perda de função em *ephrin-b2* específica no endotélio produziu o mesmo fenótipo que a perda de função convencional (Gerety ; Anderson, 2002), indicando que a presença diferencial de *Ephrin-b2* e *Eph-b4*, nas artérias e veias respectivamente, é essencial ao correcto remodelamento do sistema vascular embrionário. Ratinhos em que se removeu o domínio citoplasmático de Ephrin-B2 reproduzem o fenótipo de perda de função convencional em *Ephrin-b2* em relação aos defeitos vasculares embora não em relação aos defeitos na migração de células da crista neural (Adams, *et al.*, 2001), indicando que a sinalização bidireccional entre Ephrin-b2 e Eph-b4 é essencial para separar o sistema vascular arterial do venoso de modo a balancear eventos

de repulsão e adesão, essenciais para a correcta complexificação do sistema vascular, sem comprometer a separação de sangue arterial e venoso (Halloran ; Wolman, 2006).

Este sistema de repulsão é mediado por eventos de transendocitose dos complexos ligando-receptor, sendo estes eventos suficientes para levar à repulsão das células que expressem reciprocamente ligandos e receptores compatíveis (Zimmer, *et al.*, 2003). No entanto, o sistema Ephrin-Eph não parece ser responsável pelo estabelecimento da identidade arterial ou venosa, parecendo sim actuar a jusante de outras vias, como a via Notch e VEGF (Lawson, *et al.*, 2002), para manter a separação de identidades (Hirashima ; Suda, 2006).

Outro factor que consegue regular a identidade de um vaso é o fluxo sanguíneo. Estudos em embriões de galinha demonstraram que cortando o fluxo sanguíneo de uma artéria se reduz a expressão dos marcadores arteriais e se induz a expressão de marcadores venosos, algo que se volta a inverter se o mesmo vaso voltar a ter a sua circulação regular (le Noble, *et al.*, 2004). Estes estudos indicam que a identidade vascular pode ser determinada por factores genéticos mas que mais tarde pode ser modulada por factores físicos como o fluxo sanguíneo.

Existem membros do sistema Ephrin/Eph que são expressos reciprocamente entre os vasos sanguíneos e tecidos circundantes (Adams, *et al.*, 1999), indicando que para além de mediar a separação dos sistemas arteriais e venosos, este sistema também parece criar barreiras espaciais que servem para direccionar a migração de células endoteliais, através dos tecidos circundantes, de maneira padronizada (Suchting, *et al.*, 2006).

1.3.6 - Sinalização Wnt

O gene *Wnt* codifica uma glicoproteína secretada, altamente conservada em metazoários, que se liga aos receptores transmembranares da família Frizzled (Miller, 2002). Em mamíferos conhecem-se pelo menos 19 homólogos *Wnt* e 10 homólogos *Frizzled* (Miller, 2002).

Quando *Wnt* se liga a um receptor Frizzled associado aos co-receptores LRP5 e 6 induz a fosforilação de Dishevelled. Dishevelled fosforilado deslocaliza o complexo de fosforilação GSK3 β /CK1 γ de um complexo composto por Axina e APC, conduzindo-o à membrana, onde vai fosforilar os co-receptores LRP5 e 6, que passam a ligar-se a Axina (Clevers, 2006). A desmontagem do complexo composto por Axina/APC/GSK3 β /CK1 γ leva a que o seu alvo, β -catenina, não seja fosforilado e assim conduzido à sua ubiquitinação e consequente degradação (Clevers, 2006).

A estabilização de β -catenina permite que esta seja deslocada para o núcleo, onde deslocaliza o repressor transcricional Groucho do complexo transcricional Tcf/Lef, promovendo a expressão dos genes regulados por Tcf/Lef (Clevers, 2006). Entre estes, encontram-se genes que codificam reguladores de ciclo celular, diferenciação, entre outras funções, incluindo os genes da própria via (Clevers, 2006, Goodwin ; D'Amore, 2002). De entre os genes regulados por Tcf-Lef, que são importantes para o desenvolvimento vascular, encontram-se *Vegf*, *Mmp7*, *Cx43* e *Fibronectina*, entre outros (Goodwin ; D'Amore, 2002).

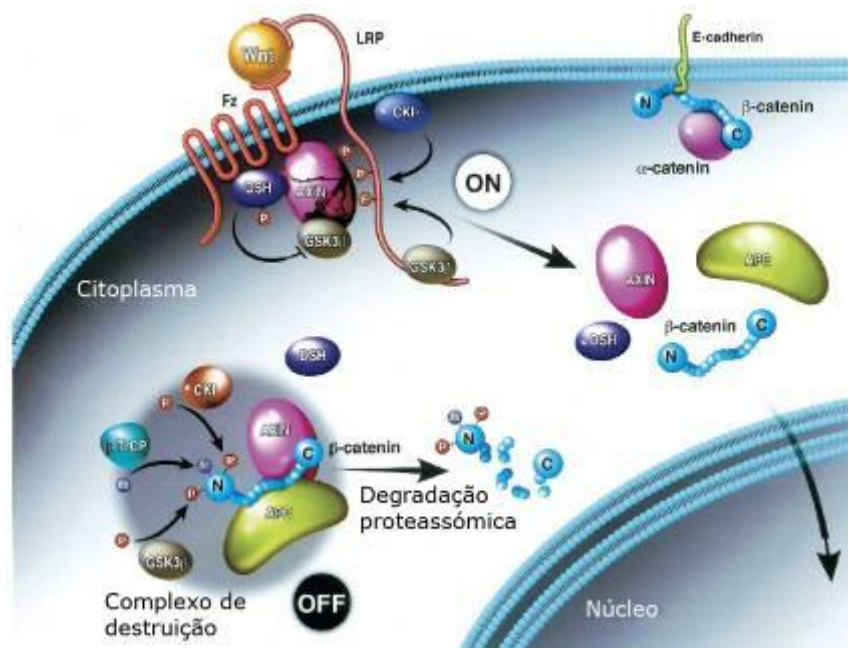


Figura 15 – Esquema simplificado da sinalização Wnt. Na ausência de ligandos Wnt, beta-catenina liga-se ao complexo de destruição e é marcada para destruição proteolítica. Na presença de ligandos Wnt o complexo de destruição é desmontado e beta-catenina desfosforilada não é degradada e dirige-se para o núcleo. Adaptado de (Willert ; Jones, 2006).

Conhecem-se muitos genes da via Wnt que são expressos no sistema vascular. Por exemplo *Wnt-5a*, *Wnt-7a* e *Wnt-10b* são expressos nas células endoteliais e *Wnt-5a* nas células de músculo liso (Goodwin ; D'Amore, 2002). Apesar de nem todos os genes *wnt* terem mutantes de perda de função analisados, a perda de função em *Wnt-2* é até ao momento a única a produzir um fenótipo no sistema vascular, dando origem a uma redução na formação de capilares placentários derivados do embrião (Monkley, *et al.*, 1996). É possível, no entanto, que mutantes de perda de função em outros genes *wnt*, quer simples como compostos, possam também ter defeitos vasculares, no entanto muitos destes mutantes morrem antes de chegarem a desenvolver um sistema vascular, levando a que tal estudo só seja possível com mutantes de perda de função condicionais (Goodwin ; D'Amore, 2002).

De entre os receptores, *Frizzled-1* é expresso na aorta de ratinhos adultos (Mao, *et al.*, 2000) e *Frizzled-2* é expresso na aorta e no tronco pulmonar a partir dos 12 dpc (van Gijn, *et al.*, 2001). *Frizzled-5* é expresso nos vasos sanguíneos da membrana vitelina e da camada

labirintínica da placenta e mutantes de perda de função para este gene têm defeitos no desenvolvimento dos grandes vasos vitelínicos e na formação da rede capilar, incluindo uma falha na ligação da vasculatura vitelina à vasculatura do embrião próprio, sendo letal aos 11,5 dpc (Ishikawa, *et al.*, 2001). Apesar de os mutantes de perda de função de *Frizzled-4* não aparentarem ter defeitos no sistema vascular, mutações neste gene foram associadas, em humano, a retinopatia exsudativa familiar, uma doença caracterizada por defeitos na vascularização da retina (Robitaille, *et al.*, 2002).

A β -catenina pode ser detectada no núcleo das células endoteliais arteriais e venosas de vasos em proliferação (Eberhart ; Argani, 2001). Em situações patológicas, como enfarte do miocárdio e desenvolvimento tumoral, a β -catenina acumula-se no núcleo e citoplasma de células endoteliais (Goodwin ; D'Amore, 2002).

1.3.7 - Sinalização Notch

Existem cada vez mais evidências para a importância da via Notch em várias vertentes do desenvolvimento vascular embrionário e em processos neo-angiogénicos patológicos (Rossant ; Hirashima, 2003). Conhecem-se vários genes da via Notch que são expressos no endotélio arterial, *notch1*, *notch3*, *notch4*, *dll4*, *jagged1* e *jagged2* (Villa, *et al.*, 2001).

Estudos em peixe-zebra concluíram que Notch é essencial para a determinação da identidade endotelial arterial, a jusante de VEGF (Lawson, *et al.*, 2001, Lawson, *et al.*, 2002). Neste sistema a perda de actividade de Notch leva a uma redução de expressão de marcadores arteriais e expressão ectópica de marcadores venosos na aorta dorsal (Lawson, *et al.*, 2001, Zhong, *et al.*, 2001). Por outro lado, um aumento na activação da via Notch leva à expressão de marcadores arteriais na veia cardinal posterior (Lawson, *et al.*, 2001). Em ambos os casos surgem malformações arterio-venosas e defeitos no desenvolvimento de artérias ou veias.

Ratinhos mutantes de perda de função de *Notch1* morrem aos 11 dpc com graves defeitos neurais e na formação dos sómitos, na remodelação angiogénica da vasculatura da membrana vitelina, embrião próprio e placenta (Conlon, *et al.*, 1995, Krebs, *et al.*, 2000).

A perda de função de *Notch4* não produz um fenótipo detectável, mas embriões com perda de função de *Notch1* e *4* têm um fenótipo vascular mais severo que os de perda de função só de *Notch1* (Krebs, *et al.*, 2000). Estes embriões têm defeitos na remodelação do plexo vascular primário da membrana vitelina, artérias dorsais colapsadas e veias cardinais ausentes nos embriões com mais defeitos (Krebs, *et al.*, 2000). A perda de função de *Notch1*

restrita ao endotélio produz um fenótipo que recapitula o fenótipo da perda de função constitutiva, indicando que a função de Notch1 no endotélio é autónoma (Limbourg, *et al.*, 2005).

A expressão de uma forma activada de Notch4, chamada *int-3* (Shirayoshi, *et al.*, 1997, Uyttendaele, *et al.*, 1996), especificamente em células endoteliais de embriões de ratinho produz um fenótipo letal embrionário aos 10,5 dpc (Uyttendaele, *et al.*, 2001). Este fenótipo é caracterizado por um bloqueio na remodelação do plexo vascular primário da membrana vitelina, aumento do calibre das aortas dorsais e formação de redes capilares menos complexas (Uyttendaele, *et al.*, 2001). A expressão condicional indutível de *int-3* especificamente no endotélio de ratinhos adultos leva à formação de artérias e veias hipertrofiadas na pele, útero e fígado, malformações arterio-venosas, redução no nível de ramificação das árvores vasculares dos órgãos afectados e hipertrofia do coração, sendo letal poucas semanas após o início da sobre-expressão (Carlson, *et al.*, 2005). Descobriu-se também que nestes ratinhos ocorre expressão do marcador endotelial arterial *Ephrin-b2* em veias e que as veias destes ratinhos passam a ter uma camada de músculo liso mais semelhante à camada existente em artérias (Carlson, *et al.*, 2005). Notavelmente, parando a expressão de *int-3* em ratinhos muito afectados estes recuperam e regridem a maior parte dos defeitos produzidos (Carlson, *et al.*, 2005). A expressão condicional indutível de uma forma activada de Notch1 especificamente no endotélio de ratinhos adultos também leva à formação de hipertrofia dos vasos sanguíneos hepáticos e um aumento na espessura da camada de músculo liso, embora mais tardiamente e menos severamente que no caso de *int-3* (Carlson, *et al.*, 2005).

A perda de função parcial em *Notch2* não produz um fenótipo letal embrionário, no entanto estes morrem a seguir ao nascimento com defeitos nos capilares dos glomérulos, defeitos na vasculatura hialóide do olho, hemorragias, edema e hipoplasia do miocárdio (McCright, *et al.*, 2001).

A perda de função em *Notch3* não é letal no desenvolvimento embrionário e não afecta a viabilidade nem a fertilidade dos adultos (Krebs, *et al.*, 2003), no entanto estes ratinhos adultos têm hipertrofia das artérias e têm uma camada de músculo liso mais fina (Domenga, *et al.*, 2004). Este defeito parece ser específico das células de músculo liso, que têm alterações na sua forma e tamanho, e não das células endoteliais, que parecem normais, sendo mais parecidas com células de músculo liso de veias (Domenga, *et al.*, 2004). Em humanos, mutações em *Notch3* estão associadas à síndrome Arteriopatia autossómica dominante com enfartes subcorticais e leucoencefalopatia (CADASIL) (Joutel, *et al.*, 1996). Doentes com esta arteriopatia apresentam engrossamento da parede das artérias cerebrais,

devido a uma degeneração das células de músculo liso seguido da ocorrência de fibrose, e redução do lúmen das artérias de menor calibre (Iso, *et al.*, 2003a). Nestes doentes, caracterizados por terem mutações pontuais nas repetições EGF de Notch3, o receptor está presente na membrana e continua a conseguir interagir com os ligandos. Pensa-se que o defeito resulte de problemas num dos eventos proteolíticos que se seguem à interacção com o ligando (Iso, *et al.*, 2003a).

A perda de função de *Dll1* produz um fenótipo letal aos 12 dpc, com defeitos neurais e na formação dos sómitos e hemorragias extensas, que começam por volta dos 10 dpc (Hrabe de Angelis, *et al.*, 1997). Até ao momento ainda não foram investigadas as anomalias vasculares por detrás do fenótipo hemorrágico.

A perda de função de *Dll4* produz um fenótipo letal aos 10 dpc com redução no calibre das aortas dorsais, com colapso das aortas, defeitos na remodelação das veias cardinais anteriores, aumento na migração de células endoteliais das aortas dorsais para regiões mais dorsais, aumento da proliferação de células endoteliais arteriais e defeitos na remodelação do plexo vascular primário da membrana vitelina (Duarte, *et al.*, 2004). O ponto mais interessante deste estudo foi a revelação que a manutenção de uma dose estável de *Dll4* é essencial ao correcto remodelamento da vasculatura embrionária pois os embriões heterozigóticos para a perda de função de *Dll4* têm um fenótipo letal embrionário com penetrância incompleta (Duarte, *et al.*, 2004, Gale, *et al.*, 2004, Krebs, *et al.*, 2004). Nos embriões heterozigóticos o fenótipo é semelhante aos embriões com perda de função total em *Dll4* mas menos severo, todos os embriões heterozigóticos têm defeitos na remodelação da vasculatura da membrana vitelina. Aos 9,5 dpc cerca de 90% dos embriões heterozigóticos têm constrição das aortas dorsais, com maior ou menor grau de gravidade, conduzindo uma proporção destes embriões, os que têm defeitos mais graves, a morrer aos 10,5 dpc (Duarte, *et al.*, 2004, Gale, *et al.*, 2004, Krebs, *et al.*, 2004). A razão desta heterogeneidade encontra-se no facto de a penetrância incompleta do efeito da heterozigotia da mutação em *Dll4* ser observada em linhas de ratinhos com cruzamento aleatório, de genoma não fixo, pois o efeito da heterozigotia da mutação em *Dll4* passa a ter penetrância quase completa ou mesmo completa em fundos genéticos fixos, respectivamente C57/BL6 e 129/Sv-CP (Duarte, *et al.*, 2004, Gale, *et al.*, 2004).

A sobre-expressão de *Dll4* em culturas primárias de células endoteliais de veia umbilical humana leva a uma redução na taxa de proliferação com diminuição da resposta migratória em função de VEGF, provavelmente devido à diminuição no nível de expressão de VEGFR-2 nestas células (Williams, *et al.*, 2006).

A perda de função de *Jagged1* produz um fenótipo letal embrionário aos 10 dpc com defeitos na remodelação do plexo vascular primário da membrana vitelina, redução na formação de novos brotos vasculares na região cefálica e hemorragias (Xue, *et al.*, 1999). No homem, mutações em *Jagged1* estão associadas ao Síndrome de Alagille, que inclui defeitos no sistema cardiovascular caracterizados por Tetralogia de *Fallot*, defeitos septais ventriculares e auriculares, estenose da válvula pulmonar e coartação da aorta (Jones, *et al.*, 2000).

Mutantes de perda de função de *Hey1*, membro da família *hairy and enhancer of split* expresso no endotélio arterial, são viáveis e férteis, não tendo nenhum defeito descrito (Fischer, *et al.*, 2004, Kokubo, *et al.*, 2005).

Mutantes de perda de função de *Hey2*, também expresso no endotélio arterial, morrem no período pós-nascimento com defeitos graves no coração, caracterizados pela existência de defeitos na septação do ventrículo, forâmen oval persistente, estenose da válvula tricúspide e cardiomiopatia (Donovan, *et al.*, 2002, Gessler, *et al.*, 2002).

Mutantes com perda de função dupla de *Hey1* e *Hey2* têm um fenótipo letal embrionário aos 10,5 dpc com defeitos na remodelação da vasculatura da membrana vitelina, aortas dorsais reduzidas e colapsadas, defeitos na formação das veias cardinais anteriores, perda de expressão de marcadores endoteliais arteriais, defeitos na remodelação dos vasos cranianos e defeitos na formação do coração (Fischer, *et al.*, 2004, Kokubo, *et al.*, 2005). Estes defeitos relembram os defeitos observados nos mutantes de perda de função de *Notch1* e *Notch4*, de *Dll4* e de *Jagged1*, indicando que provavelmente são os principais efectores da via Notch no sistema vascular.

A perda de função de *Rbp-j* específica ao endotélio também produz um fenótipo muito semelhante ao obtido nos mutantes de perda de função em *Notch1* e *Notch4*, *Dll4* e *Jagged1* (Krebs, *et al.*, 2004).

Apesar de ser evidente que a sinalização Notch é muito importante para o correcto desenvolvimento vascular, a sua função precisa continua a não estar descrita. Sabe-se que não é essencial para a diferenciação de angioblastos, início da hematopoiese ou formação do plexo vascular primário (vasculogénese) (Rossant ; Howard, 2002). Os resultados obtidos até ao momento apontam para um possível papel na indução ou regulação da formação de novas ramificações na vasculatura, na manutenção vascular (recrutamento e/ou diferenciação de perícitos e proliferação) e na determinação da identidade endotelial arterial, por oposição à identidade venosa, a montante da via Ephrin e a jusante de VEGF e Sonic hedgehog (Rossant ; Howard, 2002).

1.3.8 - Função das células peri-endoteliais e da matriz extracelular

Apesar de o endotélio receber a maior parte da atenção na investigação da angiogénese, as células peri-endoteliais envolventes e a matriz extracelular têm um papel crítico no suporte funcional e estrutural da rede vascular. As células de músculo liso vasculares estabilizam os vasos nascentes ao inibirem a migração e proliferação endotelial (Conway, *et al.*, 2001, von Tell, *et al.*, 2006). Sabe-se que os vasos regridem mais facilmente quando não são cobertos por células de músculo liso, no caso dos estímulos angiogénicos se terem tornado limitantes (Benjamin, *et al.*, 1998, Lindahl, *et al.*, 1999). Ainda mais, as células peri-endoteliais são metabolicamente activas e expressam uma variedade de péptidos vasoactivos, factores de crescimento e citoquinas, que vão ter impacto na função geral da vasculatura.

A origem das células de músculo liso é alvo de intensa investigação, embora seja ainda uma área com muitas perguntas por responder. As células de músculo liso podem diferenciar-se a partir de células endoteliais, células mesênquimais, de precursores da medula óssea ou de macrófagos (Carmeliet ; Jain, 2000). As células de músculo liso das veias coronárias são derivadas do miocárdio atrial, enquanto aqueles das artérias coronárias derivam da camada epicardial (Dettman, *et al.*, 1998). As células da crista neural cardíaca são a fonte das células de músculo liso dos grandes vasos torácicos e um local muito frequente de malformações congénitas (Creazzo, *et al.*, 1998). Recentemente foi descoberto um novo progenitor vascular comum, caracterizado como sendo uma célula Flk1⁺ derivada de CEE, que dá origem a células endoteliais se for exposto a VEGF e a células de músculo liso quando exposto a PDGF-BB (Yamashita, *et al.*, 2000). Tal como as células de músculo liso vascular, os perícitos que cobrem as arteríolas, vénulas e capilares também têm múltiplas funções, modulando o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular, regulando o crescimento dos vasos sanguíneos e libertando sinais para o endotélio e matriz através de moléculas celulares e exógenas (Conway, *et al.*, 2001).

O recrutamento de células peri-endoteliais é mediado por uma série de factores locais. PDGF-BB é um quimioatractor de células de músculo liso (Lindahl, *et al.*, 1998), enquanto VEGF também contribui (von Tell, *et al.*, 2006). As interacções entre células endoteliais e peri-endoteliais são estabilizadas por Ang-1 e Tie-2, sendo que o último também induz a formação de novas ramificações vasculares e a remodelação vascular (Gale ; Yancopoulos, 1999, Lindahl, *et al.*, 1999, Suri, *et al.*, 1996). Interacções ligando-receptor

Ephrin-Eph podem também transferir sinais entre o endotélio e as células do mesênquima (Gale ; Yancopoulos, 1999). O factor de transcrição com domínio bHLH, dHAND, é necessário para a interacção recíproca entre as células de mesênquima e as células endoteliais, assim como para a diferenciação de células de músculo liso (Yamagishi, *et al.*, 2000). Em ratinho, a falta de *dhand* promove anomalias vasculares severas durante o desenvolvimento, com conseqüente letalidade. Finalmente, moléculas de adesão como as N-caderinas providenciam ligações mais fortes entre o endotélio e as células mesênquimais, vincando o seu carácter de permanência (Conway, *et al.*, 2001).

A matriz extracelular é essencial para a angiogénese, e deve ser vista como um membro dinâmico do processo. Para além de providenciarem um local para o armazenamento de factores de crescimento e pró-enzimas, como as MMPs (metaloproteases da matriz extracelular), os seus componentes servem de locais de ligação e alvo para factores de crescimento e Integrinas ancoradas na membrana celular de células endoteliais e mesênquimais (Conway, *et al.*, 2001, Serini, *et al.*, 2006). Por exemplo, a Integrina $\alpha v \beta 3$, que medeia a ligação ao colagénio, é essencial à maturação dos vasos sanguíneos, e logo à sua sobrevivência durante a angiogénese (Serini, *et al.*, 2006). A inibição desta ligação resulta na apoptose do endotélio, regressão vascular e interferência nos efeitos angiogénicos de VEGF e TGF- β (Brooks, *et al.*, 1994a, Brooks, *et al.*, 1994b). Outros componentes da matriz, como a fibronectina, laminina, vitronectina, osteopontina, fibrina, ácido hialurónico e trombospondina, interactuam variavelmente com as Integrinas e outros factores de crescimento, regulando a migração de células endoteliais e peri-endoteliais, a formação de tubos e a maturação da rede vascular (Brooke, *et al.*, 2003, Conway, *et al.*, 2001, Rusnati ; Presta, 2006).

1.3.9 - Regulação por níveis de oxigénio

O papel da pressão de oxigénio na regulação dos níveis de VEGF é muito importante para a sua função como factor angiogénico. A acumulação de ARNm de *Vegf* é induzida pela exposição a baixos níveis de oxigénio, quer *in vivo* como *in vitro* (Banai, *et al.*, 1994). Como seria de esperar, muitos outros genes envolvidos directa ou indirectamente na angiogénese são também induzidos como resposta à hipoxia. Estes incluem, entre outros, *Vegfr-1* e *Vegfr-2*, *Neuropilina-1*, *Neuropilina-2*, *Ang-2*, *sintase de óxido nítrico*, *Tgf- β 1*, *Pdgf-bb*, *Andotelina-1*, *Dll4* e *Il-8* (Mailhos, *et al.*, 2001, Semenza, 2000).

O complexo transcripcional composto pelos factores indutíveis pela hipoxia (HIF) – HIF-1 α , HIF-1 β (ARNT) e HIF-2 α – tem a função de aumentar o nível de expressão de vários genes envolvidos na activação da angiogénese e na sobrevivência celular (Conway, *et al.*, 2001). Alguns destes factores indutíveis pela hipoxia, onde se inclui VEGF, eritropoietina e VEGFR-1, contêm uma sequência de consenso, elemento de resposta à hipoxia (HRE), a montante da sua região promotora, com a qual HIF se associa (Liu, *et al.*, 1995). Quando os níveis de oxigénio são normais, o produto do gene VHL (o gene responsável pela doença de von Hippel-Lindau), marca HIF-1 α para degradação rápida. Contudo, durante a hipoxia, HIF-1 α é estabilizada (Maxwell, *et al.*, 1999). Os resultados da inactivação do gene HIF-1 α ou HIF-1 β em ratinho parecem suportar melhor um papel da hipoxia na regulação da angiogénese do que na vasculogénese, sendo letais embrionários aos 10,5 dpc (Maltepe, *et al.*, 1997, Ryan, *et al.*, 1998, Semenza, 2000).

1.4 - Controlo de expressão génica

Nas últimas décadas ocorreu uma grande revolução na maneira como se estuda e manipula a genética dos organismos. O modelo clássico envolvia basicamente o uso de métodos de selecção artificial de novas características genéticas surgidas por mutação espontânea. Os métodos modernos baseiam-se no desenvolvimento da engenharia genética. A evolução das técnicas de biologia molecular permitiu que se acumulassem resultados de sequenciação de vários genes de diversos organismos, culminando nos diversos projectos de sequenciação de genomas, alguns entretanto já terminados (Waterston, *et al.*, 2002). A disponibilidade destas sequências, associada a melhorias nas tecnologias de ADN recombinante, permitiu que se desenvolvessem novas técnicas de estudo da função génica. Ao passo que a era da descoberta de novos genes vai chegando ao fim, as técnicas de estudo da função génica *in vivo* vão assumindo uma importância cada vez mais fulcral no meio científico.

As técnicas de estudo de função génica compreendem as técnicas de perda de função génica, ganho de função génica e técnicas de rastreio de expressão.

As técnicas de perda de função génica baseiam-se na construção de vectores de ADN contendo uma cópia do gene em estudo, que foi alterada de forma a não ser funcional. Estes vectores são introduzidos em CEE, onde substituem um alelo endógeno por recombinação

homóloga (Capecchi, 1989, Doetschman, *et al.*, 1987, Evans ; Kaufman, 1981, Martin, 1981, Robertson, *et al.*, 1986). Essas CEE recombinantes podem dar origem a animais inteiros, recorrendo a técnicas como a agregação diplóide e tetraplóide ou injeção de CEE em blastocistos receptores. Animais em que ambos alelos sejam modificados não produzem a proteína do gene em estudo e dão origem a um fenótipo característico. A análise das funções celulares afectadas ou funções organotípicas afectadas indica ao investigador a função do gene em estudo.

As técnicas de ganho de função baseiam-se no uso de sequências promotoras, que vão controlar a especificidade de expressão do gene em estudo (Palmiter ; Brinster, 1985, Palmiter, *et al.*, 1982). Estas técnicas também envolvem a construção de vectores de ADN. As sequências promotoras podem ser incluídas no vector ou pode fazer-se uso de um promotor endógeno, embora nesse caso seja necessário afectar a função do gene associado a esse promotor endógeno. No caso de o ADN vector conter as sequências promotoras, pode ser usado para transfectar CEE ou pode ser microinjectado no pronúcleo masculino de embriões recém-fertilizados. Em ambos os casos a produção de um transgénico envolve a integração aleatória do ADN vector no genoma alvo. A técnica de microinjecção pronuclear permite a obtenção de animais transgénicos mais rapidamente que a técnica de agregação diplóide. Tal é conseguido por evitar o recurso a CEE e por dar origem a animais transgénicos e não a animais quiméricos. A desvantagem desta linha é que a selecção dos animais transgénicos em função da qualidade da integração do transgene tem de ser feita após o nascimento dos animais, devido a não se fazer recurso a CEE. No caso do ADN vector não conter as sequências promotoras, tem de ser transfectado em CEE, sendo que neste caso a integração tem de ocorrer por recombinação homóloga com o *locus* genético de interesse, de modo que a expressão do transgene fique regulada pelas sequências promotoras de interesse. Deste modo os animais transgénicos são produzidos da mesma forma que no caso dos mutantes de perda de função. Em qualquer dos métodos o resultado será a expressão do gene em estudo num local ectópico ou um aumento de expressão do gene em estudo, consoante o promotor usado. A análise do fenótipo resultante desta alteração génica traz pistas sobre a função do gene em estudo. No caso em que o recurso a um promotor específico, quer endógeno como ectópico, conduza a um fenótipo letal, que previne o animal mutante de se desenvolver, acaba destruindo aquilo mesmo que se queria saber. O advento da mutação condicional veio trazer aos biólogos do desenvolvimento uma ferramenta muito mais delicada para o estudo da função de um gene. Nesse sentido podem-se criar animais mutantes condicionais, espacial e temporalmente (Dymecki, 2000, Mallo, 2006, Mallo, *et al.*, 2003), conforme se condicione a

expressão num tecido específico a um ponto no espaço ou no tempo durante o desenvolvimento.

As técnicas de rastreio de expressão são derivadas das técnicas de transgénese usadas na produção de mutantes de ganho de função. A sua função é permitir estudar a localização e interacção da proteína em estudo. Para isso são criados genes recombinantes, que codificam proteínas de fusão, contendo o gene de interesse e um gene repórter ou o gene de interesse e um domínio específico que pode ser detectado por imunohistoquímica. A capacidade de criação de organismos que expressam proteínas de fusão com um gene repórter permite a realização de experiências de visualização da actividade génica em tempo real, trazendo o factor tempo ao estudo da função génica.

Todas estas técnicas são importantes para o estudo da função génica, sendo que se obtém mais informação usando várias técnicas em simultâneo.

1.4.1 - Células Estaminais Embrionárias

Desde meados da década de 1980 que as técnicas de alteração genómica de CEE vieram revolucionar a maneira como se efectuam os estudos genéticos na biologia de mamíferos e na investigação biomédica. Essas alterações genómicas já forneceram informações inavaliáveis a todos os campos das ciências da vida.

Historicamente, o aparecimento das linhas de CEE foi consequência do conhecimento adquirido durante a década de 70 pelos vários investigadores que trabalhavam com células de carcinoma embrionário pluripotentes (Martin ; Evans, 1974).

As CEE são derivadas do epiblasto de blastocistos em fase de pré-implantação. Verificou-se que após o seu estabelecimento, estas células mantinham o potencial de um dos componentes do epiblasto, a ectoderme primitiva. Logo estas têm a capacidade de contribuir para todas as linhagens do embrião em si, quando reintroduzidas num ambiente embrionário. Nestas quimeras as CEE comportam-se como ectoderme primitiva ou células epiblasticas, tal que contribuem para todas as linhagens celulares do feto resultante, assim como para os tecidos extra-embrionários derivados do embrião em gastrulação, nomeadamente a mesoderme do saco vitelínico, o saco amniótico e a alantóide (Nagy ; Rossant, 2000). Contudo as CEE quando agregadas com embriões pré-blastocísticos (nomeadamente, quando

agregados com embriões no estágio de oito células) não contribuem para as duas primeiras linhagens que surgem no desenvolvimento de um embrião, são elas as linhagens extra-embrionárias: trofoblasto e endoderme primitiva (Nagy ; Rossant, 2000). Contudo, o que realmente ditou o seu sucesso entre a comunidade científica foi a sua capacidade em diferenciarem-se eficientemente em células germinais, de tal modo que quimeras com contribuição de CEE para a linha germinativa transmitem o genoma das mesmas *in vivo* à sua progenia (geração F1).

1.4.2 – Uso de células estaminais embrionárias para produção de murganhos geneticamente modificados

A capacidade dos embriões de mamíferos incorporarem células estranhas e se desenvolverem como quimeras foi explorada para uma variedade de objectivos, incluindo a elucidação das linhagens celulares, investigação do potencial celular, a perpetuação de mutações produzidas em CEE por técnicas de manipulação genética dirigida, e a subsequente análise dessas mutações. A extensão da contribuição dessas células estranhas ao embrião depende da sincronia no desenvolvimento, entre estas e o embrião, e da sua capacidade mitótica e potencial de desenvolvimento. Se o objectivo da produção de quimeras for a transmissão à geração seguinte de uma mutação gerada, então as CEE têm de ter a capacidade de passar o processo de meiose e a gametogénese, sendo assim uma ferramenta muito importante nas técnicas de manipulação genética de murganhos (Nagy, et al., 1990).

A extensão de contribuição das CEE para o desenvolvimento do embrião depende da competição exercida pelas células embrionárias receptoras e da competência das próprias CEE em diferenciarem determinados tecidos, sendo isso a base de se gerarem quimeras no processo de agregação (Nagy ; Rossant, 2000). No caso de as CEE reterem a capacidade de executar a meiose e executar a gametogénese, na condição de terem contribuído para a formação da linha germinativa do ratinho derivado da agregação, vão transmitir à descendência a mutação que contêm, estabelecendo uma linha de ratinhos transgênicos (Nagy ; Rossant, 2000).

Existem dois métodos básicos de gerar quimeras em fase de pré-implantação em ratinho, uma é a microinjecção de CEE no blastocélio de blastocistos e a outra é a agregação embrionária. Esta última tem as vantagens de ser um método mais barato e simples de estabelecer em laboratório do que a microinjecção (requer um micromanipulador e é mais exigente a nível técnico).

Existem quatro tipos de agregações:

- entre dois embriões diplóides no estágio de oito células
- entre CEE e embriões diplóides no estágio de oito células.
- entre embriões diplóides no estágio de oito células e embriões tetraplóides (resultantes da fusão das duas células de um embrião no estágio de duas células).
- entre CEE e embriões tetraplóides (resultantes da fusão das duas células de um embrião no estágio de duas células).

A capacidade de células estranhas se incorporarem num embrião após a agregação depende, provavelmente, largamente da compatibilidade entre as moléculas de adesão celular exibidas pelas células dadoras e embriões receptores. Todas as células que se conseguem agregar com embriões no estágio de oito células expressam elevados níveis de moléculas de adesão celular homotípicas, como a E-caderina, que também é expressa pelos embriões no estágio de clivagem. Contudo, a colonização das linhagens embrionárias pelas células dadoras depende do potencial intrínseco das células hospedeiras e dadoras (Nagy, et al., 1990, Nagy ; Rossant, 2000).

Para obtermos animais vivos com o vector de transgênese condicional inserido no seu genoma optou-se em primeira instância pelo processo de agregações diplóides. O processo de agregações com embriões tetraplóides foi preterido pois é bastante complexo, poucos embriões sobrevivem ao processo de fusão e só usando CEE de passagem muito baixa é que se conseguem obter animais vivos (Nagy, *et al.*, 1993). Quanto maior for o número de passagem das CEE menor será a sua pluripotência e logo menor a sua capacidade de gerar um animal inteiro, e como neste processo todo o embrião vai ser derivado das CEE, o mais comum é o embrião morrer algures durante o seu desenvolvimento.

1.4.3 - Recombinação sítio específica

O uso de sistemas de recombinação sítio-específicos veio revolucionar a capacidade de manipular geneticamente células estaminais embrionárias e por consequência, ratinhos. Recentes avanços usando os sistemas Cre-loxP (oriundo do bacteriófago P1) (Sauer ; Henderson, 1988) e FLP-*frt* (oriundo de *S. cerevisiae*) (O'Gorman, *et al.*, 1991) tornaram possível a produção de mutações com transmissão à descendência, com a ocorrência de um

único evento de manipulação genética, assim como a activação/inactivação de genes de maneira condicional no ratinho vivo (Mallo, 2006, Mallo, *et al.*, 2003).

Os sistemas de recombinação sítio-específicos são compostos por dois elementos: a enzima recombinase e uma pequena sequência de ADN que é especificamente reconhecida pela recombinase em questão. Estes 2 elementos trabalham em conjunto para deletar, inserir, inverter ou translocar o ADN associado (LePage, *et al.*, 2000, Mallo, 2006, Matsusaka, *et al.*, 2000, Ramirez-Solis, *et al.*, 1995, Sauer, 1998, Sauer, 1993, Sauer ; Henderson, 1988, Zheng, *et al.*, 2000).

Quer a Cre como a FLP são recombinases sítio-específicas da superfamília da λ Integrase, que clivam o ADN em sequências alvo distintas e depois o ligam entre si para regenerar uma cadeia contínua. Este evento recombinatório ocorre com absoluta fidelidade, de tal modo que nenhum nucleótido é ganho ou perdido no geral, sendo portanto um evento recombinatório conservativo que não tem quaisquer outros requerimentos para além da presença de recombinase, sequências específicas de ADN e alguns catiões mono ou bivalentes (Dymecki, 2000).

Em ambos estes sistemas, a sequência específica de reconhecimento tem 34pb e embora difiram na sequência primária partilham a estrutura secundária (Lewandoski, 2001).

Estes locais são compostos por duas repetições invertidas de uma sequência de 13pb a flanquearem uma sequência central de 8pb rica em A-T e não palindrômica, que confere uma direcção ao local (Lewandoski, 2001).

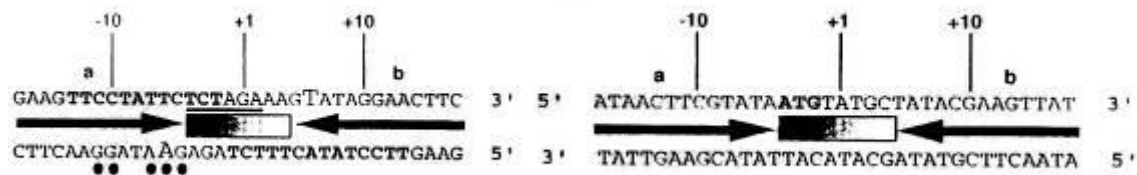


Figura 16 – Locais de reconhecimento de recombinase Cre e Flp. À esquerda, esquema representativo de um locus FRT. À direita, esquema representativo de um locus loxP. Adaptado de (Dymecki, 2000).

Durante um evento recombinatório liga-se um monómero de recombinase a cada região de simetria. A sequência central é o local onde vai ocorrer a quebra, troca e ligação, sendo portanto o local de *cross-over*, entre dois locais LoxP ou FRT seguidos, que têm de ser separados por pelo menos 82pb (Dymecki, 2000). Quando os dois dímeros entram em contacto, formam um complexo sináptico. A recombinação ocorre através de um intermediário de *Holliday*, que é resolvido em duas moléculas recombinantes. O resultado é a troca de braços de simetria entre os dois locais e a região central de ambos locais, ficando um

heteroduplex. No caso de ter ocorrido uma deleção intracromossômica, isto significa que permanece um local de reconhecimento *heteroduplex* no cromossoma (no local onde estava a sequência excisada) e outro na molécula circular excisada, o que pode significar que a reacção é reversível. Contudo a recombinação intermolecular não é tão favorável energeticamente. Mais ainda, em muitas situações *in vivo*, o produto extra-cromossómico é perdido, tornando a reacção verdadeiramente irreversível (Dymecki, 2000).

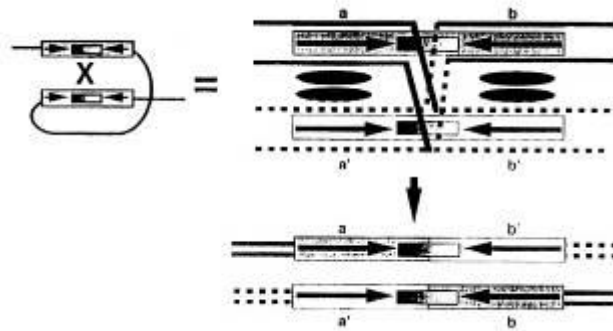


Figura 17 – Complexo sináptico entre moléculas de recombinasse e dois locus alvo. No resultado final os braços de simetria dos dois locus alvo foram trocados e o núcleo dos dois recombinantes é um heteroduplex. Adaptado de (Dymecki, 2000).

O resultado do evento recombinatório é dependente da orientação relativa das sequências de reconhecimento envolvidas, ou mais especificamente da orientação da região central. Se estas estiverem repetidas em sentido directo o resultado irá ser a deleção da sequência de ADN entre elas. Se a sua orientação for invertida então o resultado irá ser a inversão da sequência de ADN entre as duas sequências de consenso (Dymecki, 2000). No caso extremo das sequências estarem em cromossomas diferentes e ocorrer recombinação entre elas, o resultado irá ser uma translocação cromossómica, que pode ocorrer entre cromossomas homólogos (aumenta a variabilidade e não deve ser letal) ou heterólogos (muito provavelmente conduzirá a mutações que se podem revelar prejudiciais ou mesmo letais ao organismo em questão) (Dymecki, 2000).

Em ambos estes sistemas a recombinação é catalisada independentemente da topologia do ADN. O ADN substrato pode estar na forma circular superenrolada, circular relaxada ou linear (cromossoma). Mais ainda, pode ocorrer recombinação eficiente em células pós-mitóticas diferenciadas terminalmente, assim como em células em divisão. No conjunto estas propriedades fazem dos sistemas Cre-loxP e FLP-*frt*, ferramentas muito apropriadas à modificação ou introdução de ADN em locais específico de uma variedade de hospedeiros, incluindo o ratinho e as culturas de células de mamíferos (Dymecki, 2000).

1.4.4 - Sistema de transgênese baseado no operãõ da tetraciclina (sistema tet)

O sistema tet é uma alternativa aos sistemas baseados em recombinases. Este sistema baseia-se no gene transactivador de tetraciclina (*tTA*) ou numa versão recombinante deste gene, o transactivador inverso de tetraciclina (*rtTA*). O gene *tTA* codifica uma proteína de fusão composta pelo domínio de ligação a TRE (*tetracyclin responsive element*) de TetR (*Escherichia coli*) e o domínio de activação VP16 do vírus *herpes simplex*. O gene *rtTA* codifica uma proteína de fusão semelhante a *tTA* mas com 4 mutações pontuais no domínio TetR que resultam numa inversão da resposta a tetraciclina por parte do factor de transcriçãõ. As proteínas codificadas por estes genes comportam-se como activadores transcrpcionais em trans (*tTA*), ou repressores transcrpcionais no caso de *rtTA*, na ausência de tetraciclina, ou do seu análogo mais estável doxociclina. Na presença de tetraciclina, ou doxociclina, estes alteram o seu comportamento, passando a actuar como repressor (*tTA*) ou activador (*rtTA*) transcrpcionais (Mallo, 2006).

A vantagem do sistema *tet-on* (com *rtTA*) face ao *tet-off* (com *tTA*) é a maior rapidez de resposta ao indutor, pois normalmente é mais rápido saturar um sistema com um indutor do que removê-lo do sistema (Urlinger, *et al.*, 2000). Um sistema *tet-on* garante uma maior fiabilidade no ponto temporal de activação (Urlinger, *et al.*, 2000) face ao sistema *tet-off*. Um sistema *tet-off* funciona com menores quantidades de doxociclina e pode permitir uma activação mais forte do *elemento de resposta à tetraciclina* (TRE).

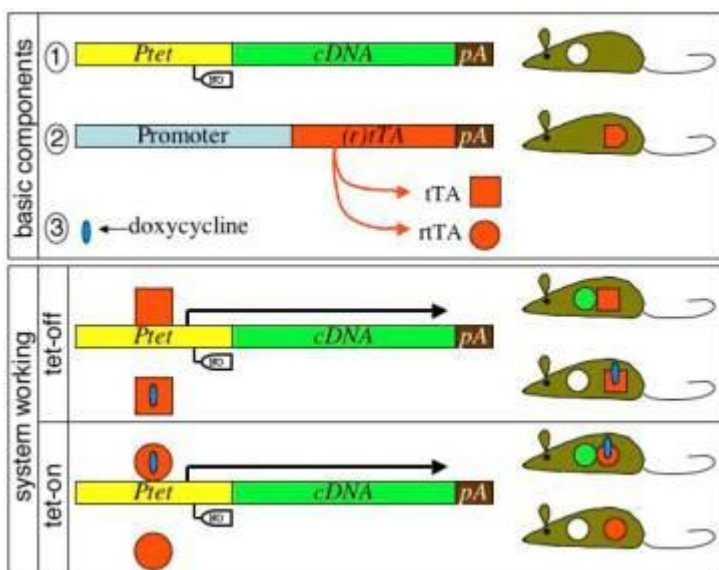


Figura 18 - Esquema representativo do funcionamento básico do sistema tet. O sistema é baseado na existência de dois transgenes, um com um promotor responsivo a *tTA* ou *rtTA* e o outro que expressa *tTA* ou *rtTA* sob o controlo de um promotor de interesse. No sistema *tet-on*, havendo doxociclina no animal vai haver expressão do ADNc de interesse nas células que haja expressão de *rtTA*. No sistema *tet-off* há expressão do ADNc de interesse em que houver expressão de *tTA*, na ausência de doxociclina. Adaptado de (Mallo, 2006).

1.5 - Tecnologia GeneChip®

Nos anos recentes, emergiu um novo campo na genética, que compreende a análise global da expressão génica. A tecnologia de *microarrays* veio permitir utilizar o enorme manancial de informação decorrente dos projectos de sequenciação do genoma de várias espécies para realizar estudos de expressão génica diferencial. Esta tecnologia é muito importante pois permite estudar alterações na intensidade de expressão de milhares de genes, muitos ainda não caracterizados, num curto espaço de tempo (Duggan, *et al.*, 1999). A comparação de resultados entre amostras permite então a compreensão de interacções entre genes e vias, ajudando na integração de expressão génica com função, ao nível celular, por revelar como diferentes genes interactivam para produzir uma determinada resposta celular.

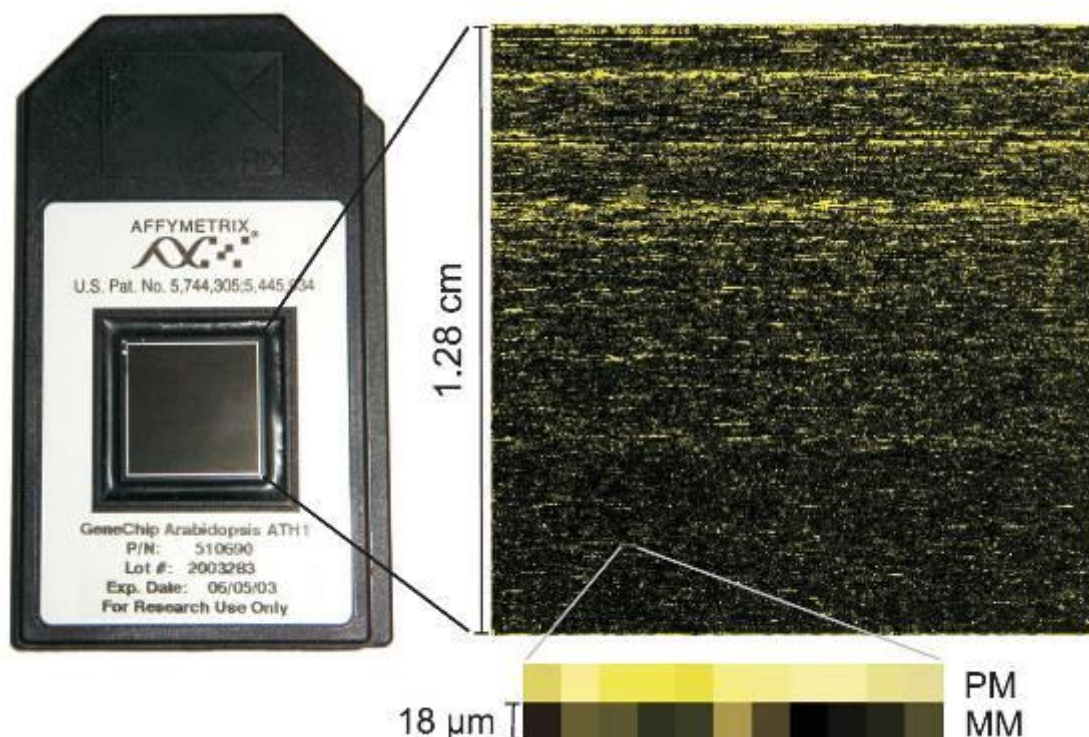


Figura 19 – Aspecto visual de um GeneChip® array da Affymetrix e de uma imagem pseudo-colorida obtida após uma experiência de hibridação. O nível de expressão de cada gene (traduzido pela abundância de transcritos) é calculado com base na intensidade da fluorescência emitida pelos respectivos pares de sonda (adaptado de (Becker ; Feijo, 2003)).

A tecnologia GeneChip da Affymetrix, envolve processos de fotolitografia e de química combinatorial que são utilizados para sintetizar *in situ*, no *array*, milhões de cópias das centenas de milhares de oligonucleótidos seleccionados (com 25 nucleótidos de comprimento), base após base, numa superfície de vidro. Estes oligonucleótidos irão constituir centenas de milhares de diferentes células específicas de sonda. Cada célula do *chip*

tem somente um tamanho de 11 μm x 11 μm no formato mais recente dos *GeneChip*[®] *arrays* e possui uma posição bem determinada (Affymetrix, 2004b).

Para cada gene representado no *array* existem múltiplos pares distintos de células específicas de sonda (11 pares nos *arrays* com formato mais recente, como os que representam o genoma murino) que se designam pares de sonda e que são escolhidos a partir do terminal 3' da respectiva sequência do transcrito do gene (Affymetrix, 2004a, Knudsen, 2002). Cada par de sonda possui uma sonda perfeitamente complementar (PM), cuja sequência dos oligonucleótidos é perfeitamente complementar à sequência alvo, e uma sonda *mismatch* (MM), cuja sequência dos oligonucleótidos é idêntica à PM, excepto para uma única base localizada na região central do oligonucleótido (posição 13) que se encontra trocada com a sua base complementar. Desta forma, torna-se possível a quantificação e subtração dos sinais originados pela existência de hibridações cruzadas e a quantificação dos valores de ruído de fundo (sinal base que corresponde à ausência de hibridação) (Affymetrix, 2004a, Knudsen, 2002). O conjunto dos pares de sonda que representam um mesmo gene é designado de conjunto de sonda (*probe set*). O nível de expressão correspondente a cada gene é determinado por recurso a algoritmos apropriados que interpretam os sinais obtidos para o conjunto de pares de sonda que o representam (Affymetrix, 2004a). Os *arrays* mais recentes possuem ainda os pares de sonda que constituem cada conjunto de sonda espalhados em várias regiões do *chip*, pelo que proporcionam medições múltiplas e independentes de cada transcrito, permitindo a obtenção de resultados precisos, fiáveis e reprodutíveis em todas as experiências.

Os GeneChip contêm centenas de milhares de sondas de ADN individualizadas, que no seu conjunto representam todos os transcritos de um organismo.

Usam-se amostras de ARN total, que passando por um ou dois passos de transcrição reversa seguida de transcrição *in vitro* chegam ao estado de ARNc amplificado e depois a ARNc marcado com nucleótidos acoplados a biotina. Estas amostras de ARNc biotinilados são hibridadas com os chips e, depois de lavados, os chips são incubados com fluorocromos que se ligam às moléculas de biotina nas moléculas de ARNc biotiniladas que se ligaram às sondas nos chips. A leitura do chip é feita com um *laser* e mede-se a intensidade de fluorescência emitida em cada poço, que corresponde à quantidade de moléculas de ARNc que hibridaram. Deste modo consegue-se calcular a quantidade de moléculas de ARN de cada gene presente no genoma que a amostra inicial tinha e assim comparar com outras amostras. Assim é possível comparar níveis de expressão entre amostras diferentes, quais genes respondem a um tratamento, quais genes são activados ou desligados por uma determinada mutação, etc.

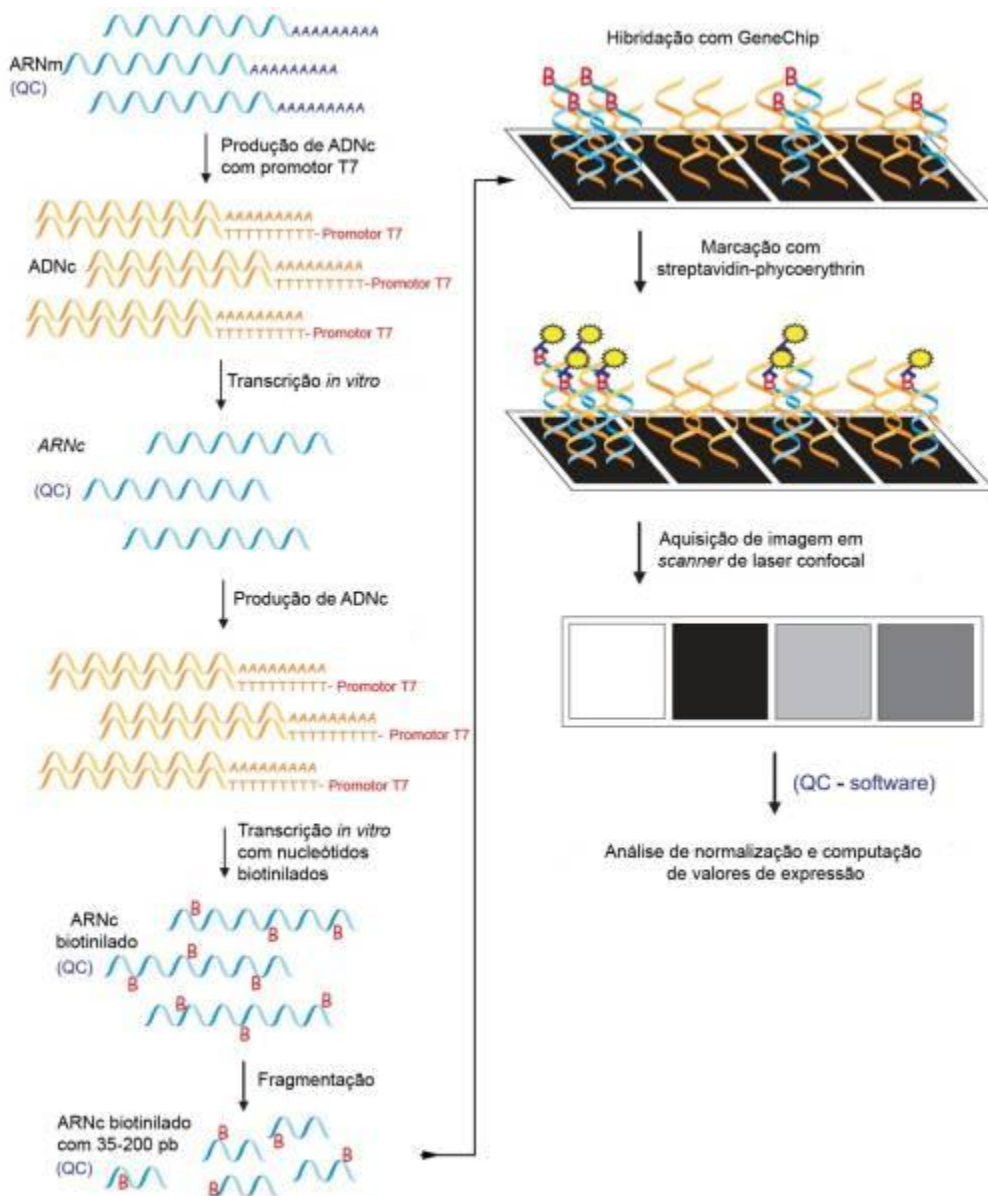


Figura 20 – Esquema representativo do percurso que as amostras de ARNm passam num protocolo de microarrays.

1.6 - Biologia tumoral

O cancro é uma das patologias com maior impacto social e humano que vem afligindo a humanidade nas últimas décadas. Esta patologia é frequentemente tratada como sendo uma doença única, embora corresponda um conjunto de doenças.

A principal causa do desenvolvimento de tumores primários é a ocorrência e acumulação de mutações genéticas em uma ou mais células, conduzindo a proliferação descontrolada ou diminuição na taxa de apoptose. Assim, as células mutadas têm uma vantagem proliferativa em relação às células vizinhas saudáveis e formam uma massa celular em crescimento (Plank ; Sleeman, 2003). O processo de transformação de uma célula normal numa célula cancerígena pode incluir a activação de oncogenes, perda de telomerasas ou indução de aneuploidia como factores iniciadores (Duesberg, *et al.*, 1999, Hahn ; Weinberg, 2002, Pelengaris, *et al.*, 2002).

O crescimento tumoral passa por três etapas, hiperplasia, displasia e anaplasia. A fase hiperplásica resulta de hiperproliferação celular de células que ainda mantêm uma morfologia normal. A fase displásica envolve crescimento contínuo, acompanhado de alterações morfológicas nas células envolvidas. Na fase anaplásica as células tumorais têm um aspecto ainda mais anormal, acabando por perder a sua função original e atingindo um fenótipo cada vez mais invasivo (Alberts, 1994).

Os tumores podem ser organizados em benignos e malignos. Os tumores benignos são caracterizados por terem um único agregado, com fronteira bem definida para as células vizinhas saudáveis. No caso dos tumores malignos as células tumorais estão misturadas com as células saudáveis, não existindo uma fronteira clara, e tentam invadir tecidos vizinhos. Só os tumores malignos são denominados de cancro (Alberts, 1994).

Os cancros podem ser classificados pelo tipo de células que lhe deram origem. São denominados de carcinomas se a sua origem for epitelial, sarcomas se a sua origem for muscular ou conectiva e leucemias se a sua origem for hematopoiética (Plank ; Sleeman, 2003). Os tumores podem ser adicionalmente categorizados pela sua origem, sendo que cancros originados em tecidos diferentes tendem a comportar-se de maneira muito diferente. Na realidade o cancro não pode ser encarado como uma doença mas sim como uma classe de doenças com as características comuns de proliferação celular aumentada e invasão de tecidos circundantes (King, 1996).

1.6.1 - Angiogénese tumoral

Inicialmente os tumores são avasculares e dependem do fenómeno de difusão passiva para a sua sobrevivência e crescimento (Plank ; Sleeman, 2003). Quando atingem 0,5mm de diâmetro os tumores entram num estado de dormência (Folkman, 1986). Células que estejam a mais de 150-200µm de capilares morrem por falta de nutrientes e oxigénio e por falha de remoção de metabolitos (Folkman, 1986, Gimbrone, et al., 1974). O ponto de início da neovascularização tumoral é determinado de “*angiogenic switch*” e marca o momento em que ocorre uma alteração no balanço entre factores anti- e pró-angiogénicos e o tumor ganha a capacidade de induzir o desenvolvimento de uma vasculatura nova, que irá suportar o seu crescimento para além do limite físico da difusão e a passagem da sua fase dormente para a fase angiogénica (Adams ; Alitalo, 2007, Dass, 2004, Fox, et al., 1996, Plank ; Sleeman, 2003). A indução da neo-angiogénese pode ocorrer como consequência do aumento da hipoxia no tecido tumoral induzir a expressão de VEGF, por o tumor ganhar a capacidade de expressar VEGF ou outros factores pró-angiogénicos ou por o tumor ganhar a capacidade de promover o recrutamento de progenitores endoteliais, vindos da medula óssea (Dass, 2004). Após ocorrência do “*angiogenic switch*” as células endoteliais próximas do tumor são activadas, soltam-se das células adjacentes e secretam enzimas proteolíticas que vão degradar a membrana basal (Plank ; Sleeman, 2003). Em seguida as células endoteliais iniciam o processo de migração em direcção ao tumor, formando um novo broto vascular. Este novo vaso vai crescendo por recrutar cada vez mais células endoteliais do vaso parental e por ocorrer um aumento na taxa de proliferação endotelial, resultante do estímulo angiogénico. O novo vaso pode iniciar como um cordão endotelial mas acaba por desenvolver um lúmen, tornando-se funcional (Pepper, 1997). Este processo de crescimento vascular é acompanhado de um aumento na produção de factores anti-proteolíticos, que permitem que os novos vasos formados se possam ligar ao substrato, contrariando o efeito das enzimas proteolíticas secretadas inicialmente (Plank ; Sleeman, 2003).

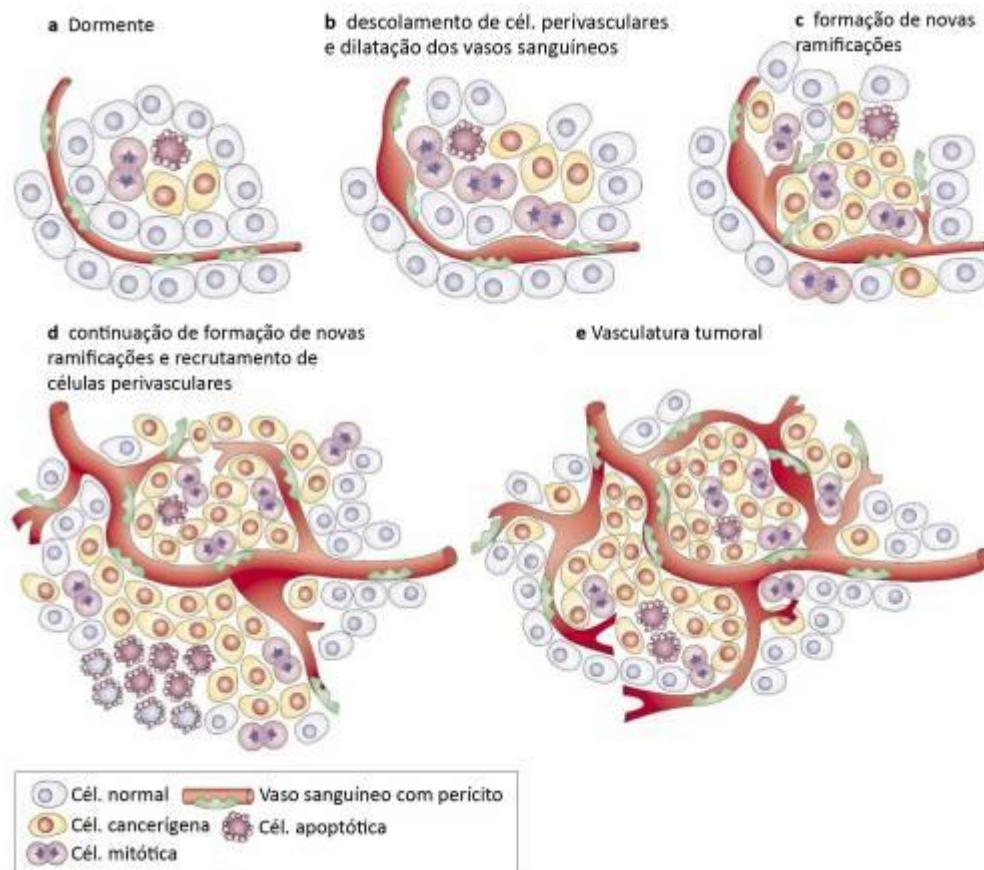


Figura 21 – Formação da vasculatura tumoral. **a)** A maioria dos tumores começa como nódulos avascularizados. **b)** É necessário que ocorra indução da angiogénese para que o tumor possa ter um crescimento exponencial. Este processo inicia-se com o descolamento de células perivasculares e dilatação dos vasos sanguíneos. **c)** O passo seguinte envolve a formação de novas ramificações vasculares e a sua maturação, através do recrutamento de células perivasculares, **d)** **e)** A formação de novos vasos sanguíneos prossegue enquanto o tumor continue a crescer, dirigindo-se especialmente para regiões do tumor que estejam hipóxicas ou necróticas. Adaptado de (Bergers ; Benjamin, 2003).

A vasculatura tumoral pode ser muito diferente consoante o tipo de tumor, taxa de crescimento e localização na estrutura tumoral (Less, et al., 1997). Por exemplo, tumores pequenos podem expressar mais bFGF e IL8, enquanto tumores grandes podem expressar mais VEGF (Fidler, 2001), noutros casos observa-se bFGF e IL8 a serem mais expressos na periferia e VEGF no núcleo do tumor (Kumar, et al., 1998).

Comparando com a vasculatura normal, a vasculatura tumoral é tipicamente imatura (Fox, et al., 1996, Hashizume, et al., 2000), com um característico aumento da permeabilidade, resultante de terem membranas basais mais frágeis (Liotta, et al., 1976). A vasculatura tumoral é tipicamente mais densa que a vasculatura de tecidos equivalentes não afectados, com vasos de diâmetro anormalmente grande (Benjamin ; Keshet, 1997). Todas estas características da vasculatura tumoral são resultado da acção dos factores pró-angiogénicos secretados pelo próprio tumor, especialmente resultado da acção de VEGF (Dass, 2004).

Quando se regula negativamente o funcionamento da via VEGF ocorre descolamento de células endoteliais das paredes dos vasos sanguíneos do tumor, conduzindo a hemorragias e, conseqüentemente, a necrose do tumor. Como estas células endoteliais que descolam entram em apoptose, indica que um dos principais papéis de VEGF na neo-vascularização está em actuar como um factor de sobrevivência endotelial (Benjamin ; Keshet, 1997).

O desenvolvimento de uma rede capilar junto das células tumorais aumenta a probabilidade de células tumorais entrarem na circulação sanguínea, facilitando a disseminação do tumor a outras partes do organismo, processo chamado de metástases (Schirrmacher, 1985). Para entrar em circulação uma célula tumoral tem de ganhar a capacidade de degradar a matriz extracelular rodeante, atravessar tecido conectivo e, dependendo do estado de maturação do vaso sanguíneo, degradar a membrana basal das células endoteliais para entrar no lúmen vascular (Adatia, et al., 1992). A célula tumoral em circulação tem ainda que conseguir evadir o sistema imunitário e voltar a degradar a membrana basal do endotélio para conseguir extravasar do vaso sanguíneo e instalar-se num tecido distante (Saaristo, et al., 2000).

1.6.2 - A angiogénese na terapêutica do cancro.

Os primeiros pioneiros da investigação da angiogénese observaram, há mais de um século, que o crescimento de tumores era acompanhado de um aumento da vascularização. Foi sugerido na altura que um dos pontos cruciais para o processo de formação de um cancro seria uma doença da vasculatura na área afectada (Ferrara, 2002). A existência de factores produzidos pelos tumores, que seriam responsáveis pela formação dos novos vasos sanguíneos foi sugerida há quase 70 anos (Ferrara ; Kerbel, 2005, Ide, et al., 1939). Poucos anos mais tarde foi postulado que o crescimento tumoral era crucialmente dependente da formação de novos vasos sanguíneos funcionais (Algire, et al., 1945). Em 1971, Judah Folkman hipotetizou que a inibição da angiogénese podia ser uma estratégia terapêutica no tratamento do cancro, iniciando o ramo de investigação na área da angiogénese terapêutica (Ferrara, 2002, Folkman, 1971). Nas três décadas seguintes foram publicados mais de 10000 artigos sobre angiogénese, culminando no relato recente do sucesso da primeira utilização em grande escala de uma droga anti-angiogénica para o tratamento do cancro (Hurwitz, et al.,

2004, Kerbel, 2006). Não se espera que estes agentes, só por si, tenham um efeito curativo, ou seja, que causem regressão tumoral total, mas sim, que previnam a expansão da massa tumoral. A sua principal função pode ser conduzir a que o tumor permaneça num estado benigno durante mais tempo, dando uma melhor oportunidade de actuação a drogas citostáticas ou radioterapia para erradicarem o tumor (Dass, 2004).

Dos novos tratamentos anti-angiogénicos criados, o mais validado é uma terapia com anticorpos neutralizantes para VEGF-A com boa eficiência no tratamento de tumores do cólon e recto e em tumores pulmonares de células não-pequenas (Dy ; Adjei, 2006, Panares ; Garcia, 2007, Ranieri, *et al.*, 2006). No entanto nem todos os tumores são sensíveis a este tratamento e alguns tumores acabam por ganhar resistência, o que indica que será necessário actuar de forma combinada com outras terapias para conseguir um efeito melhor (Kerbel, 2006). Esta resistência pode ser adquirida no caso de o tumor começar a produzir factores angiogénicos alternativos, se o tumor desenvolver resistência à hipoxia ou se a vasculatura tumoral passar a ser mais estável e madura e por isso menos capaz de responder a drogas anti-angiogénicas (Ferrara ; Kerbel, 2005). No caso de inibidores de VEGF-A, a resistência ocorre tipicamente por aumento nos níveis de VEGF-C e VEGF-D, que conseguem activar VEGFR-2 e -3 e assim compensar a falta de VEGF-A (Alitalo, *et al.*, 2005, Tammela, *et al.*, 2008). Por este motivo, torna-se cada vez mais necessário que se determinem novos alvos para terapia angiogénica, de forma a complementar tratamentos existentes e melhorar a capacidade de controlo do desenvolvimento tumoral.

1.6.3 - Modelos animais de tumores

O murganho tem tido um papel fulcral na investigação do cancro, desde meados do Séc. XX . O uso de um organismo com genética manipulável que partilha sistemas de órgãos e uma grande semelhança genética com a espécie humana providencia um meio de analisar várias características de doenças humanas (Hann ; Balmain, 2001). Especialmente nas últimas três décadas, numerosos laboratórios usaram técnicas de manipulação genica para criar novas linhas de murganhos para estudar o desenvolvimento tumoral. A análise destas linhas de murganhos conduziu a um melhoramento da compreensão da actuação de genes envolvidos em tumorigenese em humanos, da histopatologia da progressão do cancro e muitos outros aspectos da doença que só poderia ser estudados no contexto de um animal inteiro (Klausner, 1999).

Historicamente, linhas transgénicas que expressam formas activadas de oncogenes ou linhas de perda-de-função de genes supressores de tumores foram geradas para testar a relação causal entre a expressão, ou falta de expressão, de um gene e o desenvolvimento de um tumor. Esforços adicionais com estes modelos incluíram a produção de murganhos com combinação de múltiplas mutações associadas a cancro, a descoberta de mutações cooperativas e a análise inicial da genética de manutenção tumoral e sua progressão (Klausner, 1999).

Modelos de doenças em murganhos permitem o desenvolvimento e teste de novas terapias de prevenção e tratamento, identificação de novos marcadores de diagnóstico, de novos alvos terapêuticos e melhoram o conhecimento da biologia *in vivo* e genética da iniciação, promoção, progressão e metástases tumorais (Hann ; Balmain, 2001).

O murganho modelo ideal recapitula fielmente a história biológica, patobiologia e bioquímica da doença humana. Este modelo tem elevada penetrância mas baixo número de tumores. Os tumores desenvolvem-se com um curto tempo de latência, permitindo que o tumor progrida e seja analisado durante o curto tempo de vida de um murganho. Apesar de nenhum modelo tumoral atingir todos os pontos de um modelo ideal, independentemente ou em combinação com outra linha modelo, consegue-se simular uma ou várias das características cardinais de um determinado tipo de cancro humano (Hann ; Balmain, 2001).

Existem várias classes de modelos tumorais:

- Tumores xenotransplantados – Este sistema baseia-se na injeção de células tumorais de origem diferente da linha de murganhos usada como receptora. Típicamente é feito com células tumorais humanas injectadas em murganhos imunocomprometidos. É um sistema clinicamente mais relevante, usa linhas tumorais bem referenciadas e com um longo historial de dados de resposta a drogas. O facto de os tumores terem origem humana faz com que resultados de eficácia de uma terapia nova sejam mais facilmente transplantáveis para ensaios clínicos em humanos. A desvantagem deste modelo prende-se com o facto do estroma tumoral ser do murganho, os murganhos hospedeiros serem imunodeprimidos. Se forem usadas células tumorais de murganhos com fundo genético diferente dos murganhos receptores, este também é considerado de xenotransplante. Neste caso, a necessidade de se usarem murganhos imunodeprimidos poderá ser avaliada consoante a proximidade da linha receptora à linha dadora (Talmadge, et al., 2007, Teicher, 2006).

Os tumores xenotransplantados podem ser implantados subcutaneamente ou ortotópicamente, no mesmo órgão onde originou a linha tumoral usada. No caso de os

tumores serem implantados subcutaneamente a sua localização será ectópica, o que afecta a capacidade do tumor criar metástases e torna o sistema menos semelhante aos tumores que pretende simular. O ambiente local do crescimento tumoral é importante na determinação da eficácia de um tratamento, por isso a implantação ortotópica revela-se mais significativa no estudo de uma nova terapia. O problema associado à implantação ortotópica de xenotransplantes prende-se com a maior dificuldade de implantação e de controlo de desenvolvimento do tumor, face à facilidade de monitorização possível num xenotransplante subcutâneo (Talmadge, et al., 2007, Teicher, 2006).

- Tumores singénicos – É um modelo semelhante ao modelo de tumores xenotransplantados mas em que as células tumorais introduzidas têm origem singénica com os murganhos receptores. Este sistema tem por vantagem o facto de os tumores desenvolverem-se em animais imunocompetentes e crescerem rápido. As desvantagens destes modelos prendem-se com o facto de os tumores serem completamente murinos, limitando a transplantabilidade do desenvolvimento de terapias imunogénicas do laboratório para a clínica (Teicher, 2006).

- Tumores induzidos por carcinogéneos – Estes estudos baseiam-se na aplicação ou administração de um composto, ou compostos, reconhecidos por terem um efeito carcinogénico, em murganhos saudáveis. Estes modelos permitiram melhoramentos na compreensão dos processos de mutação, stress oxidativo e inflamação na iniciação de tumores e identificação de potenciais alvos moleculares para quimioprevenção (Teicher, 2006).

- Modelos tumorais geneticamente alterados – Estes modelos envolvem tumores que se desenvolvem autonomamente em murganhos geneticamente alterados. A vantagem deste sistema está no facto dos tumores desenvolverem-se “naturalmente” no hospedeiro e poderem ser seguidos durante um longo período de tempo simulando bem o desenvolvimento de um tumor equivalente em humanos. As desvantagens prendem-se com o custo de manter os animais da experiência durante o período de desenvolvimento do tumor, que pode durar meses, com a dificuldade de monitorização do desenvolvimento tumoral e com o facto de o tumor ser completamente murino. Se os tumores de uma determinada linha estiverem bem caracterizados, como no caso de RIP-Tag2 e TRAMP (Greenberg, et al., 1995, Hanahan, 1985), estas linhas podem ser usadas para prevenção de evolução de lesões hiperplásticas, tratamento de neoplasias e regressão de massa tumoral estabelecida (Talmadge, et al., 2007, Teicher, 2006).

Capítulo 2 – Produção da linha de ratinhos transgênicos Z/EG-Dll4

2.1 – Objectivos

O primeiro passo deste trabalho foi produzir linhas de ratinhos transgênicos de sobre-expressão de *Dll4*. Decidiu-se usar o vector Z/EG-Dll4 como vector de transgénese. Esta escolha teve por base o facto de este vector ser baseado num sistema condicional, que nos permitiria o controlo temporal e espacial da sobre-expressão de *Dll4*. O facto de ser um sistema bi-repórter também seria muito importante pois resolvia assim dois problemas comuns da utilização de murganhos transgênicos em investigação, simplifica e torna mais barato e rápido o rastreio dos animais transgênicos e permite obter uma confirmação imediata da eficiência da recombinação e, assim, da sobre-expressão. Esta linha de sobre-expressão condicional de *Dll4* seria a primeira base dos trabalhos experimentais sobre a função do gene *dll4*.

Este objectivo seria cumprido através da realização do protocolo de agregação de células estaminais embrionárias (CEE) alteradas geneticamente com embriões no estágio de mórula com oito células. Escolheu-se este protocolo por ser mais simples que a microinjecção pronuclear e permitir o rastreio dos embriões agregados antes de estes serem implantados. A morosidade deste protocolo levou-nos, mais tarde, a recorrer à Unidade de Transgênicos, IGC, onde foram produzidas mais linhas de murganhos transgênicos para Z/EG-Dll4 através do protocolo de microinjecção de ADN em pronúcleos de embriões recém-fertilizados.

Após obtenção de várias linhas de murganhos transgênicos para Z/EG-Dll4, seria necessário avaliar a qualidade dessas linhas, através da análise do padrão de expressão do repórter primário β geo. O objectivo era escolher as linhas que tivessem um padrão de expressão ubíquo e forte, sem demonstrar alguma alteração da sua expressão num tecido específico.

2.2 - Materiais e métodos

2.2.1 - pZ/EG-DII4

O plasmídeo base da construção do vector pZ/EG-DII4 foi o pCALL2, um vector que permite criar linhas de ratinhos Z/EG (Novak, *et al.*, 2000). As linhas Z/EG são caracterizadas pelo seu sistema de duplo repórter, em que a β -galactosidase (LacZ) e a fosfotransferase de neomicina (que confere resistência a antibióticos aminoglicósidos, como G-418, ao qual as células eucarióticas são sensíveis) actuam como repórteres de integração, e EGFP actua como repórter de ocorrência de recombinação sítio-específica por Cre.

pCALL2 é um vector derivado de pCALL (Lobe, *et al.*, 1999). O vector pCALL contém, de 5' para 3', a sequência enhancer de CMV, o promotor eucariótico da β -actina da galinha, um local loxP, o gene β -geo, que codifica para uma proteína de fusão entre lacZ e a fosfotransferase de neomicina, três locais de poliadenilação provenientes de SV-40, outro local loxP e em seguida o sinal de poliadenilação da β -globina de coelho (Lobe, *et al.*, 1999). Este plasmídeo continha dois potenciais locais crípticos de início de tradução nos locais de clonagem, entre a sequência loxP a 3' e o sinal de poliadenilação da β -globina de coelho. De modo a otimizar a expressão do segundo repórter, esta zona do plasmídeo foi reconstruída criando o pCALL2 (Lobe, *et al.*, 1999). Removeu-se um fragmento de 238pb que continha o local loxP a 3', e os dois ATG. No seu lugar clonou-se um fragmento de 72pb que continha um local loxP e um *polylinker* (MCS) (BglIII, KpnI, XhoI, NotI).

O vector pZ/EG foi criado a partir do pCALL-2 e difere deste por ter a sequência IRES seguida do gene da EGFP (*enhanced green fluorescence protein*), clonados entre o segundo local loxP e o sinal de poliadenilação da β -globina do coelho. A sequência IRES, que tem origem viral, forma uma estrutura secundária que é reconhecida pelos ribossomas, permitindo a ocorrência de dois locais de início da tradução num mesmo ARNm.

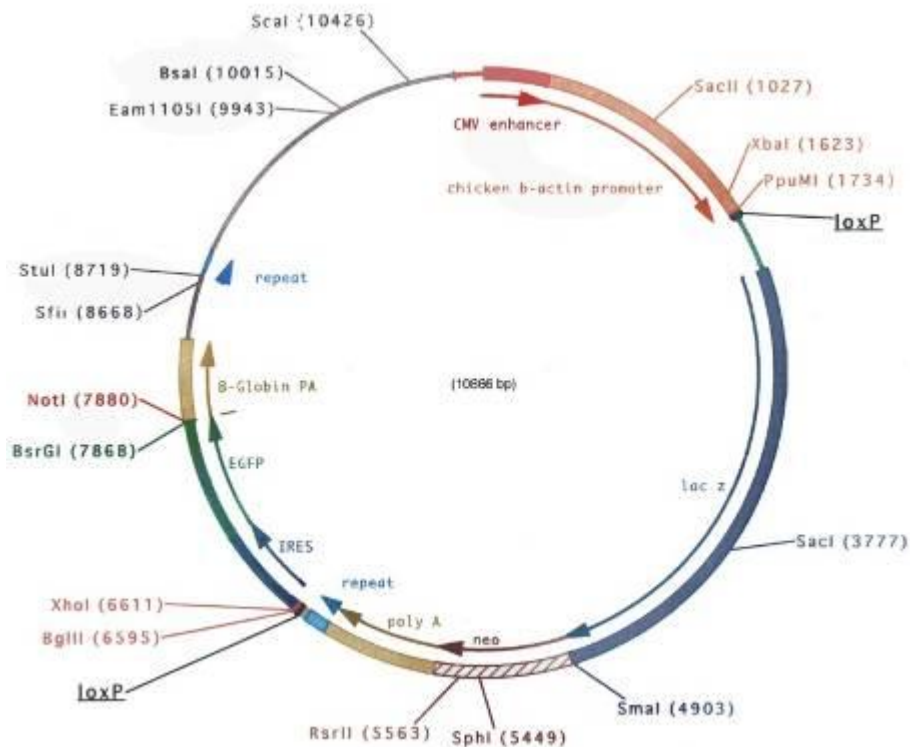


Figura 22 – Representação gráfica do vector pZ/EG.

Foi este o plasmídeo que nos foi cedido pela Dr.^a Corinne G. Lobe, da Universidade de Toronto. Neste plasmídeo foi então clonado o ADNc do *Dll4*, no local *XhoI*. Este vector foi então sequenciado e verificou-se que em caso de excisão do fragmento entre os locais *loxP*, o ATG do ADNc do *Dll4* ficava na grelha de leitura correcta para ser expresso pelo promotor da β -actina, a montante.

Foram realizados dois testes *in vivo*. O primeiro tratou-se de um teste à funcionalidade dos locais *loxP*, em que se recorreu à dupla transformação de bactérias com o vector de transgénese e com um plasmídeo que expressa constitutivamente o gene da recombinase *cre*. A análise electroforética do resultado da extracção de ADN plasmídico dessas bactérias revelou que o vector de transgénese tinha sido linearizado e que se havia libertado um fragmento de tamanho condizente com a excisão do fragmento inter-*loxP*. O segundo foi um teste à funcionalidade do ADNc do *dll4* e da sequência IRES. Este foi realizado pela técnica de electroporação hemilateral do tubo neural, *in ovo*, de embriões de galinha. Este teste revelou que se obtinha um fenótipo na metade do tubo neural que havia sido electroporada (resultante da acção da sobre-expressão de *dll4*) e que nessa metade, simultaneamente, se observava expressão de EGFP.

O funcionamento deste plasmídeo como vector de transgénese condicional baseia-se nas seguintes premissas:

- o gene repórter *β -geo* tem expressão generalizada e constitutiva, devido à presença de um promotor forte e de um *enhancer* viral. Após a electroporação vai servir de controlo positivo, pois só as CEE que o expressem estavelmente vão sobreviver a uma semana de cultura em meio suplementado com G-418. No entanto, este mesmo gene vai servir também de controlo do padrão de expressão do vector in vivo (que se espera seja generalizado). Tal é devido à actividade de β -galactosidase da proteína de fusão.

- na presença de recombinase Cre, o fragmento que contém o gene *β -geo* e os 3 sinais de poliadenilação de SV40, é removido, deixando o ADNc que tenha sido clonado à frente do local loxP sob controlo do promotor da *β -actina*. Como este vector não contém o gene que codifica a recombinase Cre, esta tem de ser expressa num vector secundário. Assim cruzando uma linha Z/EG (transgénica para este vector) com uma linha transgénica para *cre*, em que esta esteja sob o controlo de um promotor específico para um determinado tecido, a descendência que seja duplamente transgénica (DT) tem a excisão do fragmento inter-loxP e expressão do ADNc só nos tecidos em que a *cre* seja expressa.

- enquanto não houver excisão do fragmento inter-LoxP não pode haver expressão do ADNc clonado pois a presença de 3 sinais de poliadenilação a montante actua como um tampão à transcrição.

- a presença de uma sequência IRES entre o ADNc e o gene de *egfp* leva a que a expressão deste segundo repórter seja consequência da expressão do ADNc clonado, embora a tradução seja independente. Assim há a certeza que qualquer tecido em que ocorra expressão de EGFP está a ter expressão do ADNc clonado, sendo assim sinal da ocorrência de recombinação sítio-específica pela Cre. Ao mesmo tempo serve de controlo à actividade da Cre neste sistema. Tal é importante pois sabe-se que a Cre, por não ser um sistema de origem eucariótica, nem sempre tem actividade total nos tecidos em que é expressa. Assim a expressão deste repórter serve também para indicar a extensão da actividade da Cre.

Após a electroporação, este plasmídeo não se integra por recombinação homóloga pois não contém braços de homologia com o genoma do ratinho. O mais frequente é ocorrer integração aleatória no genoma.

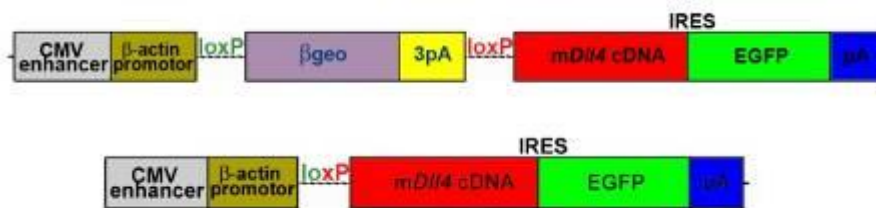


Figura 23 – Esquema do pZ/EG-Dll4, antes de ocorrer recombinação por Cre (topo) e depois de ocorrer recombinação por Cre (baixo).

A produção do vector pZ/EG-Dll4 e execução dos testes funcionais foi executada pelo, à altura, mestrando Jorge Pimenta, antes do início dos trabalhos descritos nesta tese.

2.2.2 - Amplificação e purificação de ADN plasmídico.

2.2.2.1 - Mini-preparações

A extracção de ADN plasmídico em pequena escala foi feita recorrendo ao protocolo do kit comercial Wizard^R Plus SV Minipreps ADN Purification System (Promega #A1460).

A partir de um riscado fresco pica-se metade de uma colónia para um frasco *Greiner* com 3mL de TB suplementado com 3µL de Ampicilina (concentração final de 100µg/µL) (ver Anexo I). Com a outra metade da colónia faz-se um riscado stock. A cultura é incubada com agitação a 37°C durante a noite.

Se for necessário, no dia seguinte retira-se 700µL de cultura para um *ependorf* e adiciona-se 300µL de glicerol 15% e guarda-se a -80°C.

Recolhe-se 1,5mL de cultura e centrifuga-se cinco minutos a 10000rpm numa microcentrífuga. O precipitado de células é ressuspensão, (esta solução contém ARNse para evitar a contaminação da solução final por ARN), e em seguida procede-se à lise alcalina das bactérias (com SDS) e de protease alcalina para degradar endonucleases e outras proteínas em suspensão, e neutralização com um tampão de alto conteúdo salino e pH ácido (5,2). Este último conduz à precipitação do ADN cromossómico assim como das proteínas desnaturadas, mantendo em solução o ADN plasmídico. Tal acontece pois o acetato de sódio 3M (solução de neutralização) tem a capacidade de renaturar o ADN plasmídico mas não o cromossómico, devido ao seu tamanho. A solução é então centrifugada e o sobrenadante é carregado numa coluna, onde passa por uma resina à base de sílica, à qual o ADN adsorve na presença de elevadas concentrações de sais. As proteínas e metabolitos são removidos por lavagens da coluna, o ADN é eluído quando se faz passar uma solução de baixa força iónica pela mesma.

O ADN obtido por este método foi usado para digestões de diagnóstico.

2.2.2.2 - Midi-preparações

A extração de ADN plasmídico em média escala foi feita recorrendo ao protocolo do *kit* comercial Concert™ High purity Plasmid Purification Systems (Gibco BRL # 11451-010).

A partir de uma riscado fresco pica-se uma colónia para 50mL de TB suplementado com 50µL de ampicilina (100µg/µL final), num *erlenmeyer* de 1L. Para garantir o arejamento. A cultura é incubada com agitação a 37°C durante a noite. Normalmente tentou-se assegurar que o tempo de crescimento não passe as 16 horas para evitar a ocorrência de autólise durante a fase estacionária de crescimento, que tem como consequência a contaminação do ADN plasmídico com ADN genómico.

Centrifuga-se a cultura e ressuspende-se o precipitado. Após um processo modificado de lise alcalina, em que a solução de neutralização é responsável pela precipitação dos restos celulares e do ADN genómico, que não é renaturado, deixando o ADN plasmídico renaturado em solução. Após centrifugação o sobrenadante é passado por uma coluna com uma resina aniónica. Em condições salinas moderadas o ADN plasmídico vai aderir à resina (pela interacção entre as cargas negativas dos grupos fosfato do ADN e as cargas positivas da resina). Esta ligação é influenciada pela temperatura, concentração de sais e pH das soluções. Em seguida a coluna é lavada de modo a eluir o ARN, proteínas, glícidos e outras impurezas. O ADN plasmídico é então eluído em condições de elevada concentração de sais. Em seguida o ADN é concentrado e precipitado por isopropanol e depois lavado dos sais com etanol a 70%.

Com este procedimento foi possível obter entre 100 e 500µg de ADN plasmídico de elevada pureza.

A concentração do ADN plasmídico foi medida através dos valores de absorvância a 260nm e 280nm e calculada com base na relação: 1 unidade de absorvância a 260nm corresponde a 50µg de ADN em dupla cadeia por mL de solução. A razão A260/A280 deve ser, no caso de ADN em dupla cadeia, de pelo menos 1,8, indicando uma eficaz remoção de contaminantes (sais e proteínas) durante o processo de purificação.

2.2.3 - Electroforese em géis de agarose

A electroforese em géis de agarose é o método utilizado com maior frequência para separar, identificar e purificar fragmentos de ADN. Esta é uma técnica simples e rápida, em que a localização do ADN num gel pode ser determinada directamente através da marcação, a baixas concentrações, com brometo de etídeo. Este marcador é um agente intercalador com propriedades de fluorescência. Ao incidir luz ultra-violeta sobre ele, emite luz numa gama de comprimentos de onda visíveis (luz azul).

Por acção da passagem de corrente eléctrica, as moléculas de ADN (com carga global negativa) migram na matriz de agarose em direcção ao pólo positivo a uma velocidade inversamente proporcional ao logaritmo decimal do número de pares de base. Assim, a separação das moléculas de ADN é realizada de acordo com o seu peso molecular, variando com a percentagem de agarose presente no gel. Pequenos fragmentos de ADN são facilmente separados em géis de agarose mais concentrados e géis menos concentrados são utilizados na separação de fragmentos de maiores dimensões. Variando a concentração de agarose, forma-se uma matriz mais ou menos fechada, que condiciona a migração dos fragmentos. Adicionalmente, a pureza da agarose é um outro factor que condiciona a resolução das bandas de ADN e a recuperação destas a partir de géis de agarose.

No presente trabalho foram preparados apenas mini-géis de agarose (Seakem^R LE Agarose; Bioproducts #50005) a uma concentração de 0,9% (p/v) em tampão de electroforese TAE 1x (tris-acetato-EDTA), com 0,5µg/µL de brometo de etídeo (Gibco BRL #15585-011).

A migração das amostras de ADN ocorreu a cerca de 86mA. A cada amostra foi adicionada 1/10 do volume total em tampão de amostra 10x concentrado, que contém glicerol para aumentar a densidade da amostra, evitando que esta saia do poço; e azul de bromofenol como indicador de migração; antes da aplicação no gel.

2.2.4 - Precipitação de ADN com etanol

Adiciona-se 1/10 do volume total de acetato de sódio 3M, pH 5,2 e 2,5 volumes em etanol absoluto. Em seguida incuba-se a solução a -80°C durante uma hora e depois centrifuga-se a 15000g numa microcentrífuga durante 30 minutos. Remove-se o sobrenadante com cuidado, não tocando no precipitado e adiciona-se 1 mL de etanol a 70% (v/v).

Centrifuga-se a 13000rpm numa microcentrífuga durante três minutos e ressuspende-se em água bi-destilada ou Tampão TE.

2.2.5 - Digestão de ADN plasmídico com endonuclease de restrição

A quantidade de enzima usada depende da quantidade de ADN que se pretende digerir. Normalmente usaram-se 10U de enzima de restrição por cada 1µg de ADN a digerir, segundo indicações do fabricante, tal era necessário para garantir que a restrição decorria normalmente. Menores quantidades de enzima levavam demasiado tempo a digerir completamente a amostra. Sabendo que a mistura de digestão não pode ter mais do que 10% em solução da enzima de restrição, decide-se então qual seria o volume final da mistura de digestão. Adiciona-se 1/10 desse volume em tampão de restrição 10X (específico da enzima), segundo indicação do fabricante. O resto volume é completo com adição de água desionizada.



Figura 24 – Resultado de uma electroforese a 0,9% de agarose do resultado da digestão com SfiI de ADN de pZ/EG-DII4 (cerca de 13,4kb); a) Kilobase ADN Marker; b) pZ/EG-DII4 digerido com SfiI; c) pZ/EG-DII4 não digerido.

2.2.6 - Material biológico:

2.2.6.1 - Estirpes bacterianas usadas:

- *Escherichia coli*, estirpe **DH5α**. Esta estirpe tem os seguintes marcadores genéticos: F⁻, φ80d, lacZΔM15, deoR, recA1, endA1, hsdR17 (r_k⁻m_k⁺), supE44, thi-1, gyrA96, relA, Δ(lacZY A-argF), U169, phoA, λ⁻.

Destes marcadores há a assinalar:

- *deoR*, uma mutação num gene regulatório que permite a expressão constitutiva de genes do metabolismo da desoxirribose. Possibilita a replicação de plasmídeos de grande dimensão.

- *recA1*, uma mutação que evita a ocorrência de recombinação homóloga do ADN plasmídico com o ADN genómico.

- *endA1*, uma deleção da desoxirriboendonuclease I, permite uma maior estabilidade do ADN plasmídico estranho.

- *hsdR17* ($r_k^- m_k^+$), não possui o sistema de restrição codificado por este alelo. Tal permite que o ADN exógeno que entre na célula não seja degradado, antes de ser metilado.

2.2.6.2 - Material de origem animal:

- **Células estaminais embrionárias da linha R1:** A cultura primária de CEE da linha R1 foi estabelecida em Agosto de 1991 no laboratório do Doutor Andras Nagy em Toronto, no *Mount Sinai Hospital*. As CEE da linha R1 são derivadas de um cruzamento F1 entre sub-estirpes consanguíneas 129/Sv e 129/Sv-CP. A cultura primária foi isolada do epiblasto de um blastocisto com 3,5dpc, de sexo masculino. A pluripotência das células R1 foi testada por agregação com embriões tetraplóides (o embrião resultante é completamente derivado das células R1; (Nagy, *et al.*, 1993)), agregação com embriões diplóides (o embrião resultante é uma quimera; (Wood, *et al.*, 1993)) e por injeção de células R1 no blastocélio de blastocistos. Os embriões gerados por estes métodos, que completavam o ciclo de desenvolvimento embrionário, davam origem a ratinhos que atingiam a idade adulta e eram férteis. Este facto foi, no entanto, ajudado pelo baixo número de passagem da linha R1 à data, especialmente nos resultados das agregações com embriões tetraplóides.

As CEE da linha R1 são derivadas de ratinhos com pelagem *agouti*. O gene que condiciona a ocorrência de pelagem *agouti* tem dois alelos, o dominante é responsável por uma cor preta na pelagem enquanto o recessivo é responsável por uma cor castanha escura. A presença de alelos de outros genes, que também controlam a cor da pelagem, pode conduzir a outros tons de pelagem, que são no entanto facilmente distinguíveis da pelagem albina. Quando se fazem agregações de células R1 com mórulas de ratinhos CD1, as crias que nascem podem ter zonas com pelo de duas cores possíveis, que reflectem o seu genótipo e a contribuição da linha R1 para o referido organismo:

-Branco = CD1
-Agouti=R1



Figura 25 – Comparação de cor de pelagem. a) Fêmeas CD1 com ninhada; b) ninhada com pelagem Agouti, note-se a variedade de tons.

A percentagem do corpo que estiver coberta por pelagem *agouti* numa quimera reflecte geralmente a percentagem de contribuição da linha R1 para esse organismo. Obtêm-se desde quimeras só com uma mancha *agouti* em todo o corpo até animais com pelagem totalmente *agouti*. Esta combinação R1-CD1 permite a determinação da ocorrência de contribuição das CEE para a formação do organismo logo no dia de nascimento, pois os olhos escuros são visíveis através das pálpebras fechadas. Uma quimera, por mais fraca que seja a contribuição das CEE, tem sempre olhos escuros.

As colónias de CEE costumam ter um aspecto brilhante e contornos regulares, crescem normalmente em aderência a uma camada de células “*feeders*” (cultura primária de fibroblastos embrionários) ou a uma camada de gelatina. A partir de uma suspensão de células individualizadas, plaqueada, as células crescem como colónias de origem clonal. Estas colónias têm uma forma de cúpula e aspecto brilhante no microscópio invertido. Quando uma cultura (ou colónia) começa a diferenciar-se, tal é visível no facto de as colónias ficarem achatadas e escuras, com rebordos irregulares e opacos.

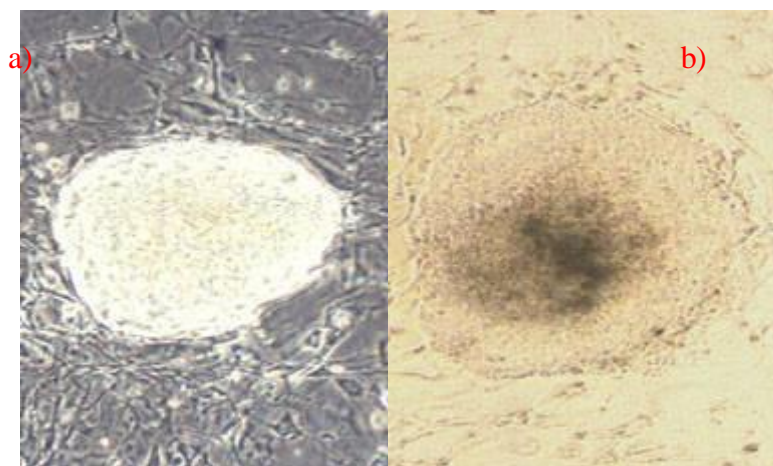


Figura 26 - a) aspecto normal de uma colónia de CEE a crescer sobre PEFs, rebordo definido e aspecto brilhante; b) aspecto de uma colónia de CEE diferenciada. Note-se o centro necrótico, rebordos não definido e aspecto opaco.

2.2.7 – Cultura, manutenção e manuseamento de fibroblastos

2.2.7.1 - Preparação de stocks de culturas primárias de fibroblastos embrionários

Faz-se a dissecação de embriões de 14 a 15 dpc, em PBS. Remove-se a cabeça e órgãos internos. Em seguida colocam-se os embriões em tubos de polipropileno estéreis com 50mL de PBS para remover as células sanguíneas. Repete-se este processo 2 vezes. Em seguida trituram-se muito finamente as carcassas num pequeno volume de PBS, com o auxílio de dois bisturis, até o embrião ficar homogenizado. Faz-se passar o embrião triturado por uma peneira metálica de poro fino, de modo a ficar com uma suspensão de células e agregados de pequena dimensão, e transfere-se essa suspensão para um *erlenmeyer* com pérolas de vidro esterilizadas. Força-se a desagregação do resto dos agregados, fazendo passar 50mL de uma solução 0,05% de Tripsina/EDTA (Gibco BRL 25200-056) pela peneira. No caso de a solução ficar viscosa, devido à libertação de ADN de células lisados pelo proceso, adiciona-se 50µl de uma solução de ADNase (Sigma D4138) com 10mg/mL, e deixa-se actuar durante um minuto. Incuba-se a 37°C, com agitação, durante 30 minutos. Em seguida adiciona-se mais 50mL de uma solução 0,05% de Tripsina/EDTA e agita-se por mais 30 minutos. Este passo é repetido duas vezes. No fim deste tempo decanta-se a suspensão celular para tubos de centrifugação e centrifuga-se a 200g durante 5 minutos. Lava-se o *pellet* celular duas vezes, com 5mL de PBS de cada vez. Se a solução se encontrar viscosa deve-se adicionar 50µl de uma solução com 10mg/mL de ADNase. Ressuspendem-se as células em 4mL de meio de cultura de fibroblastos (ver Anexo I) e avalia-se a concentração de células viáveis nucleadas. A concentração normal que se obteve foi de cerca de 5×10^7 células/mL. Plaqueia-se 5×10^6 células por frasco de cultura T75 com 20mL de meio para fibroblastos.

2.2.7.2 - Tratamento das culturas primárias de fibroblastos embrionários com mitomicina-C

A mitomicina-C é um inibidor mitótico, a sua função é impedir que a cultura de fibroblastos cresça, não competindo assim com a cultura de CEE pelos nutrientes. Deste modo a cultura permanece activa metabólicamente, continuando a produzir os factores de

crescimento auxiliares ao crescimento e manutenção do estado indiferenciado das CEE, mas não ocorre multiplicação celular de fibroblastos. À cultura primária de fibroblastos embrionários mitoticamente inativados dá-se o nome de “*feeders*”.

Começa-se por aspirar o meio de fibroblastos do frasco T75. Adiciona-se 100µL de mitomicina-C (Sigma M0503) a 10mL de meio de fibroblastos e coloca-se essa solução no frasco. Deixa-se incubar durante 2:30h. Em seguida remove-se o meio com mitomicina e lavam-se as células, três vezes, com 10mL de PBS. Em seguida tripsiniza-se a cultura (2mL de tripsina/EDTA 0,1%, cinco minutos na estufa a 37°C), adiciona-se meio de cultura de fibroblastos para inactivar a tripsina, e centrifuga-se a 200g durante cinco minutos. Ressuspende-se o pellet de células em 5mL de meio de fibroblastos e passam-se as células 1:5. No dia seguinte muda-se o meio de cultura e ao fim de dois a três dias passam-se as células 1:5, para placas de 10cm. Quando estas placas se encontrarem confluentes são congeladas. Cada placa de 10cm contém células para um criotubo, que é guardado a -180°C. O processo de congelamento é idêntico ao referido para as culturas de CEE (Capítulo 2.2.9.6).

2.2.7.3 - Descongelação e passagem das ampolas de fibroblastos embrionários tratados com mitomicina.

Descongela-se o criotubo em banho-maria a 37°C, é importante que a descongelação seja efectuada rapidamente, para evitar a formação de cristais de gelo durante a passagem por temperaturas críticas. Aspira-se o conteúdo com uma pipeta com 5mL de meio de cultura de fibroblastos e coloca-se o conteúdo num tubo de centrifugação. Adiciona-se 1mL de meio ao mesmo criotubo, para ressuspender as células que sobrem, e pipeta-se esse 1mL para o mesmo tubo de centrifugação. Centrifuga-se o criotubo a 200g durante cinco minutos e ressuspende-se o pellet em 30mL de meio de fibroblastos. Este volume é então distribuído por placas conforme a necessidade:

- cada placa de 10cm leva 5mL da suspensão + 5mL de meio de PEFs.
- cada placa de 60mm leva 2,5mL da suspensão + 2,5mL de meio de PEFs.

2.2.8 - Preparação de placas gelatinizadas

Para preparar placas cobertas por gelatina cobre-se a superfície da placa com uma solução de gelatina a 0,1% (p/v), (Sigma #G1890), (aproximadamente 100µL por poço de

placa de 96 poços, 3mL por placa de 60mm e 5mL por placa de 10cm). Deixam-se as placas na posição horizontal por dois minutos. Em seguida aspira-se o excesso e colocam-se as placas numa posição inclinada para que escorra o excesso. Deixam-se as placas secar durante dois a quatro minutos. Adiciona-se meio fresco às placas e estas são colocadas na estufa.

2.2.9 – Cultura, manutenção e manuseamento de Células Estaminais Embrionárias

As CEE podem ser mantidas num estado indiferenciado se forem colocadas em cultura em placas cobertas por uma camada de células *feeders* (cultura primária de fibroblastos embrionários mitoticamente inactivados) ou em placas gelatinizadas, desde que se adicione ao meio (ver Anexo I) o *factor inibitório da leucemia* (LIF) (Smith, *et al.*, 1988, Williams, *et al.*, 1988).

2.2.9.1 - Descongelção de células estaminais embrionárias

É importante que as células descongelem o mais rapidamente possível. Imediatamente após o criotubo (ou placa de 96 poços) ser removido do congelador, é colocado num banho-maria a 37°C. Permanece aí durante um a três minutos, até que descongele completamente.

- **Placa de 96 poços:** começa-se removendo o óleo mineral de cima da cultura celular. Tal tem de ser feito com cuidado para evitar percas importantes de conteúdo celular nos poços. Usando um pipetador multicanal ressuspendem-se as células no meio que as cobre. Em seguida pipeta-se o conteúdo de cada poço, na caixa de 96 poços, para um poço numa caixa de 24 poços com *feeders* e meio fresco aquecido. Depois coloca-se 200µL de meio em cada poço da caixa de 96 poços e lava-se bem o poço de modo a recuperar quaisquer células que aí tenham permanecido. Em seguida transferem-se esses 200µL de cada poço para os respectivos poços na caixa de 24 poços. As caixas de 24 poços são então colocadas na incubadora a 37°C e 5%CO₂.

-**Criotubo:** transfere-se o conteúdo de um criotubo para uma pipeta de 5mL com 5mL de meio de cultura pré-aquecido. Despeja-se o conteúdo num tubo de centrifugação. Em seguida pipetam-se 1mL de meio para o criotubo e tenta-se ressuspender as células que não tenham sido removidas ainda. Despeja-se o conteúdo da pipeta no mesmo tubo de centrifugação. Centrifugam-se as células a 200g durante cinco minutos à temperatura ambiente. Finda a centrifugação remove-se o meio e ressuspendem-se as células em meio fresco, pipetando gentilmente até as células se dissociarem. Em seguida plaqueia-se essa

suspensão numa placa de 60mm com *feeders* e coloca-se na incubadora a 37°C, 5% de CO₂. Ao fim de oito horas, ou na manhã seguinte (se o descongelamento for feito ao fim da tarde) muda-se o meio e verifica-se se as células estão a aderir à camada de *feeders* e se a sua morfologia é a correcta. Esta mudança de meio serve também para remover células mortas, que não tenham sobrevivido ao processo de descongelamento e que por isso se mantenham em solução (não aderem à camada de *feeders*). Quando as células atingirem aproximadamente 70% de confluência, cerca de dois dias depois do descongelamento, devem de ser passadas 1:5 ou 1:7 consoante o estado de confluência.

2.2.9.2 - Passagem de células estaminais embrionárias

Optimamente deve-se mudar o meio de cultura todos os dias e efectuar passagens das células de dois em dois dias (quando se atinge cerca de 70% de confluência). É importante não deixá-las crescer demasiado pois tal pode induzir a sua diferenciação.

Primeiro aspira-se o meio e fazem-se duas lavagens com PBS. Aspira-se todo o PBS e adiciona-se quantidade suficiente de tripsina 0,1% (tripsina-EDTA: Gibco BRL #25200-056) que dê para cobrir o fundo da respectiva placa. Para placas de 10cm usam-se 2,5mL de tripsina 0,1%. Coloca-se a placa na incubadora a 37°C durante três a seis minutos, para que a tripsina actue. A tripsina é uma protease e a sua acção sobre as proteínas extracelulares de adesão e componentes da matriz são responsáveis pela individualização celular que se procura com este tratamento. Esta individualização celular é muito importante pois se ficarem agregados celulares, estes vão crescer como agregados em que começam a haver centros necróticos e zonas de diferenciação à periferia (notam-se pelo facto de os rebordos do agregado perderem o brilho). Ao longo desse tempo vai-se observando as células num microscópio invertido, de modo a que se vá verificando o momento em que as células se vão soltando do fundo e entre si. Nesse momento adiciona-se 5ml de meio de cultura para parar a reacção. O soro fetal bovino é o principal responsável da inibição da actividade da tripsina, actuando quer por inibição pelo produto final como por diluição da enzima. Em seguida as células são ressuspensas e transferidas para um tubo de centrifugação. As células são centrifugadas a 200g durante cinco minutos à temperatura ambiente e depois remove-se o sobrenadante (meio) e ressuspendem-se as células em 5mL de meio de cultura, pipetando gentilmente. Este passo é complementar da acção da tripsina pois também tem por objectivo separar os poucos agregados celulares que restem. Em seguida a suspensão celular é dividida

1:5 ou 1:7 e plaqueada em novas placas preparadas previamente com *feeders* ou gelatina e já com meio fresco pré-aquecido.

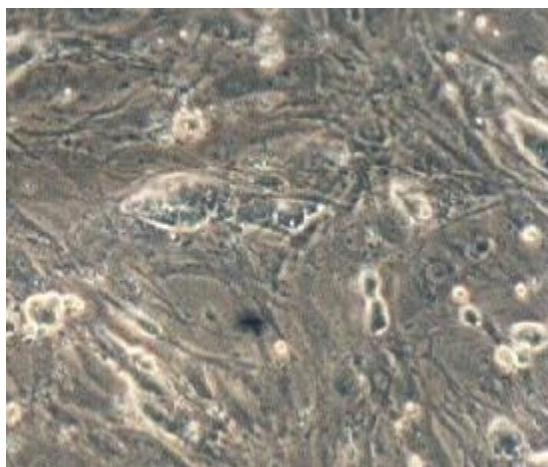


Figura 27 - Fotografia de uma cultura de CEE, a crescer em PEFs, com cerca de 40% de confluência. Ampliação 40x.

2.2.9.3 - Electroporação de células estaminais embrionárias

O método mais comum de criar CEE geneticamente modificadas é introduzir ADN exógeno nas células por electroporação e subsequentemente seleccionar a integração no genoma. Usualmente a selecção é baseada num gene de resistência a um antibiótico, que está presente no vector usado. Os marcadores de selecção mais comuns são a fosfotransferase de neomicina, puromicina e higromicina. No caso deste estudo o marcador usado foi a fosfotransferase de neomicina (que confere resistência a G-418) e o tempo de selecção necessário para este é de sete a oito dias.

O vector de transfecção tem de ser linearizado antes da electroporação, tal facilita a entrada do mesmo nas células e sua subsequente integração no genoma.

O ADN é obtido por protocolo de midi-preparações e em seguida é estimada a quantidade de ADN recolhido, por espectrofotometria. O ADN é digerido com uma enzima de restrição com local único de reconhecimento no vector. Em seguida o ADN é precipitado por etanol e o precipitado é ressuspendido em TE estéril. A quantidade de TE usado deve ser ajustada de modo a dar uma solução de cerca de 1µg/µl de ADN.

As células são passadas dois dias antes da electroporação e estão prontas para o processo quando a sua confluência for de cerca de 80%. Uma placa de 10cm neste estado de confluência deve providenciar células suficientes para uma a duas electroporações. As células são tripsinizadas e em seguida centrifugadas a 200g durante cinco minutos. O pellet de células

é ressuspendido em 3,5mL de PBS frio. Neste momento determina-se a densidade celular através do uso de um hemacitómetro. Para tal adiciona-se 5µL de suspensão celular a 95µL de PBS e coloca-se a suspensão na zona de contagem do hemacitómetro (câmara de Neubauer). Conta-se o número de células nos quatro grandes quadrados dos cantos. Faz-se a média de células por quadrado e multiplica-se esse número por 20, que é o factor de diluição, e por 10^4 . O valor 10^4 provém do facto de cada quadrado em que se fez contagem ter 1mm^2 e 0,1mm de altura, tal equivale a $0,1\text{mm}^3$, o que é equivalente a 0,1µL. Este valor é equivalente a 10^{-4} mL, que é a unidade de volume usada. A fórmula usada é a seguinte:

$$\text{partículas por mL} = \frac{\text{numero de partículas contadas}}{\text{superfície contada (mm}^2\text{)} \times \text{profundidade da camara(mm)} \times \text{diluição}}$$

Para se obter o valor pretendido multiplica-se a média de células por quadrado pelo inverso do factor de volume (10^4) e pelo inverso do factor de diluição (20). O valor resultante é a concentração celular da suspensão original em células/mL. Em seguida ajusta-se o volume de PBS de modo a que se obtenha uma concentração de cerca de 7×10^6 células/mL (se possível).

Para cada mistura de electroporação adiciona-se entre 10 a 30µg de ADN (para um vector de cerca de 10kb) para um volume final de 800µL de suspensão de electroporação numa cuvete de electroporação (BioRad, #165-2088). Ajustam-se as condições do electroporador (BioRad GenePulser) a 250µV e 500µF. Em seguida colocam-se as cuvetes no suporte apropriado e faz-se a descarga eléctrica. As cuvetes são imediatamente colocadas no gelo, onde permanecem durante 30 minutos. No fim desse tempo o conteúdo de cada cuvete é plaqueado numa placa de 10 cm com gelatina. Nestas situações o meio deve ser mudado todos os dias e a selecção começa dois dias após a electroporação. A partir desse momento o meio de cultura passa a ser suplementado com G-418 (150µg/mL final) (Gibco BRL #11811-031). O processo de selecção dura entre sete a oito dias, até que as colónias tenham um tamanho suficiente para serem picadas.

2.2.9.4 – Selecção de colónias

Este procedimento é efectuado colocando uma lupa de dissecação dentro da câmara de fluxo laminar. As colónias de CEE estão prontas para serem picadas se forem grandes e bem isoladas (não diferenciadas e com morfologia típica). Começa-se por aspirar o meio e adicionar 10mL de PBS. No fim da lavagem deixa-se ficar um pouco de PBS no fundo (cerca de 1mm), de modo a ficar o fundo húmido.

Usando uma micropipeta Gilson P20 com 20µL de PBS, descarrega-se cerca de metade desse volume sobre uma colónia, lavando-a, e usa-se o resto para aspirar a colónia para a ponta da pipeta. A pipeta deve ser colocada com uma inclinação de 45° em relação à superfície da placa, para facilitar o levantar da colónia. O conteúdo da ponta da pipeta é então transferido para um poço de uma placa de 96 poços com fundo em V, contendo 50µL de tripsina. Neste passo convém pipetar a solução do poço com cuidado, com o objectivo de facilitar a dissolução da colónia. Este processo é repetido para todas as colónias que estejam em condições de serem picadas nesse dia. Quando todas as colónias tiverem sido picadas e transferidas para a tripsina, a placa de 96 poços em V é colocada na incubadora a 37°C, 5% de CO₂ durante cinco a dez minutos. No fim desse tempo usa-se um pipetador multicanal para transferir as suspensões celulares com tripsina para uma nova placa de 96 poços com fundo gelatinizado e 150µL de meio de cultura pré-aquecido. Neste passo também é importante pipetar várias vezes a suspensão de modo a promover a formação de uma suspensão de células isoladas. Em seguida a placa é colocada na incubadora a 37°C, 5% de CO₂. O meio é mudado diariamente e as células passadas para novas placas quando houver 80% de confluência na maioria dos poços.

2.2.9.5 - Passagem das CEE em placas de 96 poços.

Em condições óptimas, três ou quatro dias após a picagem das colónias as células devem encontrar-se à densidade óptima para serem passadas. Como as células em diferentes poços podem exibir um diferente potencial de crescimento, normalmente o crescimento dos diferentes clones será assíncrono. A melhor opção deverá ser determinar o momento de passagem quando a maioria dos poços se encontrar com cerca de 80 a 90% de confluência. Uma alternativa é ir passando os clones individualmente quando estes atingirem o nível óptimo para passagem.

Começa-se aspirando o meio dos poços, usando um aspirador multicanal. Em seguida lavam-se as células com 200µL de PBS em cada poço. Remove-se todo o PBS e adiciona-se 50µL de tripsina por poço. A placa é colocada na incubadora a 37°C e ao fim de cinco minutos são dadas pancadinhas laterais na placa para promover o soltar das células. Para parar a acção da tripsina adiciona-se 50µL de meio de cultura a cada poço e pipeta-se cinco vezes para garantir que as células ficam totalmente ressuspendidas. Neste momento as células são passadas 1:2 ou 1:3, uma placa permanece em cultura e a(s) outra(s) são congelada(s) para *stock*, a extracção de ADN ou genotipificação por coloração com X-Gal. No fim do processo as placas (ou a placa) regressam à incubadora a 37°C, 5% de CO₂.

2.2.9.6 - Congelação de células estaminais embrionárias

Normalmente as CEE são congeladas em criotubos com uma densidade de 5-10x10⁶células/mL de meio de congelamento. Uma placa de 10cm com cerca de 70% de confluência dá normalmente células suficientes para três criotubos, cada um com 1 mL de células, e uma placa de 60mm nas mesmas condições dá origem a um criotubo com 1 mL de células.

É importante que as células sejam congeladas gradualmente (dentro de uma caixa de esferovite) e não devem de ser guardadas a -70°C durante muito tempo. Os criotubos devem de ser guardados em azoto líquido para armazenamento a longo prazo. Como as placas de 96 poços não podem ser guardadas em azoto líquido, não é recomendado guardá-las a -70°C por mais de dois meses.

- **congelação em criotubos** (exemplo de uma placa de 10cm a 70% de confluência): entre duas a três horas antes do congelamento, muda-se o meio de cultura. Após este tempo as células são tripsinizadas e pára-se a acção da tripsina com a adição de 2mL de meio de cultura fresco. As células são ressuspendidas nesse meio e pipetam-se as células para um tubo de centrifugação com 8mL de meio. Centrifuga-se a 200g durante cinco minutos à temperatura ambiente e em seguida remove-se o sobrenadante e ressuspende-se o pellet de células em 1,5mL de meio de cultura. Neste passo é importante deixar a suspensão celular bem individualizada. Em seguida adiciona-se 1,5mL de meio de congelamento 2x concentrado (ver anexo I), feito fresco no dia, e mistura-se bem, pipetando. Aliquota-se a suspensão rapidamente, pipetando 1mL para cada um de três criotubos. Os criotubos são colocados no congelador a -80°C, dentro de uma caixa de esferovite, para congelarem rapidamente. No caso

de objectivo ser a congelação a longo prazo, ao fim de dois dias os criotubos devem ser transferidos para um contentor de azoto líquido.

- **congelação de placas de 96 poços:** entre duas a três horas antes do congelamento, muda-se o meio de cultura. Em seguida aspira-se o meio e lavam-se as células com 200µL de PBS. Remove-se o PBS e adiciona-se 50µL de tripsina a cada poço. Coloca-se a placa na incubadora a 37°C, 5% de CO₂ durante cinco minutos. Em seguida adiciona-se 50µL de meio de cultura a cada poço, para parar a reacção, pipeta-se várias vezes até se obter uma suspensão homogénea. Depois adiciona-se 100µL de meio de congelação 2x concentrado (ver Anexo I), feito fresco no dia a cada poço e pipeta-se várias vezes para misturar bem. Neste momento adiciona-se 100µL de óleo mineral (Sigma #M-8410) de modo a cobrir a suspensão de células. As placas são envoltas em parafilme e colocadas num congelador a -80°C, dentro de uma caixa de esferovite até que os clones desejados, que já haviam sido seleccionados, precisem de ser recuperados.

2.2.9.7 - Preparação de células estaminais embrionárias para a agregação

As linhas de CEE a serem usadas para formarem quimeras por agregação devem ser mantidas em condições óptimas de crescimento. As células devem ser passadas pelo menos uma vez depois de descongeladas (de preferência para placas gelatinizadas), antes de serem usadas em agregações. O objectivo é produzir agregados de oito a quinze células, não muito compactas, mesmo antes das agregações.

Quatro dias antes das agregações descongelam-se CEE para placas de *feeders*. Dois dias depois tripsiniza-se a placa, de modo a obter-se uma suspensão de células isoladas. Pára-se a acção da tripsina adicionando 5mL de meio de cultura, transfere-se o conteúdo da placa para um tubo de centrífuga e centrifuga-se a 200g durante cinco minutos. Em seguida ressuspende-se as células em meio fresco e passam-se as células 1:50, 1:25, 1:20 e 1:5. No dia da agregação, após a preparação dos embriões, escolhe-se qual das diferentes diluições produziu placas com as condições acima descritas. A essas placas, remove-se o meio e lava-se com PBS. Adiciona-se o volume necessário de tripsina (0,3mL em placas de 3,5cm e 0,5mL em placas de 6cm) às placas de CEE. Deixa-se actuar a tripsina durante três minutos e vai-se agitando a placa enquanto se observa os agregados a soltarem-se do fundo. Nesse momento adiciona-se 5mL de meio (placa de 6cm) ou 3mL de meio (placa de 3,5cm) e não se pipeta. O

objectivo é manter os agregados coesos. As placas são guardadas à temperatura ambiente, na câmara de fluxo laminar e não na incubadora (pois senão ficavam pegajosas e impossíveis de agregar) e são usadas até uma ou duas horas após este passo.

2.2.10 - Superovulação de fêmeas CD1

Para se obterem grandes números de embriões em fase de pré-implantação, as fêmeas são injectadas com gonadotrofinas antes do acasalamento. O sucesso da indução da superovulação depende de múltiplas variáveis, incluindo a idade, peso, estirpe da fêmea e as horas a que se dão as injeções.

A melhor idade para serem superovuladas é entre as cinco e as sete semanas, o que corresponde a um peso entre 20 a 30g.

O momento da administração das gonadotrofinas é relativo ao ciclo de luz do biotério.

Cinco dias antes da recolha dos embriões, injectam-se as fêmeas CD1 com 5 a 10U de PMSG (*pregnant mare serum gonadotrophin* – que tem função de *hormona estimuladora do folículo* - FSH) (Sigma G4877). A injeção é administrada intraperitonealmente entre as 11 e as 12h. É importante que todas as fêmeas sejam injectadas o mais rapidamente possível de modo a deixá-las com o ciclo éstrico sincronizado.

Dois dias depois, portanto 3 dias antes da recolha, as fêmeas CD1 são injectadas com 5-10U de hCG (*human chorionic gonadotrophin* – que tem actividade de *hormona luteinizante*) (Sigma CG10-IVL). A injeção é administrada intraperitonealmente por volta das 10h. Neste passo a escolha da hora é essencial, a injeção de hCG deve ser feita antes do pico de libertação de LH, que ocorre cerca de 15 a 20 horas após o meio do segundo período nocturno que se segue à injeção de PMSG.

No nosso biotério o ciclo nocturno vai das 17.00h até às 05.00h, logo o meio da noite é às 23.00h. Assim o pico de libertação de LH deve ocorrer entre as 14.00 e as 19.00h deste dia. A ovulação ocorre cerca de 10 a 13h após a injeção de hCG.

A seguir à injeção de hCG as fêmeas são colocadas com machos CD1, normalmente uma fêmea por macho. Na manhã seguinte verifica-se a presença de um rolhão vaginal nas fêmeas cruzadas. Este é resultado da coagulação dos fluidos seminais na vagina, sendo por isso sinal da ocorrência de cópula. A cópula ocorre normalmente a meio do período nocturno. As fêmeas positivas são isoladas e devidamente etiquetadas, até ao dia da recolha dos embriões, dois dias depois.

O historial reprodutivo dos machos reprodutores deve ser anotado, machos que não copulem em três sessões consecutivas devem ser substituídos por machos mais jovens.

O objectivo deste passo é, além da obtenção de um maior número de embriões, a sincronização do ciclo éstrico das fêmeas. As fêmeas ratinho têm um ciclo éstrico que dura quatro dias. Se não se executasse este passo só se obteriam, em média, 25% de fêmeas com rolhões vaginais. Ou seja, só $\frac{1}{4}$ das fêmeas cruzadas ficariam gestantes. Deste modo conseguem-se obter frequências mais elevadas de sucesso.

As fêmeas superovuladas que não copularem são isoladas durante cerca de três meses, até voltarem a ter o ciclo éstrico regularizado. No entanto, já não podem voltar a ser superovuladas. Estas são normalmente usadas como receptoras a partir do fim deste período.

2.2.11 - Obtenção de fêmeas pseudo-gestantes, receptoras de embriões agregados.

As fêmeas de ratinho são ovuladoras espontâneas e podem tornar-se pseudo-gestantes se forem cruzadas com machos estéreis, vasectomizados, durante o estro. Nessas condições elas apresentam o perfil hormonal de uma fêmea gestante. A transferência de embriões no momento apropriado vai providenciar o sinal embrionário que leva à manutenção do corpo lúteo, prevenindo o retorno ao ciclo éstrico e permitindo a implantação dos embriões. Três dias antes das transferências, cruzam-se fêmeas CD1 com machos vasectomizados. Colocam-se normalmente três fêmeas por macho em caixa individualizada. Como as fêmeas não foram sincronizadas, o número de fêmeas usadas vai ser de cinco a dez vezes o número de fêmeas receptoras que se pretende obter. Em teoria $\frac{1}{4}$ das fêmeas deveria ter rolhão vaginal na manhã seguinte, no entanto na realidade verifica-se que este valor é muito mais baixo. Por vezes chegaram a ser colocadas até 15 vezes mais fêmeas com machos vasectomizados que o número de fêmeas receptoras que se pretendia obter.

Na manhã seguinte procura-se a presença do rolhão vaginal, sinal da ocorrência de cópula. Neste caso não podem haver dúvidas, só são consideradas positivas as fêmeas com rolhão evidente. Isto é muito importante pois a transferência de embriões para uma fêmea que não esteja num estado de pseudo-gestação resulta em perda total dos embriões. As fêmeas positivas são isoladas e guardadas até ao dia das transferências (dois dias depois).

2.2.12 - Recolha de embriões no estágio de oito células

As recolhas de embriões, por lavagem de oviduto, são executadas na manhã do dia em que se fazem as agregações. Nessa altura têm cerca de 2,5 dpc e encontram-se numa fase avançada da clivagem, na sua maioria tendo oito células.

As fêmeas superovuladas são sacrificadas por deslocação cervical. Faz-se uma incisão ventral na pele e em seguida puxa-se a pele para cima, até ao peito. Faz-se um corte transversal no peritoneu e expõe-se a cavidade abdominal. Faz-se a dissecação do oviduto, cortando a sua ligação ao útero e ao ovário e coloca-se uma gota de meio M2 (Sigma #M7167) numa placa de Petri. O meio M2 contém tampão HEPES, o que permite a manuseamento dos embriões fora de uma estufa de CO₂, sem que o pH seja alterado por isso. Repete-se o processo para o outro oviduto. Com o auxílio da lupa de dissecação localiza-se o *infundibulum* do oviduto e insere-se uma agulha de 30g com a ponta cortada e ligeiramente boleada para não rasgar o *infundibulum*, ligada a uma seringa de 1mL com 0,5mL de M2. Usa-se uma pinça de pontas finas para segurar a agulha dentro do *infundibulum*. Injecta-se 0,5mL de meio M2 no oviduto. Convém ir confirmando que realmente o meio M2 está a atravessar o oviduto e que não está a haver uma fuga de meio por um buraco logo à entrada, por vezes causado pela própria agulha. Vai-se verificando se o oviduto aumenta de volume quando se injecta nele o meio M2. Repete-se o processo para o outro oviduto. Em seguida usa-se a pipeta de boca, (Sigma #A-5177), ligada a uma ponta de pipeta de Pasteur de vidro que foi alongada à chama, para recolher os embriões e lavá-los em sucessivas gotas de meio M2, de modo a retirar alguns detritos que ainda estejam agarrados aos embriões. Depois os embriões são lavados em meio KSOM (ver Anexo I) e seguidamente transferidos para gotas de meio KSOM colocadas em placas de cultura e cobertas por óleo mineral (Sigma #M-8410). Estas placas são então colocadas na incubadora a 37°C, 5% de CO₂.

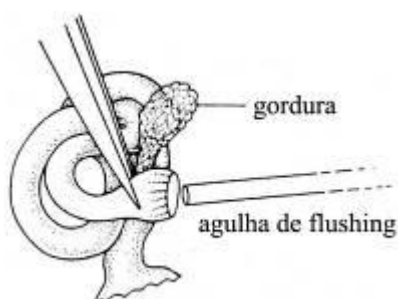


Figura 28 – Esquema de um oviduto. Representação de como se executa uma lavagem de oviduto. Adaptado de (Hogan, *et al.*, 1994).

2.2.13 - Agregação de células estaminais embrionárias com embriões no estágio de oito células.

2.2.13.1 - Preparação das placas de agregação

A placa de agregação é onde ocorre a formação, e cultura durante a noite, dos agregados.

Colocam-se quatro filas de gotas de 30 μ L de meio KSOM numa placa de cultura de 35mm. Colocam-se três gotas na primeira e quarta fila e cinco gotas na segunda e terceira filas. As gotas são cobertas com óleo mineral. Antes de ser usada, a agulha de agregação é lavada com etanol a 70% (v/v) e deixada secar ao ar. A agulha de agregação é usada para criar uma série de depressões na placa de cultura por debaixo das gotas de KSOM da

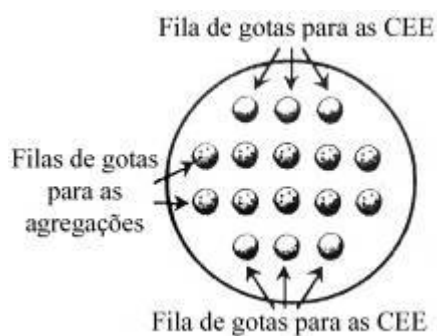


Figura 29 - Esquema de uma placa de agregações. Adaptado de (Dymecki, 2000).

segunda e terceira linhas. Pressiona-se a agulha contra a placa com força e fazem-se movimentos circulares para alargar a depressão. Este movimento cria depressões com cerca de 300 μ m de diâmetro e profundidade com superfície lisa. Fazem-se seis depressões em cada gota. Após este passo, as placas de agregação são colocadas na incubadora até serem necessárias, de modo a equilibrar o pH do meio de cultura.

2.2.13.2 - Remoção da zona pellucida.

Existem duas formas de remover a *zona pellucida*, que envolve os embriões. Uma é a enzimática e usa a pronase, a outra é a dissolução com uma solução salina acidificada. Ambas são muito efectivas e não têm efeitos negativos no desenvolvimento subsequente dos embriões. A única diferença prática está na velocidade das reacções. A remoção da *zona pellucida* com pronase demora dez a quinze minutos, enquanto a solução salina ácida demora cerca de um minuto. Por isso neste estudo escolheu-se usar o tratamento ácido. Um problema potencial deste método está na regulação do pH. Se transferir demasiado meio com os embriões para a gota de ácido o pH pode subir demasiado e não há dissolução da *zona pellucida*. Se transportar demasiado ácido com os embriões para a gota de meio, o meio já não vai ficar com as condições óptimas para o crescimento dos embriões. Para eliminar estes

problemas transfere-se sempre uma quantidade mínima de solução com os embriões e fazem-se múltiplas lavagens dos embriões após a remoção da *zona pellucida*. A solução salina ácida mais usada para este objectivo é o Ácido de Tyrode.

Colocam-se duas gotas de meio M2 e várias gotas de ácido de Tyrode numa placa de Petri. Transferem-se todos os embriões rapidamente para uma das gotas de M2 com a pipeta de boca. Em seguida, transferem-se 20 a 30 embriões no mínimo volume possível, para uma das gotas de ácido de Tyrode. Depois, transferem-se de novo para outra gota de ácido e vão agitando os embriões com a pipeta de boca enquanto se observa a *zona pellucida* a dissolver-se. Quando já não se consegue ver a *zona pellucida*, pipetam-se os embriões para a gota fresca de M2, é importante não deixar o ácido actuar tempo demais senão pode levar à desagregação dos blastómeros. Repete-se o processo com os restantes embriões, usando novas gotas de ácido de Tyrode para cada grupo de embriões. Depois disto os embriões são lavados, passando por duas ou três gotas de KSOM antes de serem colocados na placa de agregação.

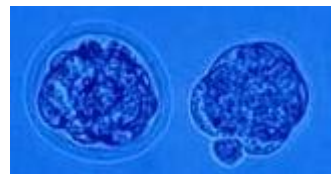


Figura 30 - À esquerda, uma mórula com zona pelucida e à direita sem *zona pellucida*.

2.2.13.3 - Montagem das agregações

As agregações entre CEE e embriões diplóides são feitas juntando um pequeno agregado de CEE com embriões no estágio de oito células. O ideal é colocarem-se dez a quinze CEE por agregado, números maiores tendem a interferir com o desenvolvimento normal e números mais baixos são difíceis de manipular. Logo a seguir à remoção *zona pellucida*, transferem-se grupos de seis embriões para cada gota com depressões na placa de agregação e coloca-se um dentro de cada depressão. Coloca-se a placa de agregação na incubadora.

Preparam-se as CEE como descrito anteriormente. Escolhem-se os agregados de CEE que tenham as condições acima descritas e transferem-se para a primeira e quarta filas da placa de agregações. Com cuidado, transfere-se um agregado de dez a quinze células para cada depressão na segunda e terceira filas. Os agregados de CEE devem ficar ao lado dos embriões, na sua respectiva depressão. Montam-se todos os agregados e em seguida a placa é colocada na incubadora a 37°C, 5% de CO₂, para cultura durante a noite. Na manhã seguinte a maioria dos agregados deve estar na fase de mórula compacta ou jovem blastocisto. Na tarde desse dia

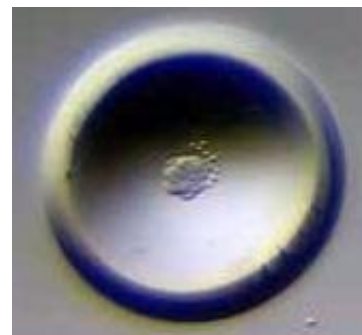


Figura 31 - Depressão com uma mórula e um agregado de CEE lado a lado.

a maioria (cerca de 80%) dos embriões já se encontra na fase de blastocisto e é neste altura que devem de ser transferidos para o útero de fêmeas pseudo-gestantes.

2.2.13.4 - Transferência de embriões para fêmeas receptoras pseudo-gestantes.

Como a janela de receptividade uterina à implantação de embriões é curta, e porque o ambiente uterino é hostil aos embriões durante o primeiro dia de gestação (em que os embriões ainda deviam estar no oviduto), o momento e o local para onde se transferem os embriões é crítico. Em geral os embriões podem ser transferidos para um hospedeiro síncrono, mas como a manipulação e cultura *in vitro* tem o efeito de atrasar o desenvolvimento embrionário, o método mais eficiente é a transferência de embriões para hospedeiras que estão assíncronas um dia. Assim, blastocistos com 4 dpc são transferidos para o útero de fêmeas pseudo-gestantes com 3 dpc. Uma maior assíncronia pode ser tolerada, desde que sejam sempre os embriões que estejam mais avançados. Blastocistos que sejam transferidos para o oviduto de fêmeas receptoras com 1 dpc, atrasam o seu desenvolvimento até saírem do oviduto. Nesse momento continuam com viabilidade para se implantarem. Assim, embriões em qualquer estágio entre uma célula e blastocisto podem ser transferidos para o oviduto de fêmeas hospedeiras no seu primeiro dia de pseudo-gestação, retendo a capacidade de se implantarem de acordo com a programação do hospedeiro. No entanto, a transferência de embriões para o oviduto é uma técnica difícil de executar com sucesso, pois o diâmetro do oviduto é muito mais pequeno que o do útero, e tem que ser encontrado o *infundibulum* para aí se injectar os embriões. Assim a técnica escolhida foi a transferência para o útero de fêmeas com 2,5 dias de pseudo-gestação.

A fêmea pseudo-gestante é pesada e anestesiada, injectando-se intraperitonealmente 0,2mL de avertina por cada 10g de peso (ver Anexo I). Enquanto o anestésico actua, prepara-se a pipeta de transferência. Primeiro os embriões são transferidos para uma placa com meio M2 pré-aquecido. Em seguida liga-se a pipeta de transferência (ponta de pipeta de Pasteur alongada à chama e boleada na extremidade) a uma pipeta de boca, deixa-se uma bolha de ar, aspiram-se os embriões e deixa-se outra bolha de ar no fim. A quantidade de embriões a pipetar é variável, idealmente serão entre seis a dez por cada corno uterino. No entanto podem-se transferir até 24 a 26 embriões por fêmea.

Lava-se a região dorsal da fêmea anestesiada com etanol a 70% e faz-se uma incisão transversal na pele ao nível da primeira vértebra lombar, puxa-se a pele para o lado e faz-se uma incisão lateral na parede abdominal do peritoneu. A partir dessa incisão procura-se uma bolsa de tecido adiposo nessa zona, que está ligada ao ovário. Puxa-se por esse tecido até expor o ovário, oviduto e princípio do útero. Com uma pinça agarra-se a extremidade do útero e com uma agulha faz-se um buraco nas camadas musculares, paralelo ao eixo do útero, de modo a atingir o lúmen. Remove-se a agulha e sem tirar os olhos da lupa insere-se a pipeta de transferência no lúmen e expõem-se os embriões e as bolhas de ar marcadoras. Em seguida verifica-se à lupa se os embriões já não estão na pipeta, recoloca-se o tracto na cavidade abdominal e sutura-se a incisão. Em seguida repete-se o processo para o outro corno uterino.

No fim do processo sutura-se a incisão da pele e coloca-se a fêmea numa caixa limpa, sobre uma luz forte de modo a que mantenha a temperatura (um efeito secundário da anestesia é a perda da regulação térmica do organismo).

2.2.14 - Genotipificação por coloração com X-Gal

O X-Gal, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, é clivado pela enzima beta-galactosidase. O produto final é galactose e 5-bromo-4-cloro-3-hidroindole, que é depois oxidado em 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo, um produto azul, insolúvel.

A coloração com X-Gal é utilizada para fazer a genotipificação de ninhadas de ratinhos e de clones de CEE transfectadas estavelmente. No caso de o objectivo ser a genotipificação de uma ninhada, o material biológico que é usado é uma biópsia da cauda de ratinho com duas a três semanas pós parto. Cada ratinho é identificado pela marcação das orelhas com furos correspondentes a números. O furador de orelhas e as pinças e tesoura utilizados neste processo são lavados e desinfectados entre cada ratinho, para evitar infecções e possíveis contaminações das amostras.

Quando se pretende determinar quais clones de CEE que têm expressão constitutiva da β -galactosidase (reporter primário), efectua-se coloração com X-Gal. Consideram-se clones positivos aqueles que têm expressão uniforme, em mais de 95% das células, do gene β -geo. Há que ter em conta que antes dos clones serem genotipificados já passaram por um processo selectivo de sete a oito dias em meio de cultura suplementado com G-418.

Em ambos os casos este protocolo é efectuado em placas de 96 poços. As amostras são fixadas em 100 μ L de 0,2% (v/v) glutaraldeído em PBS, durante 15 a 20 minutos. Em seguida remove-se o fixador e fazem-se três lavagens de cinco minutos em PBS. Após isto adiciona-se

solução de coloração com X-Gal (ver Anexo I) e incuba-se a 37°C no escuro. No caso das CEE e de caudas com expressão muito forte da β -galactosidase a marcação é visível ao fim de duas horas, no entanto as amostras ficaram sempre a incubar durante a noite para garantir que mesmo a expressão mais fraca seria detectada.

2.3 - Resultados

2.3.1 - Produção da linha de ratinhos Z/EG-D114

2.3.1.1- Preparação do ADN-vector

Para se poder obter CEE geneticamente modificadas é preciso transfectar as CEE, tal é conseguido através do processo de electroporação com o ADN plasmídico do nosso vector de transgénese, Z/EG-D114.

Para iniciar o processo é necessário obter ADN do plasmídeo pZ/EG-D114 em quantidade. Antes de se usar este ADN vector para electroporar é preciso linearizar o plasmídeo, para aumentar a eficiência de transfecção. Devem ser removidas as sequências de ADN bacteriano do vector, como origens de replicação bacterianas e genes de selecção negativa, para evitar que ocorra silenciamento do locus genético de integração. Analisando o mapa de restrição do plasmídeo base, pZ/EG, e o mapa de sequenciação do ADNc do *D114* (dados não mostrados), decidimos fazer restrição com as enzimas *Sfi*I (NEB R0123S) e *Bsa*I (NEB R0535S), pois estas cortam o pZ/EG-D114 só uma vez, apenas nas extremidades da região bacteriana. Foram feitas duas digestões com cerca de 70 μ g de ADN plasmídico e uma com cerca de 100 μ g de ADN, para um volume final de 100 μ L. O resultado da digestão do pZ/EG-D114 foi a obtenção de duas bandas com cerca de 12,2Kb e de 1,2Kb.

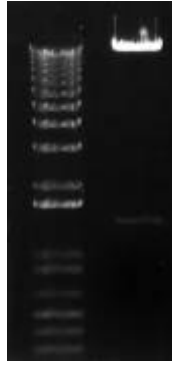


Figura 32 – Electroforese do resultado da restrição de Z/EG-DII4 com SfiI e BsaI. Note-se a presença de bandas com 12,2Kb e 1,2Kb.

A partir do momento em que se obteve o plasmídeo linearizado procedeu-se à sua migração em gel preparativo com 0,7% agarose e posterior extracção da banda de 12,2Kb num transiluminador de radiação ultra-violeta (UV). A banda de gel foi então processada pelo sistema *Qiagen Qiaquick Gel extraction kit* (Qiagen 28704), usando cerca de 400mg de agarose por coluna e por isso múltiplas colunas por cada produto de restrição, conforme necessário. Procedeu-se a todos os passos de limpeza recomendados pelo fabricante, e no final o ADN de cada coluna foi eluído em 30µl de água bidestilada estéril, na câmara de fluxo laminar. Em seguida reuniram-se os produtos de eluição de cada amostra e foram precipitados com 1/10 volume em 3M acetato de sódio (Sigma S7670) e 2,5 volumes em etanol absoluto (Merck 1.00983.2511) e depois ressuspensos em 20µl e 50µl para as amostras que começaram com 70µg de ADN e em 100µl para a amostra que começou com 100µg de ADN. A solução de ressuspensão foi TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH8).

O uso do sistema de colunas *Qiaquick* teve por objectivo a remoção de impurezas que estivessem em solução, tais como sais, pequenas proteínas, incluindo a enzima de restrição, glicerol, entre outros. Este passo é muito importante, pois a presença de um contaminante, poderia revelar-se nefasta para a capacidade das CEE sobreviverem ao processo de electroporação. Além disso, o uso do passo de precipitação do ADN eluído das colunas *Qiaquick* teve por objectivo concentrar o ADN a níveis utilizáveis nesta experiência.

Em seguida avaliou-se a quantidade de ADN precipitado, por espectrofotometria. A concentração final foi estimada em cerca de 2µg/µl e 0,8µg/µl para as restrições de 50µg de ADN e 0,5µg/µl para a amostra que começou com 100µg de ADN.

2.3.2 – Electroporação de CEE

2.3.2.1 - Primeira sessão de electroporação

O processo de electroporação é baseado no facto de a aplicação de um campo eléctrico externo a membranas celulares, levar à formação de poros e, conseqüentemente, a um aumento na condutividade eléctrica e permeabilidade da membrana. Deste modo, facilita-se a entrada de substâncias na célula. Neste caso pretende-se que entre nas CEE o ADN plasmídico do vector de transgénese, Z/EG-DII4.

No início da sessão avaliou-se a densidade celular da cultura de CEE a ser usada. Para esta sessão foram usadas CEE de passagem quinze, da linha R1. A suspensão mãe de CEE tinha uma concentração de $5,4 \times 10^6$ células/mL, ligeiramente abaixo do valor pretendido, $7,5 \times 10^6$ células/ml. Escolheu-se ressuspender as células em 3,5ml de PBS pois, por experiência anterior do laboratório, havia sido definido que a ressuspensão neste volume, normalmente, permite uma boa relação entre densidade celular adequada e volume suficiente para, pelo menos, quatro cuvetes de electroporação. Cada cuvette leva 800 μ L de suspensão celular, mais o volume de ADN vector.

Na altura decidiu-se experimentar adicionar diferentes quantidades de vector às suspensões celulares, de modo a que se pudesse testar qual a concentração óptima para a obtenção da melhor relação entre número de cópia de vector por célula, que se pretende que seja um, e número de células transfectadas, que se pretende que seja o maior possível.

Placa	μ g de ADN	μ L de ADN	nº de células	<i>Time constant</i>
1	10	5	$780 \times 5.4 \times 10^6$	6.8
2	20	10	$780 \times 5.4 \times 10^6$	6.7
3	7,5	15	$780 \times 5.4 \times 10^6$	6.9
4	16	20	$780 \times 5.4 \times 10^6$	6.8

Tabela 1 – Descrição das características específicas de cada mistura de electroporação.

A *Time Constant* é uma medida da quantidade de tempo que leva a voltagem do pulso eléctrico a decrescer para um valor 1/e do pico real de voltagem do pulso eléctrico, medido em milisegundos. O seu valor ideal situa-se entre 6 e 7, e varia com a concentração de células e quantidade de ADN adicionado.

Após a electroporação, as cuvetes foram colocadas em gelo e em seguida o seu conteúdo foi diluído em placas de 10cm individuais, com 10 mL de meio de cultura de CEE em cada. As placas foram incubadas a 37°C, 5% CO₂.

No dia seguinte observou-se que a maioria das células estavam mortas, tendo perdido a sua forma característica e encontrando-se em suspensão no meio. Nesse dia mudou-se o meio, tal processo removeu os restos celulares das células mortas e retornou as condições óptimas para o crescimento das células, de modo a que o maior número possível de células pudesse recuperar do processo de electroporação.

No segundo dia após a electroporação começou o processo de selecção. Para tal suplementou-se o meio de cultura de CEE com 150µg/mL de G-418. Este dia é considerado o dia zero de selecção.

No dia +3 pós-selecção já havia muitas células mortas, resultado da sensibilidade das células não transfectadas à acção do G-418. Nesse dia mudou-se o meio. O meio foi trocado também no dia +6 e no dia +7 pós-selecção começou-se o processo de picagem das colónias sobreviventes. O processo de picagem é feito com o auxílio de uma lupa colocada na câmara de fluxo laminar. As células são lavadas do meio de cultura e colocadas em PBS. À lupa usa-se uma micropipeta de 200µl para raspar e aspirar clones individuais de CEE para poços individuais em placas de 96 poços. Nesse dia picaram-se 88 clones a partir das 4 placas iniciais, para placas de 96 poços.

	Clones picados	Quantidade de ADN usado na electroporação	Designação da placa
Placa 1	29	10µg/5µL (2µg/µl)	H1
Placa 3	3	7,5µg/15µL (0,5 µg/µl)	
Placa 2	32	20µg/10µL (2 µg/µl)	G1
Placa 4	24	16µg/20µL (0,8 µg/µl)	

Tabela 2 – Relação entre a quantidade de ADN em cada cuvete e o número de clones picados no dia +7, da respectiva placa. Aqui é demonstrado também a designação da placa para onde cada grupo de clones foi picado.

Neste dia, +7, não se picaram todas as colónias, deu-se preferência às colónias de maior tamanho, pois quanto mais pequena for a colónia pior serão as probabilidades de ela sobreviver ao processo de picagem e logo de crescer na placa de 96 poços.

No dia +8 picaram-se as restantes colónias sobreviventes ao processo de selecção, que nesta altura já apresentavam um tamanho suficiente.

	Clones picados	Designação da placa
Placa 1	29	H2
Placa 3	3	
Placa 2	32	G2
Placa 4	16	

Tabela 3 – Descrição do número de clones picados no dia +8, de cada placa, e a designação da placa de 96 poços para onde foram transferidos.

O restante processo de cultura procedeu do seguinte modo:

Dia +9: mudou-se o meio às placas H2 e G2.

Dia +10: passou-se o meio 1:2 às placas G1 e H1, dando origem às placas G1a e G1b, e H1a e H1b.

Dia +11: passaram-se 1:2 as placas G2 e H2, dando origem às placas G2a e G2b, e H2a e H2b. Mudei o meio às placas G1a e b, e à H1a e b.

Dia +12: as placas G1a e H1a, que tinha passado no dia +10 foram congeladas e as G1b e H1b passadas 1:2, criando as placas G1b1 e b2 e H1b1 e b2. Mudou-se o meio às placas G2a e b e H2a e b.

Dia +13: mudou-se o meio às placas G1b1 e b2 e H1b1 e b2. As placas G2a e H2a, que tinham sido passadas no dia +11 foram congeladas e passaram-se as G2b e H2b 1:2, criando as placas G2b1 e b2 e H2b1 e b2.

Dia +14: a placa G1b1 foi congelada e fez-se coloração com X-Gal das células na placa G1b2. Mudou-se o meio às placas passadas no dia +13.

Dia +15: a placa G2b1 foi congelada e fez-se coloração com X-Gal das células na placa G2b2.

No total obtivemos 88 clones do primeiro dia de picagens e 80 clones do segundo dia de picagem.

Placa	Clones repicados	Placas de origem
H1	32	Placa 1 e 3
H2	32	
G1	56	Placa 2 e 4
G2	48	

Tabela 4 – Número total de clones repicados, com descrição da sua placa de origem e placa de destino.

A coloração com X-Gal das células nas placas de 96 poços permitiria avaliar a intensidade e uniformidade de expressão do repórter primário do vector Z/EG-DII4 nos diferentes clones, actuando como complemento do resultado do teste da integração estável, que é a selecção com G-418. O que se procura é uma marcação uniforme e forte em mais de 95% das células.

Placa	Localização
G1b2	3A
	3C
	3F
H1b2	1B*
	3B
	2E
	4C
	4G
G2b2	2G
H2b2	2H
	4B

Tabela 5 – Localização na respectiva placa de 96 poços dos clones considerados positivos para coloração com X-Gal. *: muito bom aspecto.

Os clones das placas G1b2 e G2b2 foram descartados pois na sua maioria as células apresentavam-se mais diferenciadas, as colónias tinham os rebordos mais escuros e o interior menos brilhante.

Placa		Nova designação	Crescimento depois de descongelada	Coloração com X-Gal
2E	H1	Nv1	+	95-100%
3B	H1	Nv2	+++	95-100%
4C	H1	Nv3	+++	95-100%
4G	H1	Nv4	Não cresceu*	95-100%
1B	H1	Nv5	+	100%
2H	H2	Nv6	+	95-100%
4B	H2	Nv7	+	95-100%

Tabela 6 – Resumo das características dos diferentes clones considerados positivos para integração estável do vector de transgénese. *:não resistiu à congelação, tinha poucas células.

Após o rastreio dos clones por coloração com X-Gal, descongelaram-se as placas de 96 poços respectivas, gémeas das placas onde se fez a coloração, e colocaram-se os clones considerados positivos a crescer em placas de quatro poços. Nesta altura avaliou-se a capacidade de proliferação de cada clone e depois estes foram congelados individualmente em criotubos.

Estes clones positivos, que passaram o processo de crescimento em meio selectivo (suplementado de G-418) e que apresentavam uma coloração uniforme em mais de 95% das células, são então os seleccionados para serem usados nas agregações com embriões de oito células, de forma a produzir quimeras. Esta combinação de características só pode ocorrer em clones que tenham uma integração estável do vector de transgénese condicional.

2.3.2.2 - Segunda sessão de electroporação.

Começou-se por avaliar a densidade celular da suspensão de CEE a ser usada. O resultado foi uma concentração de $5,45 \times 10^6$ células/mL, em 3,5mL de PBS. Fizeram-se quatro cuvetes de electroporação, cada cuvette leva 800µL de suspensão celular, mais o ADN. Na altura decidiu-se experimentar adicionar diferentes quantidades de ADN às suspensões celulares, de modo a que se pudesse testar qual a concentração óptima para a obtenção da melhor relação entre número de cópia e número de células transfectadas. A tabela seguinte descreve as características específicas de cada mistura de electroporação:

Placa	μg de ADN	μL de ADN	nº de células	<i>Time constant</i>
1	10	20	$780 \times 5.4 \times 10^6$	6.8
2	10	20	$780 \times 5.4 \times 10^6$	6.8
3	20	40	$765 \times 5.4 \times 10^6$	6.7
4	25	30	$780 \times 5.4 \times 10^6$	6.8

Tabela 7 – Características específicas de cada mistura de electroporação.

Após a electroporação, as cuvetes foram colocadas em gelo e em seguida o seu conteúdo foi diluído em placas de 10cm individuais, com 5 mL de meio de cultura, em cada placa. As placas foram então incubadas a 37°C, 5% CO₂. No dia seguinte observou-se que a maioria das células estavam mortas, tinham perdido a sua forma característica e estavam em suspensão no meio. Nesse dia mudou-se o meio, tal processo removeu os restos celulares das células mortas e retornou as condições ótimas para o crescimento das células, de modo a que o maior número possível de células pudesse recuperar do processo de electroporação.

No segundo dia após a electroporação começou o processo de selecção. Para tal mudou-se o meio para meio de cultura suplementado de 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de G-418. Este dia é considerado o dia zero de selecção.

Mudou-se o meio nos dias +1, +2, +4, +6 e no dia +7 iniciou-se o processo de picagem das colónias sobreviventes ao processo de selecção, para placas de 96 poços. No total obtiveram-se 48 clones positivos, que por isso ficaram todos na mesma placa de 96 poços.

	nº de clones repicados	Quantidade de ADN usada na electroporação
Placa 1	24	10 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$ (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Placa 3	4	20 $\mu\text{g}/40\mu\text{L}$ (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Placa 2	20	16 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$ (0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Placa 4	0	25 $\mu\text{g}/30\mu\text{l}$ (0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

Tabela 8 – Relação entre a quantidade de ADN em cada cuvette com o número de clones picados da respectiva placa.

No dia +8 os clones não estavam em condições de serem picados.

Placa	Nova designação	Crescimento após selecção	Coloração com X-Gal
1H	D1	++	95-100%
2A	D2	++	95-100%
2F	D3	+++	100%
3A	D4	++	98-100%
4A	D5	++	98-100%
4C	D6	++	95-100%
5D	D7	+++	100%
6E	D8	+++	100%
6A	D9	+	100%

Tabela 9 – Resultado da coloração com X-Gal das células na placa de 96 poços.

Neste caso não se congelou a última placa, fez-se logo a passagem dos clones positivos para placas de quatro poços, e só depois se congelou em criotubos, reduzindo em um o número de passagens e talvez melhorando a capacidade transmissão à linha germinal.

Obtivemos onze clones positivos em 168 que foram picados, (embora quatro tivessem sido descartados), da primeira sessão de transfecção e nove clones positivos em 48 picados, da segunda sessão de transfecção, uma clara melhoria na eficiência. Tal pode ter sido devido a um ganho de experiência na manutenção de CEE electroporadas. Portanto, no total destas duas sessões de electroporação de CEE resultaram 16 clones utilizáveis para agregações com embriões no estágio de oito células.

2.3.3 - Sessões de agregação

Realizaram-se quatro sessões de agregação de CEE com embriões receptores.

Para se obterem fêmeas dadoras de embriões cruzaram-se fêmeas superovuladas com machos reprodutores.

Nº de fêmeas superovuladas	Peso das fêmeas (g)	Nº de fêmeas com rolhão vaginal
Primeira sessão		
35	25-30	17
Segunda sessão		
45	25-30	17
Terceira sessão		
30	25-30	14
15	20-25	5
5	<20	5
Quarta sessão		
30	25-30	20
15	20-25	5
5	<25	3

Tabela 10 – Relação entre o peso das fêmeas superovuladas e o número de fêmeas com rolhão vaginal após cruzamento com machos reprodutores.

Para se obterem fêmeas receptoras, pseudo-gestantes, colocaram-se 120 fêmeas de peso superior a 30g com 40 machos vasectomizados, portanto três fêmeas por macho em caixas individuais. Este processo foi igual nas quatro sessões de agregação, tendo-se obtido entre sete e dezoito fêmeas com rolhão vaginal por sessão.

Na manhã do segundo dia de gestação recolhem-se os embriões dos ovidutos das fêmeas superovuladas que se encontram gestantes, quando os embriões se encontram, na sua maioria, no estágio de oito células. Nas quatro sessões recolheram-se entre 10 e 17 embriões por fêmea. Em média, 38% a 66% desses embriões estavam no estágio certo e tinham bom aspecto (blastómeros uniformes e brilhantes quando vistos no microscópio de dissecção).

Na primeira sessão de agregação usaram-se os clones Nv3 e Nv6. Escolheram-se estes porque tinham potenciais de crescimento muito diferentes, o Nv3 cresce muito depressa enquanto o Nv6 cresce lentamente. Um dos factores limitantes ao correcto desenvolvimento embrionário de uma quimera é a agressividade da colonização do embrião pelas CEE, algo que pode ser correlacionado com a velocidade de crescimento das CEE em cultura. Deste modo poderíamos testar qual o padrão de crescimento que fornece os melhores resultados e

permite a obtenção de maior número de quimeras viáveis e com elevada contribuição das CEE.

Fizeram-se quatro placas de agregações, duas com o clone Nv3 e duas com o clone Nv6, que permaneceram em cultura até a maioria dos embriões se encontrar no estágio de blastocisto. Em seguida os embriões agregados são transferidos para o oviduto de fêmeas pseudo-gestantes. Durante a sessão de transferência dos embriões agregados, as diferentes fêmeas são marcadas com buracos nos lóbulos das orelhas enquanto ainda estão anestesiadas.

#	Marca	Peso g	Embriões transferidos	Clone usado	Técnica	Gestante	Nº de crias	Nº de quimeras	Quimeras macho
1	0	31.02	11: 4 bl 7 mo	Nv3	OK	Sim	3	2	
2	1Dta	30.53	10: 8 bl 2 mo	Nv3	OK	Sim	3		
3	2Dta	28.93	12: 2 bl 10 mo	Nv3	OK	Não	-		
4	3Dta	32.37	13: 7 bl 6 mo	Nv6	OK	Sim	3	2	Nv6.1 e Nv6.2
5	1Esq	30.19	11: 8 bl 3 mo	Nv6	OK	Não	-		
6	2Esq	31.01	13: 6 bl 7 mo	Nv6	OK	Sim	3	1 (muito fraca)	
7	3esq	31.84	11: 10 bl 1 mo	Nv6	OK	Não	-		
8	1Dta 1Esq	32.03	10: 10 bl	Nv3	OK	Sim	3	1	
9	2Dta 1Esq	30.70	10: 8 bl 2 mo	Nv3	OK	Não	-		
10	3Dta 1Esq	30.24	11: 4 bl 7 mo	Nv3	OK	Sim	1		
11	2Dta 2Esq	29.17	10: 3 bl 7 mo	Nv3	OK	Sim	2	1	

Tabela 11 – Descrição detalhada do primeiro processo de agregação e transferências. bl, blastocistos; mo, mórulas.

	n°	%
Fêmeas gestantes	7	63%
Embriões transferidos	122	
Embriões em fêmeas gestantes	78	64%
Crias nascidas	18	23%
Quimeras	7	27,7%
Quimeras macho	3	43%

Tabela 12 – Resumo da eficiência do primeiro protocolo de agregação e transferências.

Nesta sessão obtiveram-se sete quimeras mas só quatro chegaram a adultos, os dois machos obtidos da fêmea número quatro (Nv6.1 e Nv6.2 a partir de agora) e as duas fêmeas obtidas da fêmea número 1 (Nv3.1 e Nv3.2 a partir de agora).

Na segunda sessão foram usados os clones D3 e D5. De novo escolheram-se clones com capacidades proliferativas diferentes, o D3 tem uma capacidade de crescimento superior ao D5.

Fizeram-se 4 placas de agregação, em que 3 delas tinham CEE do clone D5 e só um tinha CEE do clone D3. Fez-se esta escolha porque mesmo na placa com diluição de 1:50 o crescimento havia sido exagerado, a placa apresentava-se semi-confluyente e algumas colónias já se haviam começado a diferenciar.

#	Marca	Peso g	Embriões transferidos	Clone usado	Técnica	Gestante	N° de crias	N° de quimeras	Quimeras macho
1	0	29.9 0	Esq:10(5bl) Dir:10(8bl)	D5	OK	Sim	2		
2	1Dta	31.8 5	Esq:10(6bl) Dir:10(5bl)	D5	OK	Sim	4		
3	2Dta	35.1 8	Esq:10(4bl) Dir:10(4bl)	D5	OK	Sim	0		
4	3Dta	32.1 4	Esq:10(1bl) Dir:10(4bl)	D5	OK	Não	-		
5	1Esq	30.6 9	Esq:10(2bl) Dir:9bl	D5	OK	Sim	5	2	D5.2
6	2Esq	28.6 8	Esq:10(3bl) Dir:10(4bl)	D3	Morreu após cirurgia.				

7	3esq	31.4 6	Esq:8(4bl) Dir:10(5bl)	D3	OK	Não	-		
---	------	-----------	---------------------------	----	----	-----	---	--	--

Tabela 13 – Descrição detalhada do segundo processo de agregação e transferências. bl, blastocistos; mo, mórulas.

	n°	%
Fêmeas gestantes	4	57%
Embriões transferidos	137	
Embriões em fêmeas gestantes	79	58%
Crias nascidas	11	14%
Quimeras	2	18%
Quimeras macho	1	50%

Tabela 14 – Resumo da eficiência do segundo protocolo de agregação e transferências.

Nasceram duas quimeras na segunda sessão, estas foram designadas de D5.1 (a fêmea) e D5.2 (macho).

Não se chegou a confirmar o resultado do uso das células da linha D3 em agregações pois uma das fêmeas para as quais se transferiram embriões agregados com este clone morreu a seguir à cirurgia, e a outra não ficou gestante. Como a fêmea que não ficou gestante tinha tido um rolhão vaginal duvidoso não se podem tirar conclusões deste resultado.

Para a terceira sessão escolheram-se os clones Nv1 e Nv2, de novo um com um potencial de crescimento maior que o outro (Nv2>Nv1).

Fizeram-se quatro placas de agregação, duas com o clone Nv1 e duas com o clone Nv2.

#	Marca	Peso g	Embriões transferidos	Clone usado	Técnica	Gestante	Nº de crias	Nº de quimeras	Quimeras macho
1	0	32.90	16: 10 bl 6 mo	Nv1	OK	Não			
2	1Dta	29.60	16: 3 bl 13 mo	Nv1	Morreu após a cirurgia				
3	2Dta	31.10	16: 4 bl 12 mo	Nv1	OK	Não			
4	3Dta	33.01	16: 5 bl 9 mo	Nv1	OK	Não			
5	1Esq	36.20	16: 3 bl 13 mo	Nv1	OK	Sim	1		
6	2Esq	35.12	16: 4 bl 12 mo	Nv1	OK	Não			
7	3esq	32.50	16: 8 bl 8 mo	Nv2	OK	Sim	1 (morreu à nascença)		
8	1Dta 1Esq	32.50	16: 2 bl 14 mo	Nv2	OK	Não			
9	2Dta 1Esq	33.40	16: 4 bl 12 mo	Nv2	OK	Não			
10	3Dta 1Esq	30.40	12: 5 bl 7 mo	Nv2	OK	Não			
11	1Dta 2Esq	31.90	16: 4 bl 12 mo	Nv2	OK	Não			
12	1Dta 3Esq	30.70	16: 8 bl 8 mo	Nv2	OK	Sim	3	1	Nv2.1

Tabela 15 – Descrição detalhada do terceiro processo de agregação e transferências. bl, blastocistos; mo, mórulas.

	nº	%
Fêmeas gestantes	3	25%
Embriões transferidos	187	
Embriões em fêmeas gestantes	48	26%
Crias nascidas	4	8%
Quimeras	1	25%
Quimeras macho	1	100%

Tabela 16 – Resumo da eficiência do terceiro protocolo de agregação e transferências.

O ratinho quimérico macho que resultou desta sessão de agregações foi designado Nv2.1.

Na quarta sessão de agregações usaram-se os clones Nv5 e Nv7, clones com crescimento mais lento. Foram escolhidos estes pois o clone Nv6, que até ao momento era o clone que tinha dado origem a mais quimeras e à melhor quimera, tinha um padrão de crescimento semelhante aos clones Nv5 e Nv7.

#	Marca	Peso g	Embriões transferidos	Clone usado	Técnica	Gestante	Nº de crias	Nº de quimeras	Quimeras macho
1	0	31.03	16: 2 bl 14 mo	Nv5	OK	Sim	1 (morreu à nascença)		
2	1Dta	34.60	15: 3 bl 12mo	Nv5	OK	Não			
3	2Dta	28.30	15: 5 bl 10mo	Nv5	OK	Não			
4	3Dta	31.50	15: 3 bl 12mo	Nv5	OK	Não			
5	1Esq	31.20	15: 4 bl 11 mo	Nv5	OK	Não			
6	2Esq	30.60	15: 4 bl 11 mo	Nv7	OK	Sim	2	1	Nv7.1
7	3esq	28.90	19: 19mo	Nv7	Morreu após a cirurgia				
8	1Dta 1Esq	32.28	15: 2 bl 13 mo	Nv7	OK	Não			
9	2Dta 1Esq	37.8	15: 15mo	Nv7	OK	Não			

Tabela 17 – Descrição detalhada do quarto processo de agregação e transferências. bl, blastocistos; mo, mórulas.

	nº	%
Fêmeas gestantes	2	22%
Embriões transferidos	140	
Embriões em fêmeas gestantes	31	22%
Crias nascidas	3	10%
Quimeras	1	33%
Quimeras macho	1	100%

Tabela 18 – Resumo da eficiência do quarto protocolo de agregação e transferências.

O ratinho quimérico macho que resultou desta sessão de agregações foi designado Nv7.1.

2.3.4.- Análise das quimeras

Destas quatro sessões de agregação resultaram nove quimeras com uma percentagem de quimerismo da pelagem superior a 10-15%, que é um indicador provável da percentagem de contribuição das CEE para todo o organismo (Papaioannou ; Johnson, 2000).

Designação da quimera macho	Percentagem de quimerismo da pelagem
Nv6.1	85%
Nv2.1	75%
Nv6.2	60%
Nv7.1	55%
D5.2	15%

Tabela 19 – Descrição da medida subjectiva da percentagem de células de folículos pilosos que descendem da linhagem do clone de CEE usado na agregação com o embrião que deu origem a cada uma das quimeras macho.

Designação da quimera fêmea	Percentagem de quimerismo da pelagem
D5.1	20%
Nv3.2	15%
Nv3.1	10%

Tabela 20 – Descrição da medida subjectiva da percentagem de células de folículos pilosos que descendem da linhagem do clone de CEE usado na agregação com o embrião que deu origem a cada uma das quimeras fêmea.

Quando estas quimeras atingiram a idade de 5 semanas, altura em que atingem a maturidade sexual, foram cruzadas com fêmeas CD1, ou machos, consoante o caso. O que se

procura obter neste passo são crias de geração F1 com pelagem *agouti*. Os ratinhos que têm esta pelagem têm também olhos escuros, em contraste com os ratinhos CD1, que são albinos, e por isso têm olhos cor-de-rosa. Esta característica permite que se detecte logo à nascença a presença de uma cria *agouti*, pois apesar de estas nascerem sem pelagem é possível observar a pigmentação dos olhos das crias através das pálpebras fechadas.

O facto de uma quimera dar origem a crias com pelagem *agouti* indica que esta tem contribuição das CEE na linha germinal e que por isso as suas crias *agouti* têm 50% de hipóteses de serem heterozigóticas para a alteração (ou alterações) genética introduzida nas CEE. A probabilidade de 50% deriva do facto de na meiose se originarem gâmetas haplóides e este facto em conjugação com a elevada probabilidade de ocorrer só um evento integrativo por célula, faz com que só metade dos gâmetas tenha o complemento cromossómico que inclui a alteração.

De todas as quimeras só as linhas Nv6.1 e Nv2.1 é que revelaram ter uma contribuição das CEE a toda a linha germinal. Todas as suas ninhadas foram integralmente compostas por animais com pelagem *agouti*. Para fazer o rastreio das ninhadas, de modo a saber quais os animais transgênicos, fez-se recurso à expressão do repórter primário do vector, o gene β -*geo*, que codifica para uma proteína de fusão entre a β -galactosidase e transferase de neomicina. O material biológico usado para o teste da actividade da β -galactosidase foi a ponta da cauda das crias. As crias foram marcadas e amputou-se a extremidade da cauda. O resultado da coloração com X-Gal revelou marcação extensa na cauda de 47% (23/49) das crias da linha Nv6.1 e em 51% (29/58) das crias da linha Nv2.1, seguindo a distribuição mendeliana esperada.

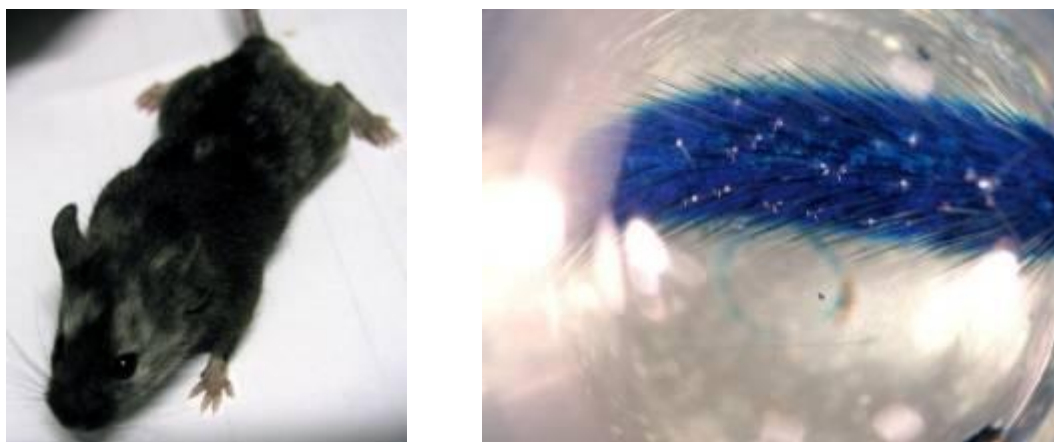


Figura 33 - Quimera Nv6.1. Coloração com X-Gal de biópsia de cauda da quimera Nv6.1.

A outra quimera que obteve contribuição das CEE na linha germinal foi a fêmea Nv3.2. No entanto, em quatro ninhadas nascidas até ao presente só na sua segunda ninhada é que obteve uma cria *agouti*. A quimera tem cerca de 15% de quimerismo na pelagem, um valor muito baixo, e apesar de tal não ser esperado, revela ter uma pequena contribuição das CEE para a linha germinal. Não se conhece ainda a verdadeira extensão desta contribuição mas não é de excluir a hipótese de esta não voltar a transmitir. Infelizmente esta cria revelou ser negativa para a coloração com X-Gal, ou seja, não era transgénica.



Figura 34 - Quimera Nv3.2 com uma das suas ninhadas.

As outras quimeras não tiveram transmissão à linha germinal durante a sua vida, incluindo quimeras com percentagem de quimerismo da pelagem de até 60%. Ao contrário das outras, a quimera macho Nv7.1 aparentou ser estéril, nunca tendo tido descendência. As outras quimeras tiveram descendência regular mas nunca tiveram crias com pelagem *agouti*.

Como o alvo principal do estudo proposto por esta tese envolvia a análise em embriões decidiu-se analisar também a extensão de marcação com X-Gal em embriões com 8 dpc. Os resultados indicaram que a expressão deste repórter ocorre ao longo de todo o embrião, sendo considerada constitutiva em ambas as linhas, Nv6.1 e Nv2.1.

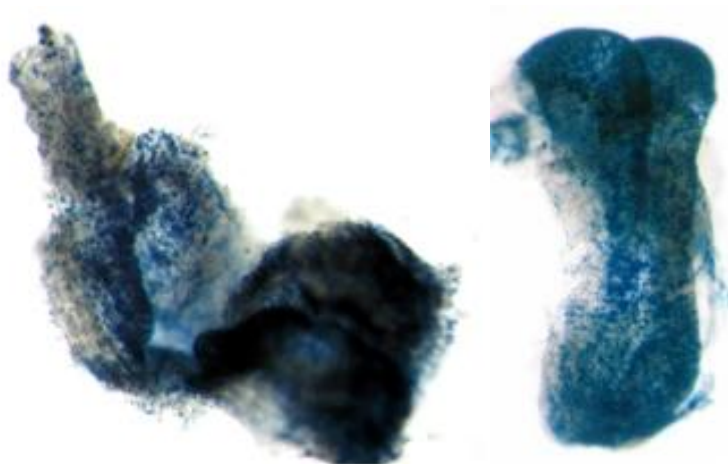


Figura 35 – Marcação com X-Gal de embriões Z/EG-Dll4 com 8 dpc. À esquerda linha Nv2.1; à direita linha Nv6.1.

Como ambas as linhas apresentavam padrões semelhantes de marcação com X-Gal, decidiu-se usar apenas uma das linhas para os trabalhos projectados. Como a quimera Nv6.1 tinha uma maior percentagem de quimerismo optou-se por usar essa linha, que passou a denominar-se Z/EG-Dll4(CD1).

2.3.5 - Produção de linhas de ratinhos transgênicos Z/EG-Dll4 por microinjecção pronuclear

Posteriormente à produção dos ratinhos transgênicos Z/EG-Dll4 por agregação diplóide recorreu-se a outra técnica de transgênese, a microinjecção pronuclear. Esta necessidade adveio por se ter revelado muito moroso o processo de agregação diplóide. Esta técnica envolve a injecção de ADN vector, neste caso o vector pZ/EG-Dll4, em pronúcleos masculinos (devido ao facto de estes serem ligeiramente maiores que os pronúcleos femininos) de oocitos recém-fertilizados.

Em relação ao método da agregação diplóide este método tem a vantagem de ser mais rápido e dar origem directa a animais transgênicos (não passa pela fase de quimera). Como desvantagem temos o facto de não ser possível seleccionar os óvulos microinjectados da mesma forma como as células estaminais embrionárias transfectadas.

Partiu-se de 10µg de ADN vector cortado com *SfiI* e *BsaI*. Correu-se o resultante em gel de agarose e separou-se a banda de 12,2Kb, tal como foi descrito anteriormente. A banda de gel foi então processada pelo sistema *Qiagen Qiaquick Gel extraction kit*, usando cerca de 400mg de agarose por coluna e o ADN foi eluído em 30µl de TE estéril. A concentração de ADN foi medida por espectrofotometria e estimada a 150ng/µl. No dia da microinjecção o

ADN vector foi diluído a 2-3ng/μl em tampão de injeção (10mM Tris PH7,5, 0,1mM EDTA pH8).

O trabalho de microinjeção pronuclear foi realizado na Unidade de transgênicos do Instituto Gulbenkian de Ciência pela Dra. Ana Nóvoa, sob supervisão do Doutor Moises Mallo.

Deste procedimento nasceram vinte e nove crias da estirpe consaguínea FVB/N, das quais três eram transgênicos, duas fêmeas e um macho.

A análise do padrão de expressão do repórter primário revelou que os níveis de expressão eram semelhantes aos obtidos com linhas produzidas por agregação diplóide. Por facilidade de cruzamentos seguimos os trabalhos usando principalmente a linha do macho, que passou a ser designada de *Z/EG-Dll4(FVB)*.

2.4 – Discussão

Para produzir linhas de ratinhos transgênicos para *Z/EG-Dll4* usaram-se dois métodos diferentes, agregações diplóides e microinjeção pronuclear.

O primeiro passo crucial na técnica de agregações diplóides é o passo de electroporação das CEE. Neste passo testámos várias concentrações e quantidades de ADN vector, de modo a tentar descobrir os valores ideais para este protocolo. Obtivemos mais clones com integração estável do vector quando usámos o ADN mais concentrado (2μg/μl). A esta concentração, 2μg/μl, a quantidade de ADN não parece ser o factor limitante para a eficiência de transfecção, pois o dobro da quantidade de ADN, 20μg contra 10μg, só levou a um aumento de 10% no número de clones obtidos com integração estável. Com concentrações inferiores surge um problema quando se atingem quantidades elevadas de ADN vector, acima de 20μg, pois tal obriga à adição de volumes elevados de solução de ADN, na casa dos 30 a 40μl. Nestes casos, apesar de se ter usado quantidades elevadas de ADN, obtiveram-se poucos clones com transfecção estável. Este efeito pode ser motivado pela presença de elementos nocivos às CEE nas soluções de ADN, que a partir de uma determinada concentração tornam-se nocivos ao crescimento das CEE.

A marcação com X-Gal dos clones repicados no seguimento do protocolo de selecção por crescimento em meio suplementado com G-418 nas réplicas do protocolo de electroporação revelou que na segunda repetição o protocolo foi mais eficiente, provavelmente devido ao acréscimo de experiência nesta fase do trabalho, dando origem a

nove clones corados por X-Gal em 48, enquanto na primeira repetição se obtiveram sete clones corados por X-Gal em 64.

Depois de se terem obtido os clones, dezasseis no total, avançou-se para o protocolo de agregações diplóides. Fizeram-se quatro réplicas deste protocolo.

O primeiro passo do protocolo de agregações diplóides é a superovulação das fêmeas dadoras. Este passo tem duas funções, primeiro sincronizar o ciclo éstrico das fêmeas para que a maioria esteja na fase de estro e segundo para aumentar o número de embriões para recolha. As fêmeas seguiram o mesmo protocolo de superovulação nas quatro réplicas. A eficiência de sincronização e indução de ovulação variou entre os 37,5% na segunda repetição e os 56% na quarta repetição do protocolo. Analisando as quatro experiências como uma só estes resultados representam um aumento teórico de 92% no número de fêmeas com rolhão vaginal, em relação aos valores esperados em fêmeas não superovuladas (25%). Em relação ao número de embriões recolhidos a partir destas fêmeas, obteve-se, em média, entre 9,5 embriões por fêmea na primeira experiência e 16,8 embriões por fêmea na terceira experiência. Em relação à frequência de embriões com qualidade (com oito células, blastómeros regulares e contornos definidos e brilhantes), os valores variaram entre os 36% na primeira experiência e os 65% na terceira experiência. Analisando os resultados das quatro sessões de agregação como uma só experiência obteve-se em média 13,9 embriões por fêmea e em média 57% desses embriões tinham as características desejadas. As variações obtidas entre as quatro repetições desta experiência podem ser resultado de variações nas próprias fêmeas, uma vez que para cada experiência foram encomendadas fêmeas novas à Harlan Ibérica ou podem simplesmente resultar de melhorias na técnica de recolha de embriões, resultando numa maior eficiência de recolha e em menos embriões afectados.

Os embriões recolhidos foram agregados com as CEE seleccionadas por serem resistentes a G-418 e por terem uma elevada percentagem de células positivas a coloração com X-Gal. O propósito do teste com X-Gal é determinar se os clones de CEE são mistos, ou seja se contêm células de diferentes clones, em especial se contêm células não transgênicas misturadas com células transgênicas. Por isso foram seleccionados só os clones em que mais de 95% das CEE ficam azuis com coloração com X-Gal, indicando uma elevada probabilidade de o clone não ser misto ou ter uma contribuição mínima de CEE não transgênicas. Após o procedimento de agregação os embriões são transferidos para fêmeas pseudo-gestantes.

A obtenção de fêmeas pseudo-gestantes baseia-se no facto de as fêmeas de ratinho assumirem um padrão hormonal de gestantes após a ocorrência de cópula durante o estro, independentemente da ocorrência de fecundação. Para tal cruzam-se fêmeas com machos

vasectomizados. A taxa de sincronização de ciclo éstrico e indução de ovulação nas quatro repetições da experiência variou entre 5,83% na segunda experiência e 15% na primeira experiência. Analisando as quatro réplicas do protocolo como uma só experiência obteve-se 9,9% de sincronização do ciclo éstrico e indução de ovulação na fase de estro no dia de cruzamento. Como estas fêmeas não são superovuladas este resultado indica que na realidade, sem tratamento hormonal, uma grande parte das fêmeas tem o ciclo éstrico parado, devendo ser essa a principal razão para não se obter os 25% de sincronização esperados. A razão para esta discrepância pode estar relacionada com condições ambientais ou com condições microbiológicas dos animais.

Considerando o valor de 9,9% como o valor base de taxa de sincronização do ciclo éstrico e indução de ovulação em fêmeas sem tratamento hormonal, o valor de 48% obtido com as fêmeas superovuladas representa um aumento real de 485% em relação ao valor basal de sincronização do ciclo éstrico e indução de ovulação. Este valor de variação também pode ser afectado pela diferença de pesos das fêmeas usadas, sendo que nos cruzamentos com machos vasectomizados se usaram fêmeas com mais de 30g e nos cruzamento em que se superovularam as fêmeas estas tinham maioritariamente 25-30g, embora esta variação não deve ser muito significativa devido à pequena variação de pesos observada.

Usaram-se oito clones diferentes de CEE transgênicas, Nv1, Nv2, Nv3, Nv5, Nv6, Nv7, D3 e D5. A frequência de quimeras quando se usou cada um dos clones variou entre os 18% no clone D5 e os 50% no clone Nv6. Com o decorrer das experiências, o número de fêmeas receptoras, pseudo-gestantes, em que ocorreu implantação dos embriões transferidos, foi baixando de 63% na primeira sessão de agregação, para 57% na segunda, 26% na terceira e 22% na quarta sessão de agregação. Este resultado fez com que apesar de o número de embriões usados ter aumentado ao longo das experiências o número de quimeras obtidas por experiência também fosse baixando. Este facto está reflectido na frequência de embriões transferidos que nasceram, que também desceu com o decorrer das experiências, de 23% na primeira sessão de agregações, a 14% na segunda, 8,33% na terceira e 9,67% na quarta sessão de agregações. Este resultado indica que a baixa de frequência de quimeras ao longo das experiências não é só responsabilidade das fêmeas usadas, ao não assumirem o padrão hormonal que permitisse a implantação dos embriões transferidos. Como na realidade a frequência de embriões recolhidos com boa qualidade subiu ao longo das experiências, não temos uma explicação para a baixa na sobrevivência dos embriões transferidos para fêmeas que ficaram gestantes, embora não se possa eliminar a possibilidade de erro técnico nas últimas experiências.

Nas quatro sessões de agregações obtivemos um total de onze quimeras, em que quatro quimeras correspondem ao clone Nv3, três quimeras correspondem ao clone Nv6, duas quimeras correspondem ao clone D5, uma quimera corresponde ao clone Nv2 e uma quimera corresponde ao clone Nv7. Com os clones D3, Nv1 e Nv5 não obtivemos quimeras devido a baixo número de fêmeas que ficaram gestantes, no caso dos clones Nv1 e Nv5, ou mesmo devido a ausência de fêmeas que ficaram gestantes, no caso do clone D3.

A frequência de quimeras obtidas por clone de CEE, para os casos em que nasceram quimeras, foi de 25% para o clone Nv2, 33% para o clone Nv3, 50% para o clone Nv6, 33% para o clone Nv7 e 18,2% para o clone D5. Estes resultados indicam que nenhum destes clones de CEE transgênicas parece afectar a sobrevivência dos animais de si derivados.

Como as CEE da linha R1 têm um complemento genético correspondente ao sexo masculino existe sempre uma tendência para o sexo masculino nas quimeras. Nesta experiência obtiveram-se cinco quimeras masculinas em oito quimeras que chegaram a adulto. Usando CEE masculinas é difícil obter quimeras femininas, tal acontece apenas em casos em que as CEE tiveram uma contribuição baixa para o desenvolvimento do animal e o embrião receptor seja feminino ou em casos em que o animal apenas aparente ser feminino, sendo antes hermafrodita. Os nossos resultados confirmam esta observação, sendo que as quatro quimeras mais fortes que obtivemos correspondem a machos e as três fêmeas obtidas tiveram percentagens de quimerismo da pelagem inferiores a 20%. O facto de as três quimeras fêmea serem férteis indica que não eram hermafroditas.

A obtenção de animais quiméricos é apenas o primeiro passo para o estabelecimento de uma linha de animais transgênicos. Para se estabelecer uma linha transgênica é necessário que as CEE transgênicas contribuam para a formação da linha germinal da quimera, só nesse caso é que a descendência das quimeras vai possuir o transgene. O indicador de contribuição à linha germinal é o facto de haver descendência com pelagem *agouti*, pois os embriões receptores são de uma linha albina (CD1) e as CEE da linha R1 são de uma linha com pelagem *agouti*. A presença de descendência com pelagem *agouti* é sinal de que as células germinais que lhe deram origem são derivadas das CEE transgênicas, tendo 50% de hipótese de serem transgênicos.

As quimeras obtidas foram cruzadas com animais CD1, machos ou fêmeas consoante o caso, e obtiveram-se crias com pelagem *agouti* nas linhas Nv6.1 e Nv2.1, que correspondem às duas linhas com maior percentagem de quimerismo da pelagem. Curiosamente a linha Nv3.2, uma quimera fêmea com 15% de quimerismo da pelagem, também demonstrou contribuição das CEE à linha germinal, tendo dado origem a uma cria *agouti* feminina em seis ninhadas. Este facto anormal, devido ao sexo das CEE, pode ter representado um evento

isolado de perda do cromossoma Y, dando origem a uma pequena contribuição das CEE para a linha germinal com genótipo XO, que consegue percorrer os passos da oogénese, ao contrário da linhagem XY que normalmente não consegue tal diferenciação.

A análise do padrão de expressão do repórter primário, *β geo*, revela se o local de integração do transgene é afectado por modificadores de expressão, como silenciadores ou *enhancers*. A expressão do repórter primário em embriões descendentes das linhas Nv6.1 e Nv2.1 é ubíqua, indicando que provavelmente não existem modificadores de expressão a afectar os *loci* de integração destas duas linhas. Como os níveis de expressão são semelhantes entre as duas linhas consideraram-se as linhas como equivalentes.

O facto de termos levado cerca de seis meses para produzir apenas duas linhas de animais transgénicos Z/EG-D114 fez com que procurássemos um método mais expedito de produção de animais transgénicos. Tal levou-nos a usar a técnica de microinjecção pronuclear.

Após o nascimento dos vinte e nove ratinhos resultantes fez-se o rastreio dos animais por PCR. O resultado indicou que três deles eram transgénicos, duas fêmeas e um macho.

A análise do padrão de expressão do repórter primário por coloração com X-Gal em embriões descendentes destas três linhas, de segunda geração no caso das fêmeas, indicou que também neste caso todas as linhas possuíam expressão ubíqua com intensidades equivalentes entre si. Por facilidade de cruzamentos decidimos usar apenas a linha de ratinhos gerada a partir do macho, a partir daqui designado por Z/EG-D114(FVB).

Capítulo 3 – Análise do efeito da sobre-expressão ubíqua de *Dll4* no desenvolvimento embrionário

3.1 – Objectivos

Após produção das linhas *Z/EG-Dll4*, iniciou-se a análise da função do gene *Dll4* com o cruzamento com a linha pCAGGS-Cre, produzindo assim uma sobre-expressão ubíqua de *Dll4*. Pretendia-se avaliar o funcionamento do transgene *Z/EG-Dll4* nas linhas *Z/EG-Dll4(CD1)* e *Z/EG-Dll4(FVB)*, e seleccionar apenas uma linha para os estudos subsequentes. A análise do fenótipo resultante deste cruzamento poderia também ajudar a revelar a importância de *Dll4* para o desenvolvimento embrionário, em geral, e vascular, em particular. A análise do fenótipo de sobre-expressão ubíqua de *Dll4* funciona, em primeira instância, como um ponto de comparação em relação ao objectivo principal da produção desta linha, a análise do fenótipo de sobre-expressão de *Dll4* específica ao endotélio. A confirmação dos fenótipos obtidos ao restringir a área de sobre-expressão, especificamente aos tecidos afectados, permitiria avaliar se os defeitos seriam autónomos ou não autónomos, conforme descrito no capítulo 4.

3.2 – Materiais e métodos

3.2.1 - *Material de origem animal:*

- **Embriões de ratinho:** Analisaram-se embriões resultantes de diversos cruzamentos.

Foram analisados embriões resultantes de vários cruzamentos:

- Cruzamento de fêmeas de ratinho (*Mus musculus*) da estirpe CD1 (Harlan Ibérica) com machos da linha *Z/EG-Dll4* (quimeras e heterozigóticos). CD1 é uma estirpe não consaguínea.
- Cruzamento de fêmeas de ratinho da linha CAGGS-Cre (Araki, 1996; (Niwa, *et al.*, 1991), (fundo genético CD1) com machos da linha *Z/EG-Dll4*. A linha CAGGS-Cre foi gentilmente cedida pelo Doutor Tristan Rodriguez do Laboratório de Desenvolvimento de Mamíferos, NIMR, Londres. Estes expressam a recombinase Cre sob o controlo do conjunto *enhancer* de citomegalovirus/promotor de β -actina de galinha (Araki, 1996)(Niwa, *et al.*,

1991). Tal conduz a uma expressão forte, ubíqua e constitutiva da recombinase *cre*.

Os ratinhos foram hospedados no biotério da Faculdade de Medicina Veterinária, em sistema sem barreiras. Toda a manipulação foi efectuada de acordo com a legislação Portuguesa, Portaria nº 1005/92.

3.2.2 - Estabelecimento de cruzamentos entre ratinhos

Para obtenção de embriões colocaram-se machos reprodutores de uma linha, com mais de cinco semanas, em gaiolas com fêmeas da linha pretendida, do mesmo tamanho ou menores, ao fim da tarde. Em geral, cada macho foi colocado em conjunto com duas a três fêmeas. Na manhã seguinte foram seleccionadas as fêmeas com rolhão vaginal e isoladas. O rolhão vaginal é produzido pelas secreções das glândulas vesiculares e coagulantes do macho, podendo apresentar-se como uma estrutura sólida de cor amarela ou branca na superfície da vagina ou numa posição mais profunda. Para a determinação do estágio de desenvolvimento considera-se que a fertilização ocorre cerca da meia-noite, num ciclo de escuridão entre as 17.00h e as 07.00. Ao meio-dia do dia seguinte, isto é, do dia em que se avalia a presença do rolhão vaginal, os embriões são datados como tendo 0,5 dias “*post-coitum*” (0,5 dpc). Ao meio-dia do dia seguinte os embriões terão 1,5dpc e assim sucessivamente. As idades pré-determinadas são confirmadas por contagem de número de sómitos (Kaufman, 1992).

3.2.2.1 - Colheita e dissecação de embriões

As fêmeas gestantes e isoladas foram sacrificadas por deslocação cervical ao fim da manhã no dia em que os embriões se encontravam no estágio a estudar, ou à hora correspondente à porção do dia correspondente ao estágio que era objectivo dissecar. Humedece-se o abdómen com etanol a 70% (v/v) e efectua-se uma incisão transversal no abdómen. Em seguida procede-se à extracção do útero para uma placa com PBS. Aí procede-se à individualização dos embriões, que estão cada um dentro da sua respectiva cripta uterina, e depois à remoção da camada muscular envolvente do útero, do tecido decidual, da placenta (ou cone ectoplacentário, no caso de embriões com 8,5 dpc), do saco vitelínico, do cordão umbilical e do saco amniótico.

3.2.3 - Extracção de ADN para genotipagem de ratinhos

Os animais nascidos permaneceram com as progenitoras até altura do desmame, que ocorreu entre as 3 e as 4 semanas. Nesse momento retirou-se a extremidade da cauda dos ratinhos e estes foram marcados com furos nas orelhas, correspondentes a um número específico.

Para obter ADN das biópsias de cauda, estas são colocadas em 750µl de solução de lise de caudas (0,1M Tris-HCl, 5mM EDTA, 0,2% SDS, 200mM NaCl) com 20µl de proteinase K (20mg/ml) e incubadas a 55°C durante a noite.

No dia seguinte adiciona-se 250µl de 5M NaCl e vortexa-se durante cinco segundos. Centrifugam-se os tubos durante dez minutos a 13000 rpm, numa microcentrífuga de bancada, e recolhe-se 850µl do sobrenadante para novos tubos. Em seguida adiciona-se 750µl de isopropanol e agita-se para misturar as soluções. Centrifugam-se os tubos durante dez minutos a 13000 rpm, numa microcentrífuga de bancada, para precipitar o ADN, e remove-se o sobrenadante. Lava-se o precipitado com 500µl de 70% etanol e centrifuga-se durante cinco minutos a 13000 rpm, numa microcentrífuga de bancada. Remove-se o sobrenadante e deixa-se secar os tubos ao ar. Ressuspende-se o ADN em 250µl de TE.

3.2.3.1 - Genotipificação por PCR

As reacções de PCR foram realizadas criando misturas de reacção com 5pmol de cada oligonucleótido iniciador, 5pmol de dNTPs (Sigma DNTP100A), 2U de Taq GE Healthcare 27-0799-61), 1µl de ADN genómico ressuspendido em TE, tampão comercial diluído à sua concentração nativa e água até perfazer 20µl.

Cada conjunto de misturas de reacção que partilham os mesmo oligonucleótidos iniciadores é colocado num termociclador e seguem um programa de temperaturas específico. As sequências de oligonucleótidos e programas de termociclador estão descritos no Anexo II.

O resultado, o produto da amplificação de uma sequência de ADN específica, é observado em electroforese de gel de agarose (ver 2.2.3).

3.2.4 - Fixação e inclusão de tecidos e embriões em gelatina

Após a recolha de tecidos ou embriões, estes precisam de ser fixados. A fixação é o processo químico que previne a degradação de tecidos biológicos para armazenamento estável e análise. A fixação bloqueia as reacções bioquímicas celulares em curso, em particular enzimas proteolíticas que de outra forma degradariam a amostra, aumentando a rigidez estrutural e a estabilidade dos tecidos e dos diferentes constituintes celulares nas suas posições originais. Os fixadores mais comuns são os da classe de fixadores de ligações cruzadas, como o formaldeído. Estes funcionam por criarem ligações covalentes, pontes de metileno, entre proteínas. Os fixadores desta classe preservam a estrutura secundária das proteínas e grande parte da estrutura terciária também, sendo esta a razão pela qual é benéfico fazer uma fixação curta quando o objectivo é a utilização do tecido para detecção de proteínas por anticorpos. Neste trabalho usou-se sempre uma variante do formaldeído, o paraformaldeído. A grande vantagem do paraformaldeído face ao formaldeído é que forma uma matriz celular menos fechada, promovendo a fixação eficiente das proteínas e a retenção dos ácidos nucleicos, mas permitindo ao mesmo tempo que anticorpos e sondas relativamente grandes consigam entrar nessa matriz celular, tornando possível a sua detecção. O paraformaldeído tem ainda a vantagem de ter autofluorescência baixa, ao contrário de outros membros desta classe de fixadores, como o glutaraldeído (Lawrence ; Singer, 1985).

O paraformaldeído apresenta-se na forma de um pó branco, sendo uma molécula polimérica grande, insolúvel à temperatura ambiente. É necessário despolimerizar o paraformaldeído para que este entre em solução, para isso é necessário hidrolisar o polímero. Para isso é preciso água, tampão fosfato como fonte de iões hidróxido, que actuam como catalisadores da reacção, e calor, cerca de 60°C.

O tempo de fixação varia consoante o objectivo para o qual as amostras vão ser usadas. No caso do objectivo ser o uso para imunohistoquímica ou imunofluorescência, a fixação é feita colocando o material biológico numa solução de 4% de paraformaldeído (Sigma P6148) em PBS, a 4°C, durante uma a duas horas, com agitação. No caso do objectivo ser o uso para hibridação *in situ*, a fixação é feita colocando o material biológico numa solução de 4% de paraformaldeído em PBS, a 4°C, durante a noite ou durante cerca de 16 horas, com agitação.

Os tecidos fixados podem ser analisados de duas formas, *in toto* ou seccionados. *In toto* corresponde a uma análise ao tecido, ou embrião, inteiro, em que se observam características morfológicas externas ou superficiais. O seccionamento permite observar

características morfológicas internas e externas na perspectiva de uma lâmina transversal muito fina. Quando a estrutura a analisar é complexa, que ocorre na maioria dos casos, é vantajoso analisar secções do tecido face à análise *in toto*.

Quando os tecidos são processados para análise *in toto*, após o período de fixação fazem-se duas lavagens em PBS, a 4°C, para remover o fixador em excesso, e de seguida os tecidos são desidratados numa série de soluções, com concentração crescente de metanol diluído em PBS, a 4°C, até se encontrarem em metanol puro. Nesse momento os tecidos podem ser armazenados a -20°C, até um ano.

Quando os tecidos são processados para análise por secções, estes são incluídos em matriz de gelatina. Esta matriz serve como suporte estrutural ao tecido durante a congelação e facilita o processo de corte, ao criar uma superfície geométrica. Após a fixação, os tecidos são lavados em PBS, a 4°C, para remover o excesso de fixador e de seguida são desidratados numa solução com 4% de sacarose (Sigma S0389) em PBS até o tecido perder fluabilidade. Em seguida os tecidos são colocados numa solução com 15% de sacarose em PBS até o tecido perder fluabilidade. Depois o tecido é colocado numa solução com 15% de sacarose e 7,5% de gelatina (Sigma G2500) em PBS a 37°C, para que a solução se mantenha no estado líquido, durante uma a duas horas consoante se tratem de embriões ou tecidos adultos. Após este tempo colocam-se os tecidos numa placa com uma base de solução de 15% de sacarose e 7,5% de gelatina em PBS solidificada, cobertos por uma gota de solução de gelatina, e deixa-se solidificar. Em seguida cobrem-se as gotas que contêm os tecidos com solução de 15% de sacarose e 7,5% de gelatina em PBS e deixa-se solidificar, durante cerca de 45 minutos. Após este tempo cortam-se paralelepípedos de gelatina contendo uma amostra isolada, com a orientação pretendida. Pretende-se que estes blocos de gelatina ultrapassem a superfície da amostra apenas o necessário para que se consiga manipular as secções sem tocar na amostra, quando se estiver na fase de corte. Quanto maiores forem os blocos mais difícil será conseguir uma congelação uniforme, eficiente e rápida do interior do bloco, e por isso do tecido. Os blocos são então colados a um quadrado de cartão que serve ao mesmo tempo como identificador do bloco e como face de orientação do bloco, que após a fase de congelação passa a ser opaco. Em seguida os blocos são congelados ao serem imersos em isopentano (Merck 1.06056.1000) arrefecido a -80°C com azoto líquido, durante 20 segundo a um minuto, conforme o tamanho do bloco. Os blocos congelados são armazenados a -80°C até serem cortados em crióstato.

3.2.5 - Criosecções

As amostras incluídas em matriz de gelatina congeladas foram crioseccionadas num crióstato Leica CM3050S, a -29°C. A espessura de secção foi 12µm, excepto onde notado. As lâminas onde se recolheram as criosecções têm de secar durante uma hora à temperatura ambiente antes de serem guardadas a -20°C em caixa de armazenamento com sílica.

3.2.6 – Produção de sondas de ARN

3.2.6.1 - Preparação de ADN molde para transcrição *in vitro*

As sondas de ARN complementar usadas em técnicas de hibridação *in situ*, são produzidas por transcrição *in vitro* de ADNc clonados em vectores de expressão. Normalmente esses vectores de expressão têm um local múltiplo de clonagem flanqueado por dois promotores virais, normalmente os promotores de bacteriófago T3, T7 ou SP6, em sentidos opostos.

Para cada plasmídeo, selecciona-se uma enzima de restrição que corte o vector, mas não o ADNc, no lado oposto ao promotor viral a usar para transcrever a sonda de ARN complementar. A execução desta restrição é essencial para que a sonda produzida contenha apenas a sequência de interesse ou muito pouco do vector em que foi clonada.

Após a restrição do plasmídeo, o ADN é extraído com fenol/clorofórmio e em seguida precipitado com acetato de sódio e etanol absoluto e lavado com 70% etanol. O ADN é então ressuspensionado em água bidestilada, livre de ARNases.

3.2.6.2 - Transcrição *in vitro*

Uma reacção típica de transcrição *in vitro* contém 400ng de ADN linearizado, 20U de inibidor de ribonucleases (Promega N2111), 200nmol de DTT (Sigma D9760), 10nmol de dNTPs (Roche 11 277 073 910), 25U de polimerase de ARN T3 (Roche 11 031 163 001), T7 (Roche 10 881 767 001) ou SP6 (Roche 10 810 274 001), tampão comercial específico diluído à sua concentração nativa, e água bidestilada livre de ARNases. Esta mistura é colocada a 37°C durante duas horas. Após este tempo adiciona-se 5 µl de uma solução com 10% SDS (Merck 1.13760.0100) e incuba-se a amostra a 80°C durante cinco minutos. Em

seguida adiciona-se 1/3 do volume final em 8M NiCl (Sigma N5756) e duas vezes e meia em etanol absoluto, e coloca-se a amostra a -80°C durante uma hora. Em seguida a amostra é centrifugada a 13000rpm durante 30 minutos numa microcentrífuga de bancada, a 4°C. Após a centrifugação descarta-se o sobrenadante e lava-se o precipitado com 70% etanol, centrifugando a 13000rpm durante cinco minutos. Em seguida remove-se o sobrenadante e deixa-se o precipitado secar ao ar durante 20 minutos, protegido de contaminações. Após este tempo ressuspende-se o ARNc em 10mM EDTA (Sigma E5134) pH8 e armazena-se a -20°C.

Sonda para o gene	Plasmídeo com o ADNc gentilmente cedido por:	Fragmento clonado	Enzima de restrição e polimerização
<i>dll1</i>	Dr Domingos Henrique	0,7Kb do ADNc, inclui o domínio DSL e as 2 primeiras repetições do domínio EGF	EcoRV Polimerase de ARN T3
<i>dll4</i>	Dr. Domingos Henrique	ADNc inteiro	EcoRV Polimerase de ARN T3
<i>notch1</i>	Dr. Domingos Henrique	1,4kb do ADNc, inclui o domínio NLR e parte dos motivos cdc10	EcoRI Polimerase de ARN SP6
<i>notch4</i>	Dra. Janet Rossant	1Kb do ADNc, inclui 9 repetições do domínio EGF	SmaI Polimerase de ARN T3
<i>ephrin-B2</i>	Dra. Janet Rossant	700pb	XbaI Polimerase de ARN T7
<i>ephb4</i>	Dra. Janet Rossant	1kb do ADNc, inclui o domínio de cinase de tirosinas	Sall Polimerase de ARN T7
<i>hey1</i>	Dr. Deepak Srivastava	ADNc inteiro	EcoRV Polimerase de ARN SP6
<i>hey2</i>	Dr. Deepak Srivastava	ADNc inteiro	EcoRV Polimerase de ARN SP6
<i>cx37</i>	Dra. Janet Rossant	978pb	SpeI Polimerase de ARN T7
<i>alk1</i>	Dra. Janet Rossant	1,9Kb	Sall Polimerase de ARN T7
<i>endoglin</i>	Dra. Janet Rossant	1,1Kb	HindIII Polimerase de ARN T7
<i>vegfr2</i>	Dr. Domingos Henrique	800pb do ADNc, inclui o domínio transmembranar e parte do domínio extracelular	XbaI Polimerase de ARN SP6

Tabela 21 – Descrição da origem e conteúdo dos plasmídeos usados para produzir sondas de ARNc para hibridação *in situ*.

3.2.7 - Hibridação *in situ*

A técnica de hibridação *in situ* é uma forma de hibridação, um processo de combinação de duas cadeias complementares de ácidos nucleicos em cadeia simples numa única molécula de cadeia dupla. Esta técnica usa uma molécula de ARN complementar marcada, uma sonda, para detectar a localização de moléculas de ARN mensageiro num tecido. As sondas usadas são moléculas de ARN marcadas com uracilos acoplados a digoxigenina, um esteróide apenas presente naturalmente como um metabolito secundário em plantas do género *Digitalis*. Por isso, os anticorpos anti-digoxigenina não apresentam ruído quando usados em tecidos com outras origens (Chevalier, *et al.*, 1997). Por ser uma molécula muito pequena, os nucleótidos acoplados a esta molécula não apresentam problemas ao serem

integrados na fase de transcrição *in vitro*. O sistema de hibridação *in situ* com nucleótidos acoplados a digoxigenina é muito sensível e permite que não se recorra a tecnologias de hibridação *in situ* radioactivas. Esta técnica tem por objectivo observar o padrão de expressão de um determinado gene.

3.2.7.1 - Hibridação *in situ* de criosecções

As lâminas com as criosecções são retiradas do congelador a -20°C e colocadas à temperatura ambiente, protegidas do pó, a descongelar durante uma hora. Ao fim de 50 minutos retira-se a solução de hibridação do congelador a -20°C e separa-se em alíquotas para cada sonda a usar. Adiciona-se a sonda de ARN respectiva a cada alíquota (diluída de 75 a 200 vezes consoante a alíquota de sonda, tem de ser testado para cada alíquota de sonda nova), vortexa-se e colocam-se as alíquotas a 80°C para desnaturar as sondas. Adiciona-se 100 a 120µl de solução de hibridação com sonda a cada lâmina e cobre-se com uma lamela. A hibridação ocorre a 62-65°C, durante a noite, em caixa selada com o fundo coberto por papel 3MM (Whatman) humedecido com uma solução de 1x sais/50% formamida (formamida - Sigma F7503), pré-aquecida.

Após a fase de hibridação efectua-se as lavagens da sonda não hibridada. As lavagens são feitas com 1xSSC pH7/50% formamida, em frascos Coplin de vidro, pré aquecida a 65°C. Efectua-se três lavagens, a primeira de 15 minutos, onde se deve garantir que as lamelas caem, e as duas seguintes de 30 minutos cada. Em seguida as lâminas são lavadas com TBST, à temperatura ambiente, duas vezes 15 minutos.

O bloqueio de ligações inespecíficas é feito colocando a solução de TBST + 2%BBR + 20% de soro de ovelha inactivado (BBR – Roche 11 096 176 001/ Soro de ovelha – Sigma S3772) sobre as lâminas, sem lamela, em câmara húmida. A fase de bloqueio dura duas horas. Após esta fase adiciona-se o anticorpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatase alcalina (Roche 11 093 274 910), diluído 1:2000 em solução de incubação, TBST + 2%BBR + 1% de soro de ovelha inactivado, às lâminas (100µl em cada) e cobrem-se com lamelas. As lâminas são colocadas em câmara húmida e ficam a 4°C durante a noite.

Após a fase de incubação com o anticorpo anti-DIG as lâminas são colocadas em frascos Coplin com TBST, à temperatura ambiente, para lavagem do anticorpo em excesso. São efectuadas cinco lavagens consecutivas, durando uma hora cada. A lamela deve cair na primeira lavagem. Em seguida as lâminas são lavadas duas vezes em NTMT, durante 15 minutos cada. As lâminas são reveladas colocando 120 µl de BMPurple (Roche 11 442 074

001) nas lâminas e cobrindo-as com lamela. As lâminas são então colocadas em câmara húmida a 32°C, no escuro, até se observar marcação. Em seguida as lâminas são lavadas duas vezes em PBS + 0,1% Tween20 (PBSW), durante dez minutos cada e depois lavadas com água destilada, para remover restos de sais de fosfato. Para preservação a longo termo as lâminas são montadas com Aquatex, um meio de montagem aquoso. Todas as soluções estão descritas no Anexo I.

3.2.8 - Imunohistoquímica e imunofluorescência de criosecções

Estas duas técnicas baseiam-se no uso de anticorpos específicos para uma determinada proteína, para detectar a localização dessa proteína num tecido.

As lâminas com as criosecções são retiradas do congelador a -20°C e colocadas à temperatura ambiente, protegidas do pó, a descongelar durante uma hora. Colocam-se as lâminas num frasco Coplin com PBS, em banho-maria a 37°C, durante 15 minutos, para remover a gelatina das criosecções. Em seguida as lâminas são lavadas duas vezes com PBS, durante cinco minutos cada. Após esse tempo as lâminas são colocadas em 3% H₂O₂ (Merck 1.07298.0250) em PBS durante 15 minutos à temperatura ambiente para inibir a acção das peroxidases endógenas, reduzindo assim o ruído de fundo na fase de revelação. Este passo só é efectuado no caso de se o protocolo ser relativo a imunohistoquímica com anticorpos secundários acoplados a HRP (peroxidase de rábano) (BD Pharmingen 554017). Depois as lâminas são lavadas duas vezes com PBS +0,1% Tween-20 (PBSW), durante dez minutos cada e em seguida são colocadas a bloquear em 2% albumina de soro bovino (Sigma A3311) e 5% de soro inactivado da espécie em que é produzido o anticorpo secundário a usar, em PBS. As lâminas ficam em câmara húmida, sem lamela, durante uma hora à temperatura ambiente. Após este tempo escorre-se a solução de bloqueio das lâminas e adiciona-se o anticorpo primário diluído em solução de bloqueio, sendo que o valor de diluição é específico para cada anticorpo [anti-PECAM1 (Parmlingen #557355) – 1:200; anti-SMA (Sigma A5228) – 1:100; anti-fibronectina (Sigma F3648) – 1:50; anti-laminina (Sigma L9393) – 1:50]. Cobrem-se as lâminas com lamelas e colocam-se as lâminas em câmara húmida a 4°C durante a noite.

No dia seguinte as lâminas são lavadas cinco vezes em PBSW, durante dez minutos cada, sendo que na primeira lavagem as lamelas têm de cair. Em seguida adiciona-se o anticorpo secundário específico para a espécie em que o anticorpo primário correspondente foi produzido, diluído em solução de bloqueio, sendo que o valor de diluição é específico para

cada anticorpo [anti-rat IgG conjugada com HRP (Pharmingen #554017) – 1:100; anticorpos secundários fluorescentes (Molecular Probes, Invitrogen) – 1:400]. Cobrem-se as lâminas com lamelas e colocam-se as lâminas em câmara húmida à temperatura ambiente durante uma hora. No caso de ser imunofluorescência, a partir deste momento todos os passos têm de ser efectuados abrigando as lâminas da luz directa.

Após o fim do tempo de incubação com o anticorpo secundário as lâminas são lavadas três vezes com PBSW, durante cinco minutos cada.

No caso de ser imunohistoquímica usou-se o Vector Peroxidase Substrate Kit DAB (SK-4100), segundo as instruções do fabricante, para revelar as lâminas. As lâminas foram lavadas com água destilada, desidratadas em série de etanóis e em xileno. Em seguida foram montadas com o meio de montagem Entellan.

No caso de ser imunofluorescência as lâminas são colocadas em 0,15µg/ml DAPI dilactato diluído em PBS, durante três minutos, no escuro. DAPI é um agente intercalador, que vai funcionar como marcador nuclear e por isso como agente de contraste e indicador da estrutura dos tecidos. Em seguida as lâminas são lavadas duas vezes com PBSW, durante cinco minutos cada, e depois montadas com o meio de montagem Mowiol. Todas as soluções estão descritas no Anexo I.

3.2.9 - Marcação de núcleos mitóticos com BrdU

O BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina) é um análogo de timidina, capaz de ser incorporado no ADN na fase S do ciclo mitótico. A utilidade do BrdU como marcador de células proliferativas reside na disponibilidade de anticorpos específicos para este nucleótido, capazes de marcar as células que o incorporaram.

Para que haja incorporação de BrdU nas células em proliferação dos embriões é necessário administrar, intraperitonealmente, uma solução de BrdU (Sigma B5002) à fêmea gestante, para que este entre em circulação e esteja em contacto com as células embrionárias em proliferação. As fêmeas gestantes são eutanasiadas algum tempo depois da injeção. A duração desse intervalo de tempo determina a quantidade de células que incorporam o BrdU, facto que depende da frequência de proliferação do tecido em estudo. No caso do endotélio embrionário, determinámos que um intervalo de duas horas entre a injeção e a eutanásia das fêmeas gestantes era suficiente para que se obtivessem cerca de 25% das células endoteliais em proliferação. Injectou-se 100µg de BrdU por grama de peso da fêmea gestante.

Este método detecta não só as células que estão em proliferação no momento da eutanásia, mas também as células que durante o intervalo de tempo completaram o ciclo mitótico e no momento de eutanásia já não se encontram em mitose.

O protocolo inicia-se com a descongelação das lâminas, colocando-as à temperatura ambiente durante uma hora. Em seguida as lâminas são colocadas em PBS a 37°C, em banho-maria, para remover a gelatina. As lâminas são depois lavadas duas vezes em PBS, à temperatura ambiente, durante cinco minutos cada e duas vezes em PBSW, durante dez minutos cada. Em seguida as lâminas são bloqueadas numa solução com 2% de albumina de soro bovino e 5% de soro de cabra em PBSW, durante uma hora à temperatura ambiente, em câmara húmida. Após este tempo escorre-se a solução de bloqueio das lâminas e adiciona-se o anticorpo primário anti-PECAM (BD Pharmingen 557355) diluído 1:100 em solução de bloqueio. Cobrem-se as lâminas com lamelas e colocam-se as lâminas em câmara húmida a 4°C durante a noite.

No dia seguinte as lâminas são lavadas cinco vezes em PBSW, durante dez minutos cada, sendo que na primeira lavagem as lamelas têm de cair. Em seguida adiciona-se o anticorpo secundário anti-rato, feito em cabra, acoplado ao fluorocromo Alexa 555 (Molecular Probes A21434), diluído 1:400 em solução de bloqueio. Cobrem-se as lâminas com lamelas e colocam-se as lâminas em câmara húmida à temperatura ambiente durante uma hora. No caso de ser imunofluorescência, a partir deste momento todos os passos têm de ser efectuados abrigando as lâminas da luz directa.

Após o fim do tempo de incubação com o anticorpo secundário as lâminas são lavadas três vezes com PBSW, durante cinco minutos cada. As lâminas são colocadas em 0,15µg/ml DAPI dilactato diluído em PBS, durante três minutos, no escuro. DAPI é um agente intercalador, que vai funcionar como marcador nuclear e por isso como agente de contraste e indicador da estrutura dos tecidos. Em seguida as lâminas são lavadas duas vezes com PBSW, durante cinco minutos cada. As lâminas são fotografadas, montadas apenas em PBS, indexando cada foto a uma coordenada na lâmina correspondente. Com estas fotos fazem-se as contagens do número de núcleos endoteliais por secção de aorta.

Após se terem fotografado as lâminas, estas são fixadas em 4% paraformaldeído em PBS, durante cinco minutos e em seguida são lavadas duas vezes em PBS, durante cinco minutos cada.

Para expor os epítomos do BrdU é necessário proceder à desnaturação do ADN cromossómico. Tal é conseguido colocando as lâminas numa solução com 50% formamida em SSC pH7, em frasco Coplin a 65°C, durante duas vezes 30 minutos. Após este tempo as

lâminas são lavadas em PBS à temperatura ambiente, durante cinco minutos. Em seguida efectua-se a hidrólise ácida do ADN cromossómico, colocando as lâminas numa solução de HCl 2N, a 37°C, durante 30 minutos. Após este tempo as lâminas são lavadas três vezes numa solução de 0,1M Tris-HCl pH8,3, para neutralizar o ácido, durante cinco minutos cada e depois são lavadas duas vezes em PBS, durante cinco minutos cada. Em seguida as lâminas são bloqueadas com uma solução de 2% albumina de soro bovino e 10% de soro de cabra em PBS, durante uma hora à temperatura ambiente, em câmara húmida. Após o fim do tempo de bloqueio, as lâminas são incubadas com uma diluição de 1:1000 de anticorpo anti-BrdU (Sigma B2531), feito em ratinho, em solução de bloqueio, durante a noite a 4°C, em câmara húmida.

No dia seguintes as lâminas são lavadas cinco vezes em PBSW, durante cinco minutos cada e em seguida são incubadas com uma diluição de 1:400 de anticorpo anti-ratinho e anticorpo anti-cabra, feitos em coelho e burro respectivamente, acoplados aos fluorocromos Alexa 488 (Molecular Probes A21210) e 594 (Molecular Probes A11058) respectivamente, durante uma hora à temperatura ambiente, em câmara húmida. Após esta incubação as lâminas são lavadas três vezes com PBS, durante dez minutos cada e em seguida são incubadas com uma diluição de 1:400 de anticorpo anti-coelho, feito em cabra, acoplado ao fluorocromo Alexa 488 (Molecular Probes A11008), durante uma hora à temperatura ambiente, em câmara húmida. No fim da incubação as lâminas são lavadas três vezes com PBS, durante dez minutos cada e em seguida são montadas com o meio de montagem Mowiol.

As lâminas são de novo fotografadas, tendo em atenção a correspondência com as imagens tiradas anteriormente e contam-se os núcleos de células endoteliais positivos para marcação com BrdU.

As contagens do número de células (núcleos) endoteliais não pode ser feita ao mesmo tempo que a contagem do número de células (núcleos) com marcação positiva para BrdU pois o tratamento efectuado ao tecido para detectar o BrdU desnatura o ADN, impossibilitando que o DAPI, que é um agente intercalador de ADN, possa ligar-se eficientemente ao ADN do núcleo. Todas as soluções estão descritas no Anexo I.

3.2.10 – Detecção de células apoptóticas – Método TUNEL

A apoptose consiste num processo fisiológico de morte celular, necessária e totalmente regulada para a manutenção da homeostasia de todo o organismo. A apoptose pode ser

activada por vários factores como a remoção de sinais químicos da célula (factores de crescimento ou de sobrevivência), o ignorar de mensagens químicas por alguns receptores internos e externos, ou pela presença de sinais com informação contraditória.

A célula em apoptose encolhe-se, destaca-se das células vizinhas e começa a apresentar bolhas na sua superfície (zeiose). A membrana, os organelos e o citoplasma não mostram alterações evidentes, ao contrário do que acontece no processo de necrose. No entanto, no núcleo observa-se uma fragmentação da cromatina, formando-se um ou mais aglomerados nas bordas internas da membrana nuclear, o que é suficiente para levar as células à morte. Os corpos apoptóticos formados são posteriormente fagocitados pelos linfócitos, podendo o material celular ser reciclado.

O método TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase Fluorescein-dUTP Nick End Labeling*) é usado para detectar a fragmentação internucleosomal de uma ou ambas as cadeias de ADN, induzida por endonucleases dependentes de Ca/Mg nos estádios iniciais de apoptose.

O protocolo inicia-se com a descongelação das lâminas, colocando-as à temperatura ambiente durante uma hora. Em seguida as lâminas são colocadas em PBS a 37°C, em banho-maria, para remover a gelatina. As lâminas são depois lavadas duas vezes em PBS, à temperatura ambiente, durante cinco minutos cada e de seguida executa-se o protocolo de imunofluorescência para PECAM, como descrito acima. Depois, as células são permeabilizadas com 0,1% Triton X-100 (Fluka 93426) e 0,1% citrato de sódio (Sigma C8532) em PBS durante dois minutos a 4°C, e incubadas em mistura de reacção TUNEL (Roche Applied Science 11684795910), que contém a TdT (Transferase terminal de deoxinucleótidos) e fluoresceína-dUTP, durante 60 minutos a 37°C no escuro. Durante a incubação, a TdT catalisa a adição de fluoresceína-dUTP a grupos 3'OH livres nas moléculas de ADN. Após esta incubação, as secções são lavadas três vezes com PBS, durante cinco minutos cada e em seguida marcadas com DAPI e montadas em Mowiol.

A avaliação dos níveis de apoptose é feita por contagem do número de células, que sejam, ao mesmo tempo, positivas para PECAM e para TUNEL, células endoteliais em apoptose, e contando também o número de células positivas para PECAM e DAPI, número total de células endoteliais.

3.2.11 - Coloração de embriões com X-Gal

Os embriões pequenos (<10,5 dpc) são fixados em *LacZ fix*, no gelo e com ligeira agitação, durante 15 a 30 minutos, consoante o tamanho.

Os embriões com mais do que 10,5 dpc de idade são fixados numa solução de 2% de paraformaldeído, 0,2% de glutaraldeído em PBS, num agitador de cilindros em câmara fria a 4°C, durante 30 minutos. Em seguida usa-se um bisturi para fazer um corte longitudinal no embrião para permitir a entrada do segundo fixador e posteriormente da solução de coloração. Os embriões são então colocados em *LacZ fix*, no agitador de cilindros em câmara fria, a 4°C, durante 30 a 60 minutos, consoante o tamanho.

A função dos fixadores paraformaldeído e glutaraldeído é formarem ligações cruzadas entre grupos amina de moléculas adjacentes. Estabelecem assim pontes entre proteínas e entre proteínas, o que estabiliza o material biológico e faz com que a β -galactosidase fique só nos tecidos em que é expressa.

Em seguida, para ambos os casos, fazem-se três lavagens de dez minutos, no agitador de cilindros à temperatura ambiente, com tampão de lavagem. Este contém dois detergentes aniónicos e vai ser responsável pela remoção dos agentes fixadores. Este passo revela-se muito importante pois o glutaraldeído é um inibidor da acção da β -galactosidase. No caso de embriões de 8,5 dpc as lavagens são feitas em gelo com suave agitação.

Os embriões são então colocados numa solução de coloração que contém X-Gal (um galactósido que ao ser clivado pela β -galactosidase dá origem ao um cromogéneo de cor azul), e são colocados numa incubadora a 37°C (no escuro, pois o X-Gal degrada-se rapidamente quando exposto à luz) durante a noite.

No dia seguinte fazem-se três lavagens de dez minutos em PBS no agitador de cilindros e os embriões podem ser guardados em tampão de lavagem (por curtos períodos de tempo) ou PBS com 0,1% Azida de Sódio (Fluka 71289) (para longos períodos de tempo), no frigorífico.

3.2.12 - Hibridação *in situ* de embriões *in toto*

Inicia-se o protocolo rehidratando os embriões. Para isso os embriões são colocados sucessivamente em soluções com concentração decrescente de metanol em PBSW, 75%, 50% e 25%, durante cinco minutos cada. Os embriões são lavados duas vezes em PBSW, durante

cinco minutos cada. Após as lavagens em PBSW os embriões são colocados numa solução com 10µg/ml de proteinase K (Roche 03 115 879 001) em PBSW durante cinco a quinze minutos, conforme o tamanho dos embriões (nove minutos para embriões com 9 dpc). Este passo tem por objectivo abrir poros nas membranas celulares e desestabilizar a matriz extracelular, de forma a permitir a penetração da sonda em profundidade no embrião. Após o tempo de incubação remove-se a solução de proteinase K e faz-se uma lavagem rápida com PBSW e em seguida os embriões são re-fixados, durante 20 minutos, numa solução de 4% paraformaldeído e 0,1% de glutaraldeído em PBSW. Após o tempo de fixação faz-se uma lavagem rápida dos embriões e em seguida uma lavagem de cinco minutos com PBSW. Em seguida os embriões são colocados em tubos de vidro com uma solução de 50% PBSW em Mistura de hibridação, que é depois substituída por Mistura de hibridação duas vezes. Os tubos são então colocados numa estufa a 65°C durante uma hora. Após este tempo substitui-se a Mistura de hibridação por uma solução de Mistura de hibridação com sonda de ARN marcada com digoxigenina a uma concentração de 1µg/ml, previamente aquecida, e colocam-se os tubos em estufa a 65°C durante a noite.

Após o tempo de incubação fazem-se duas lavagens rápidas com Mistura de hibridação pré-aquecida a 65°C e em seguida os embriões são lavados duas vezes com mistura de hibridação pré-aquecida a 65°C, durante 30 minutos cada. Após estas lavagens os embriões são colocados numa solução de 50% TBST em Mistura de hibridação, pré-aquecida a 65°C, durante dez minutos. Em seguida os embriões são lavados duas vezes em TBST, à temperatura ambiente, durante 15 minutos cada e depois substitui-se por uma solução com 2% BBR e 20% soro de ovelha em TBST, ficando a incubar durante duas horas à temperatura ambiente. Após a fase de bloqueio remove-se a solução de bloqueio e substitui-se por uma solução com 2% BBR e 1% soro de ovelha em TBST e em seguida por 2% BBR e 20% soro de ovelha em TBST com uma diluição de 1:2000 de anticorpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatase alcalina e coloca-se a incubar durante a noite a 4°C.

Após a incubação com anticorpo os embriões são lavados três vezes rapidamente com TBST e transferidos para tubos de vidro de 20ml. Fazem-se quatro lavagens com TBST, durante uma hora cada e em seguida duas lavagens com NTMT, durante dez minutos cada. Os embriões são então colocados em BM purple, protegidos da luz, para revelar o sinal, a 32°C. Quando se atinge a revelação pretendida os embriões são lavados três vezes com PBSW e re-fixados com 4% paraformaldeído e 0,2% glutaraldeído em PBSW, durante a noite a 4°C, e armazenados em 0,1% azida de sódio em PBSW. Todas as soluções estão descritas no Anexo I.

3.2.13 - Imunohistoquímica de embriões in toto

Os embriões desidratados são colocados numa solução de 0,3% de peróxido de hidrogénio em metanol durante 30 minutos à temperatura ambiente, para bloquear a actividade das peroxidases endógenas. Em seguida os embriões são colocados sucessivamente em soluções com concentração decrescente de metanol em PBSW, 75%, 50% e 25%, durante trinta minutos cada e depois, duas vezes em PBS durante trinta minutos cada. As lavagens de re-hidratação são efectuadas a 4°C.

Para fazer o bloqueio das ligações inespecíficas, colocam-se os embriões duas vezes numa solução com 2% de leite em pó e 0,2% de triton X-100 em PBS, durante uma hora cada vez, à temperatura ambiente. Após este tempo substitui-se a solução de bloqueio por solução de bloqueio contendo o anticorpo primário, Pharmingen rat anti-mouse PECAM1 –CD31-monoclonal MEC13.3, numa diluição de 1:200 e incubam-se os embriões durante a noite a 4°C.

Após a incubação com o anticorpo primário os embriões são lavados uma vez, rapidamente, com solução de bloqueio, seguido de três vezes com solução de bloqueio a 4°C, durante uma hora cada vez, seguido de duas vezes com solução de bloqueio à temperatura ambiente, durante uma hora cada. No fim destas lavagens retira-se a solução de bloqueio e substitui-se por solução de bloqueio contendo o anticorpo secundário, Pharmingen goat anti-rat HRP conjugated (BD Pharmingen 554017), numa diluição de 1:100, e incubam-se os embriões durante a noite a 4°C.

No dia seguinte lavam-se os embriões três vezes, durante uma hora cada, em solução de bloqueio a 4°C e duas vezes, durante uma hora cada, à temperatura ambiente, com solução de bloqueio.

Após as lavagens lavam-se os embriões três vezes, durante 20 minutos cada, em 0,2% Triton X-100 em PBS. Em seguida os embriões são colocados em solução DAB (kit Vector DAB SK-4100), 5ml 0,2% Triton X-100 em PBS + 4 gotas de DAB + 2 gotas de NiCl₂, durante 20 minutos, seguindo instruções do fabricante. Para iniciar a revelação adiciona-se duas gotas de peróxido de hidrogénio, seguindo instruções do fabricante, e espera-se pelo aparecimento do sinal, colocando os embriões abrigados da luz. Quando se obtém a revelação pretendida lavam-se os embriões com 0,2% triton X-100 em PBS durante dez minutos e re-fixam-se os embriões em 4% paraformaldeído e 0,2% glutaraldeído em PBS durante a noite, a 4°C. Após a fixação os embriões são lavados com PBS e armazenados em 0,1% azida de sódio em PBS a 4°C.

3.2.14 – Microscopia

Todas as imagens obtidas no espectro de luz visível foram captadas pela câmara Olympus C-4040 acoplada a um microscópio Olympus CX40 ou a uma lupa Olympus SZX12.

A imagens de fluorescência em secções foram captadas por uma câmara digital Leica DC 350F acoplada a um microscópio de fluorescência Leica DM5000B, existente na Unidade de Biologia do desenvolvimento do Instituto de Medicina Molecular, Universidade de Lisboa. Todas as imagens foram processadas no programa Adobe Photoshop 9.0 CS.

3.3 – Resultados

3.3.1 - Cruzamento das linhas pCAGGS-Cre com a linha Z/EG-Dll4

Cruzaram-se fêmeas da linha Z/EG-Dll4(CD1) e Z/EG-Dll4(FVB) com machos da linha pCAGGS-Cre e sacrificaram-se as fêmeas gestantes entre os 8.5 e os 14.5 *dias post coitum* (dpc). Os embriões recolhidos foram separados com base no facto de emitirem ou não luz verde quando expostos a luz azul, com comprimento de onda de 495nm, que corresponde ao pico de excitação do repórter EGFP. A EGFP é co-expressa com *dll4* nas células em que tenha ocorrido recombinação pela recombinase Cre. Assim embriões com fluorescência em todo o organismo são considerados duplos transgênicos (DT) (Z/EG-delta4^{+/-} + pCAGGS-Cre^{+/-}), sobre-expressando *Dll4* de forma generalizada, e embriões não fluorescentes são considerados controlos negativos para as actividades experimentais subsequentes.

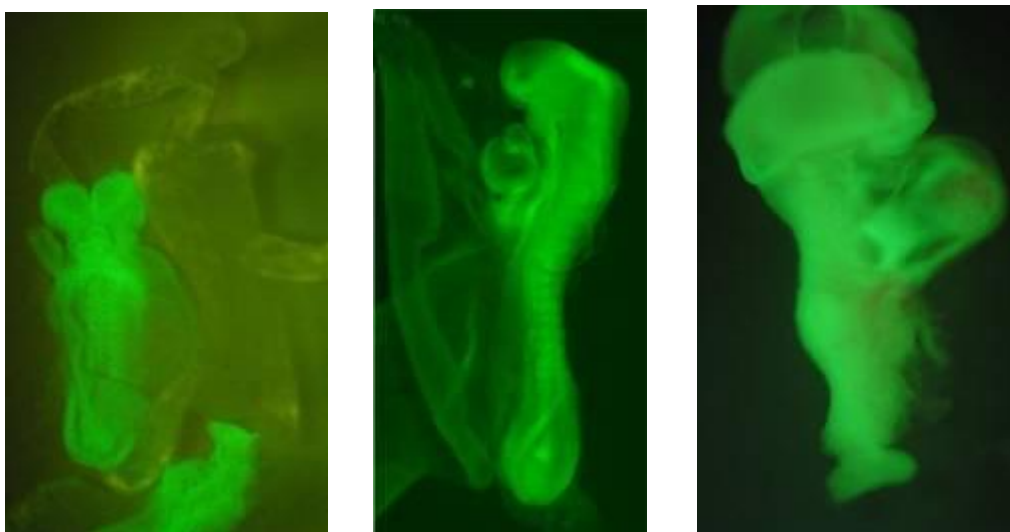


Figura 36 – Expressão generalizada de EGFP nos embriões DT aos 8 dpc (esq.), 8,5 dpc (meio) e 9,5 dpc (dir.).

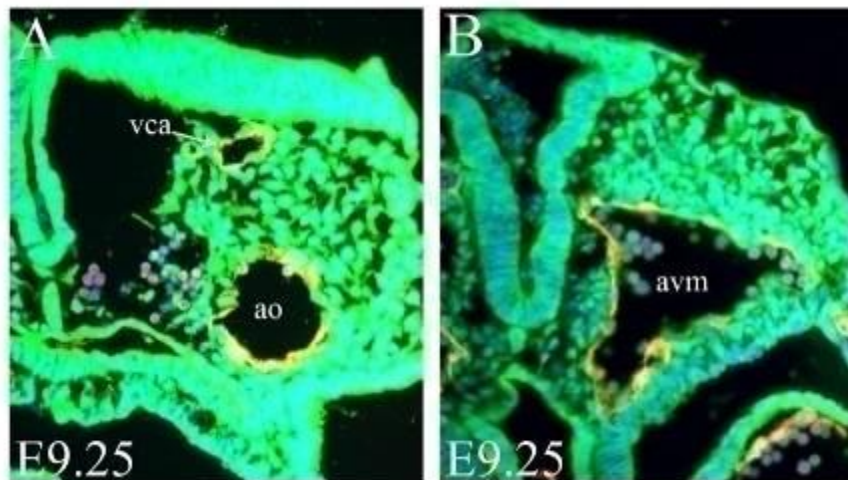


Figura 37 – Imunofluorescência para PECAM (vermelho) em embriões DT com 9,25 dpc, demonstrando que todas as células expressam EGFP, incluindo as células endoteliais, que aparecem a amarelo por sobreposição dos dois canais de fluorescência. DAPI a azul. ao, aorta dorsal; vca, veia cardinal anterior; avm, malformação artério-venosa.

Os níveis de fluorescência obtidos com as linhas *Z/EG-Dll4(CD1)* e *Z/EG-Dll4(FVB)* foram equivalentes e o fenótipo obtido com ambas as linhas foi idêntico. Problemas com os cruzamentos em fundo genético FVB (muito baixa fertilidade, alta frequência de abortos espontâneos) levaram a que as experiências seguintes fossem feitas com animais em fundo genético CD1.

A análise no microscópio de dissecação Olympus ZX-12 de embriões duplos transgênicos (DT), fluorescentes, sem marcação histológica revelou que estes têm vários defeitos morfológicos, quando comparados com embriões controle. Nos embriões DT não ocorre fusão do tubo neural nas três regiões encefálicas, proencéfalo, diencéfalo e metaencéfalo, representando um grave defeito craniofacial com exencefalia e divisão facial. Existem também defeitos ao nível da somitogênese, 18% dos embriões DT apresentam sómitos com formas irregulares e 85% dos embriões DT não completam o processo de enrolamento embrionário.

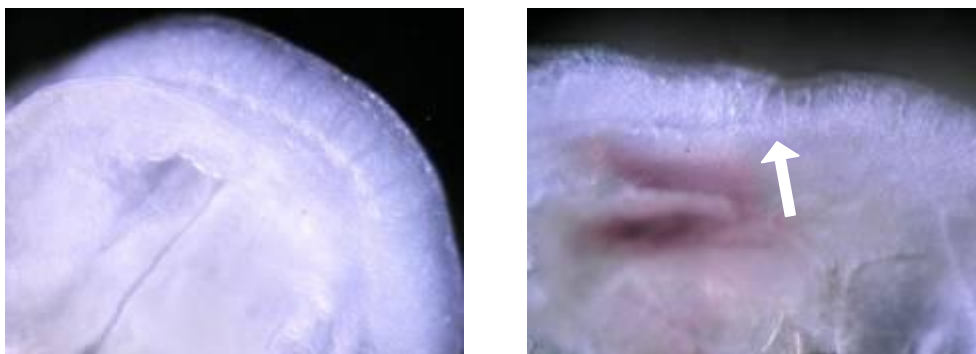


Figura 38 – Defeitos na somitogênese dos embriões DT. Embriões controlo (esq.) e DT (dir.) com 8,5 dpc. O embrião DT revela a presença de formas irregulares de sómitos, comparando com as formas regulares encontradas nos sómitos do embrião controlo.

Estes embriões apresentam atrasos de crescimento, aparentes a partir dos 8,5 dpc, em que dois terços dos embriões analisados apresentam onze sómitos e um terço apresenta doze sómitos, contrastando com os embriões controlo, em que três sétimos apresentam onze sómitos e quatro sétimos apresentam doze sómitos. Este atraso no crescimento torna-se mais aparente aos 9,5 dpc, em que os embriões DT apresentam em média dezassete sómitos e os embriões controlo apresentam em média vinte e seis sómitos.

Aos 8,5 dpc os embriões DT distinguem-se pelo atraso no início do enrolamento embrionário, apresentando-se tipicamente numa forma linear. Na região ventral posterior nota-se a ocorrência de hemorragias.

Aos 9,0 dpc os embriões DT distinguem-se por serem mais pequenos que os embriões controlo, por não completarem o fecho do tubo neural na região cefálica e por apresentarem enrolamento incompleto e bidirecional, sendo que não se verifica a tendência natural da região posterior enrolar pelo lado direito do embrião. O coração dos embriões DT também apresenta um defeito de rotação embrionária, em que existe igual probabilidade do ventrículo ficar virado para a esquerda ou para a direita, quando o normal é ele apontar para a direita. Nestes embriões encontram-se hemorragias ao longo do corpo, em especial na região cefálica, região dos arcos aórticos e na região ventral, e edema na região dorsal e no pericárdio. A membrana vitelina dos embriões DT apresenta-se pálida e sem a árvore vascular típica desta estrutura extra-embrionária.

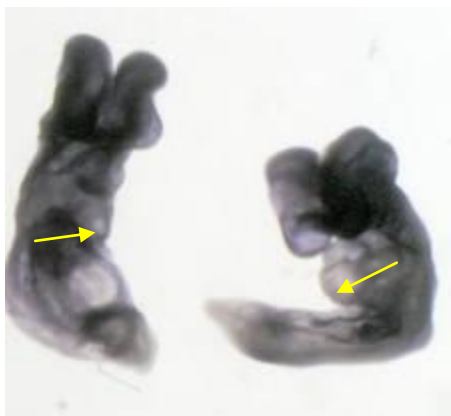


Figura 39 – Embriões DT com 9,0 dpc revelando ambiguidade na direção de rotação corporal e cardíaca. Setas apontam orientação do ventrículo.

Aos 9,5 dpc os embriões DT apresentam um atraso no desenvolvimento ainda mais pronunciado, com hemorragias mais extensas e edema mais pronunciado. A região posterior destes embriões está atrofiada.

Aos 10 dpc os embriões DT apresentam edemas grandes na região cefálica e um atrofiamento pronunciado da região posterior.

Aos 10,5 dpc só 18% dos embriões DT apresentam batimento cardíaco.

Aos 11,5 dpc não se encontram embriões DT vivos.

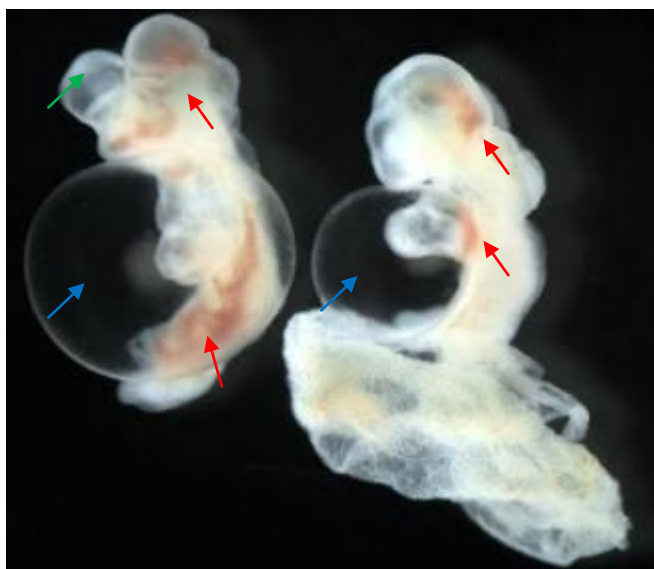


Figura 40 – Embriões DT com 9 dpc. Observa-se o tubo neural aberto na região cefálica (seta verde), *turning* incompleto, dilatação do pericárdio (seta azul) e hemorragias extensas ao longo dos embriões (setas vermelhas).

3.4.3 - Análise imunohistoquímica de embriões inteiros e criosecções

Para analisar o impacto da sobre-expressão de Dll4 no desenvolvimento vascular embrionário fizemos uma análise imunohistoquímica dos embriões DT e controlo com um anticorpo anti-PECAM (Pharmingen), cuja molécula alvo, PECAM1 está presente em todas as células endoteliais (Jackson, 2003).

Os embriões DT apresentam hipertrofia das aortas dorsais (AD) a partir dos 8,75 dpc.

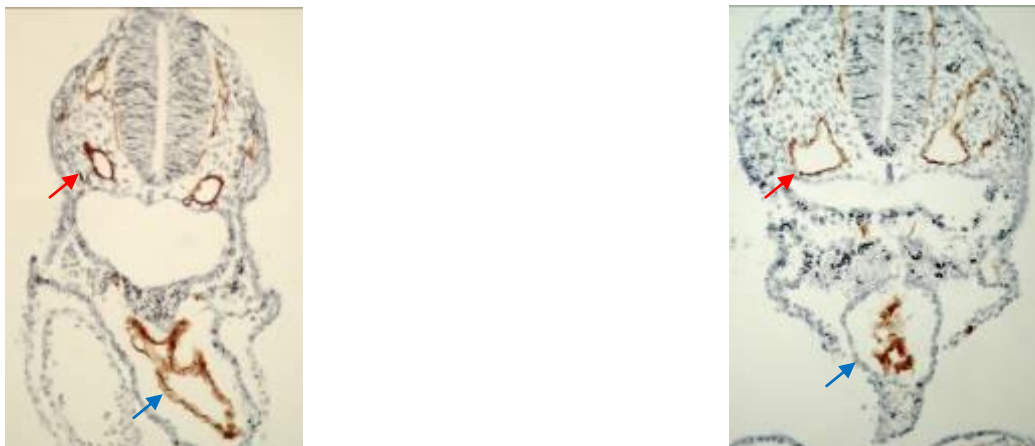


Figura 41 – Criosecções de embriões controlo (esq.) e DT (dir.) aos 8,75 dpc com imunohistoquímica para PECAM. Nos embriões DT as AD são maiores que nos embriões controlo (setas vermelhas). Note-se também a forma linear do tubo cardíaco (setas azuis) a este estágio, quando os embriões controlo equivalentes já iniciaram o *turning* cardíaco.

A hipertrofia das AD continua a manifestar-se enquanto os embriões se desenvolvem, tornando-se progressivamente mais evidente.

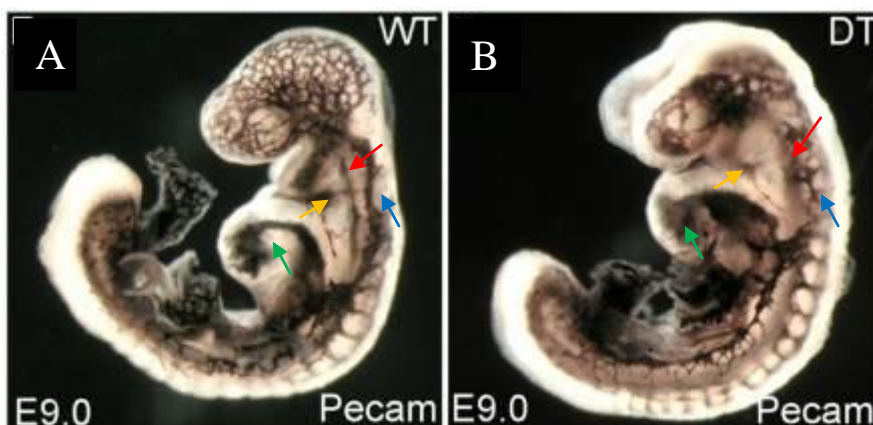


Figura 42 - Embriões controlo (A) e DT (B) aos 9 dpc com imunohistoquímica para PECAM. No embrião DT nota-se a AD aumentada (setas vermelhas), VCA ramificada (setas azuis), tubo cardíaco dilatado (setas verdes) e diminuição da segunda e terceira artéria dos arcos branquiais (setas laranjas).

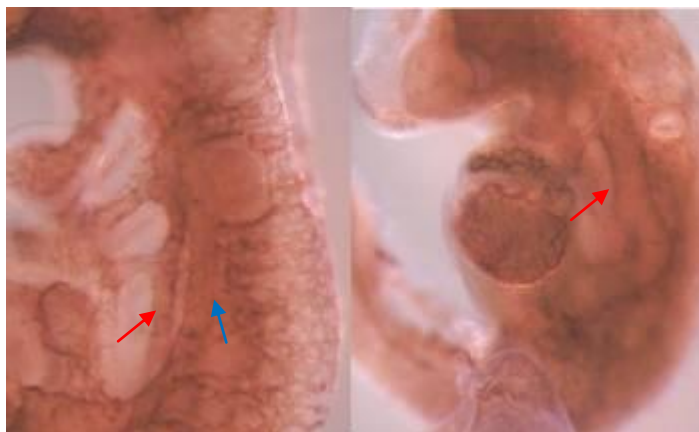


Figura 43 - Embriões controlo (esq.) e DT (dir.) aos 9,5 dpc com imunohistoquímica para PECAM. Note-se a forte hipertrofia da AD (seta vermelha) e ausência de VCA discreta no embrião DT (seta azul).

Os embriões DT só apresentam a artéria do primeiro arco branquial funcional. Os embriões DT chegam a formar a segunda e terceira artérias dos arcos branquiais mas estas são muito atrofiadas, quando comparadas com os embriões controlo.

Os embriões DT demonstram uma ausência de organização hierárquica da vasculatura vitelínica, com manutenção do plexo vascular primário. Nos embriões controlo nota-se que a vasculatura primária foi reorganizada numa rede vascular hierárquica, com vasos de menor calibre a afluírem em vasos de maior calibre e uma clara distinção entre vasculatura arterial e venosa.

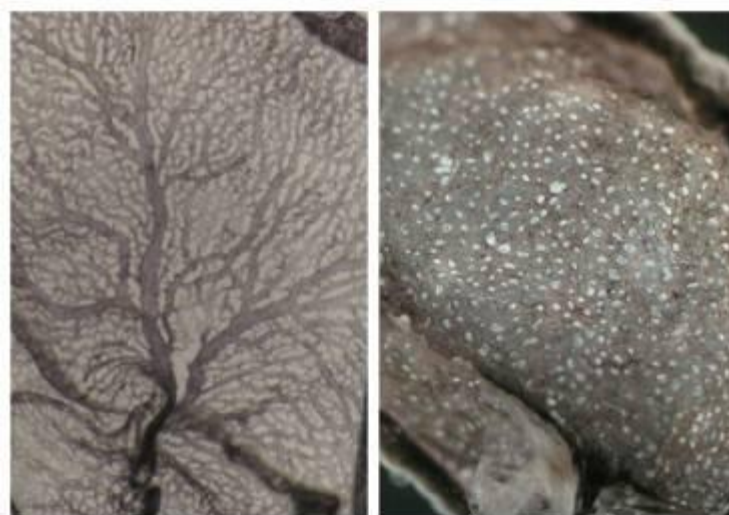


Figura 44 – Membranas vitelinas de embriões controlo (esq.) e DT (dir.) aos 9 dpc com imunohistoquímica para PECAM. Note-se a ausência de organização vascular na membrana vitelina DT, que não chega a formar o padrão hierárquico patente na membrana vitelina do embrião controlo.

As VCA dos embriões DT não aparentam formar um vaso discreto, mesmo aos 9,5 dpc, quando os embriões controlo já têm VCA bem desenvolvidas e com lúmen apreciável.

Os embriões DT apresentam também defeitos na organização da vasculatura da região cefálica, que se apresenta desorganizada e com menos ramificações vasculares.

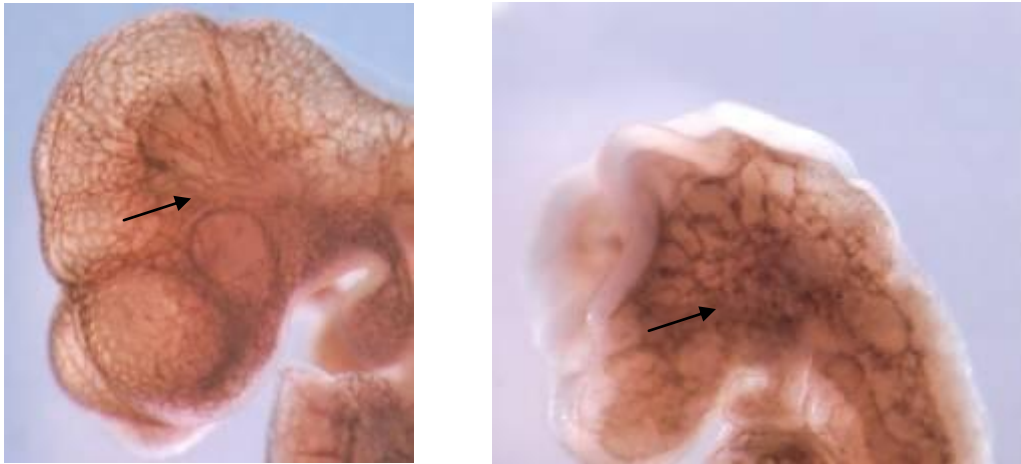


Figura 45 – Vasculatura cefálica de embriões controlo (esq.) e DT (dir.) aos 9,5 dpc com imunohistoquímica para PECAM. A região cefálica dos embriões DT apresenta uma vasculatura desorganizada (setas pretas).

A análise do resultado de imunohistoquímica anti-PECAM em criosecções de embriões revelou que as aortas dorsais dos embriões DT contactam com as VCA, na região do tracto de entrada do tubo cardíaco e assim estabelecem uma ligação directa entre as AD e o átrio cardíaco, através do seio venoso. Este tipo de malformações foram entretanto descritas em mutantes de perda de função em *dll4* (Duarte, *et al.*, 2004, Krebs, *et al.*, 2004) e em mutantes de perda de função em *endogлина* e *Alk1* (Sorensen, *et al.*, 2003).

Na figura 46 pode ver-se a estrutura capilar da VCA em regiões anteriores ao seio venoso, que se re-estrutura para formar um vaso discreto com lúmen antes de fundir com a AD e com o seio venoso.

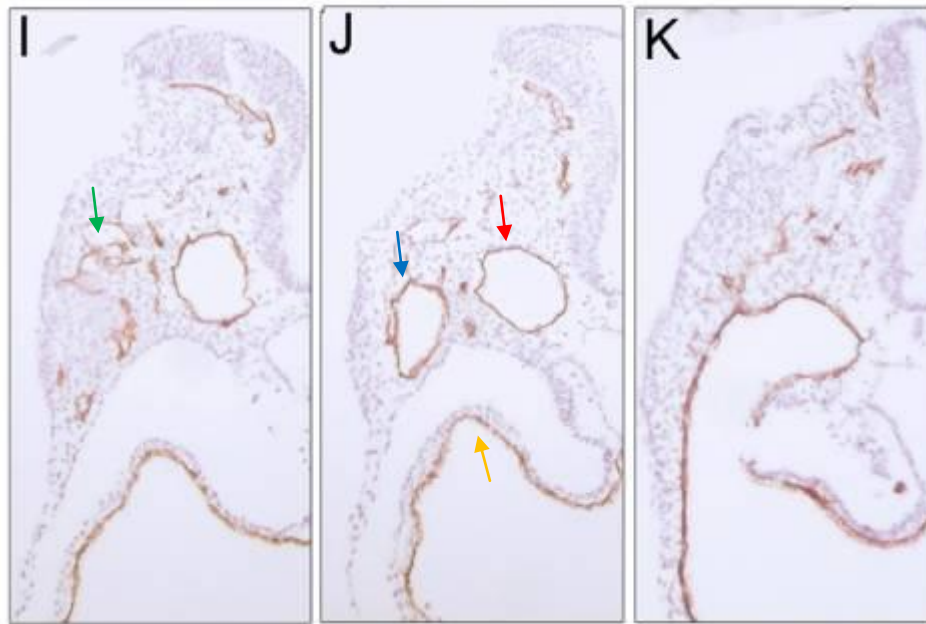


Figura 46 – Malformações artério-venosas em embriões DT. Criosecções de embriões DT aos 9,5 dpc com imunohistoquímica para PECAM. Note-se a ausência de um vaso discreto na posição das VCA em regiões mais anteriores (seta verde). A VCA forma um vaso discreto apenas junto ao seio venoso (seta azul), quando se funde com a AD (seta vermelha) e depois com o seio venoso (seta laranja), estabelecendo assim uma ligação directa entre as AD e o átrio cardíaco.

Quando os embriões DT atingem os 10 dpc, começam a formar estruturas vasculares dilatadas ao longo de todo o embrião. Em alguns casos a região cefálica dos embriões DT é apenas composta por neuroepitélio e uma cavidade forrada de células endoteliais.

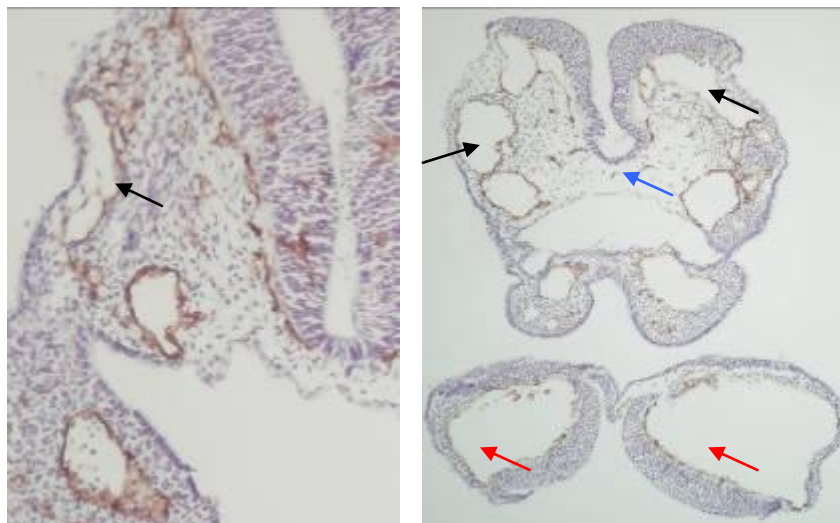


Figura 47 – Criosecções de embriões controlo (esq.) e DT (dir.) aos 10 dpc com imunohistoquímica para PECAM. Note-se a hipertrofia generalizada de estruturas vasculares ao longo da secção transversal do embrião DT feita ao nível da base da região cefálica/primeiro arco branquial. Note-se o surgimento de regiões acelularizadas no embrião DT.

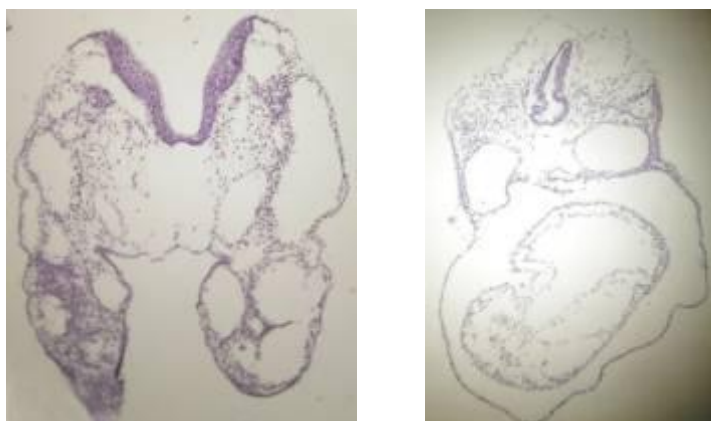


Figura 48 - Criosecções de embriões DT aos 10,5 dpc com imunohistoquímica para PECAM. Note-se a presença de extensas estruturas tubulares revestidas a endotélio na região cefálica (esq.) e AD hipertrofiadas ao nível do tronco do embrião (dir.).

3.4.4. - Microangiografia em embriões

Para analisar a funcionalidade das fusões entre as AD e as VCA recorreremos à técnica de microangiografia com tinta-da-china. Este protocolo envolve a injeção de uma solução com 20% de tinta-da-china (Pelikan) em PBS no ventrículo do coração de embriões com 9.0 dpc.

Para executar esta técnica é necessário criar agulhas de injeção de vidro muito finas. Este processo é feito aquecendo e esticando as pontas de pipetas de Pasteur feitas em vidro.

Após a injeção, o batimento cardíaco encarrega-se de fazer a tinta-da-china seguir o percurso natural do sangue, marcando efectivamente o percurso de circulação sanguínea.

Nos embriões controlo a tinta-da-china sai do coração pelas artérias dos arcos branquiais e entra nas AD, seguindo para a região cefálica e para a região posterior, acabando por escoar nas VCA e voltar ao coração pelo seio venoso.

Nos embriões DT o sangue sai do coração pelas artérias dos arcos branquiais e segue para a região cefálica e para a região posterior pelas AD. Nestes embriões, quando a tinta chega à região do seio venoso ela passa para as VCA e entra no coração pelo seio venoso, devido à existência de uma fusão entre as AD e as VCA. A maior parte do fluxo de tinta corre de volta ao coração pelo ponto de fusão e muito pouca tinta acaba por seguir em direcção às regiões mais posteriores do embrião. Tal já havia sido evidenciado nos resultados com as marcações com o anticorpo anti-PECAM pois em regiões posteriores à ocorrência das fusões artéria-veia as AD, que anteriormente estavam hipertrofiadas, ficam muito reduzidas. Na altura lançou-se a ideia que provavelmente tal seria devido a não passar muito sangue por

aquela região devido à pressão negativa exercida pelo batimento cardíaco sobre o sangue arterial através da fusão artéria-veia, o que parece verificar-se com este resultado. Tal também pode explicar a razão pela qual a região posterior vai ficando mais curta com o passar do tempo apesar de não acontecer o mesmo com outras partes dos embriões DT.

Esta técnica confirmou que a fusão artério-venosa observada por marcação histoquímica é funcional, sendo responsável pelo estabelecimento de uma microcirculação em que pouco sangue chega às regiões posteriores do embrião.

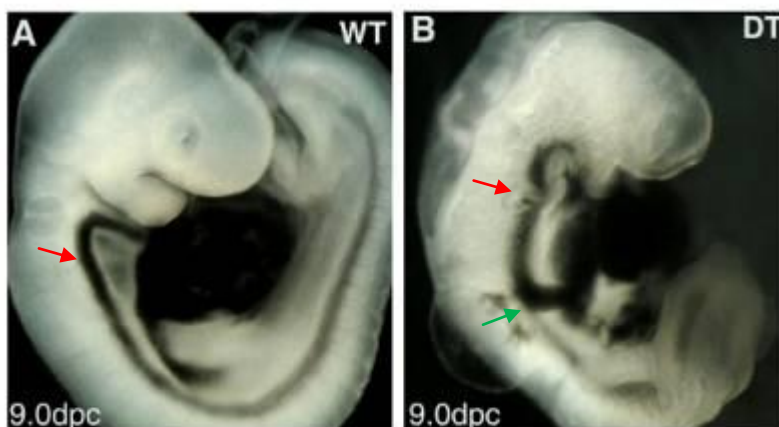


Figura 49 - Microangiografia em embriões controlo (A) e DT (B) aos 9 dpc. Os embriões DT desenvolvem fusões entre as AD (seta vermelha) e as VCA cedo no desenvolvimento embrionário, sendo que esta ligação (seta verde) se revela completamente funcional em termos de circulação sanguínea.

3.4.5 - Estudo da expressão de marcadores moleculares do endotélio arterial e/ou venoso

Para avaliar o impacto da sobre-expressão de *dll4* no padrão de expressão de genes específicos dos endotélios arterial e venoso recorreu-se essencialmente à técnica de hibridação *in situ*. Esta técnica permite marcar histoquimicamente as células em que haja expressão de um determinado gene, através do uso de sondas de ARN *antisense* marcadas com uracilos acoplados a um hapteno, a digoxigenina. Esta técnica foi aplicada a embriões com 9.0 dpc pois com embriões mais velhos a deterioração destes torna difícil a execução da técnica e com embriões mais novos torna-se difícil ter sinal suficiente para se ter a certeza de um resultado.

3.4.5.1 - Produção de sondas de ARN antisense

Os plasmídeos contendo os ADNc necessários para a produção das sondas para a maioria dos genes estudados foram-nos enviados de outros laboratórios, tendo funcionado em hibridação *in situ* como esperado. Contudo verificámos que existem casos em que os ADNc que são distribuídos pela comunidade científica não são de qualidade suficiente para a

obtenção de sondas com uma boa relação sinal/ruído em hibridação *in situ*. Os casos mais importantes foram os de *Eph-B4* e *Notch1*, para estes foram estudadas novas sequências de ADNc para serem usadas como molde para a produção de sondas específicas para estes genes.

Há vários pormenores a ter em conta no processo de escolha de uma sequência apropriada para ser usada como molde para produção de sondas. Deve-se por exemplo escolher uma região do gene que não seja muito conservada, para evitar o cruzamento de sinal com o de outros genes que partilhem uma sequência muito homóloga.

Para *Eph-B4* foi escolhido um fragmento *Sall-EcoRI* do clone de ADNc N°4188592 do consórcio IMAGE, correspondendo a uma sequência de 1466pb (início ao nucleótido 1055, fim a 2521), (entre os aminoácidos (aa) 204 e 693) que abarca os domínios FN3 (domínio de fibronectina tipo 3), transmembranar e o princípio do domínio cinase de tirosinas (78aa). Este fragmento foi clonado em pKS e para produzir sonda de ARN *antisense* a partir dele cliva-se o ADN plasmídico com *Sall* e transcreve-se com polimerase de ARN de fago T7. Foi dado o nome de Eph-B4 A1.5 a esta sonda.

Para *Notch1* foi escolhido um fragmento *BamHI-EcoRV* do clone de ADNc NM_008714, correspondendo a uma sequência de 2168pb (início ao nucleótido 4205, fim a 6373), (entre os aa 1375 e 2097) que abarca os domínios NL (repetições de Notch/lin-12), transmembranar e parte das repetições de domínios de ankirina (CDC10). Este fragmento foi clonado em pKS e para produzir sonda a partir dele cliva-se o ADN plasmídico com *BamHI* e transcreve-se com polimerase de ARN de fago T3. Foi dado o nome de Notch1 A1.1.2 esta sonda.

Por hibridação *in situ* confirmou-se que ambas estas sondas dão uma melhor relação entre sinal e ruído, em relação às sondas que tínhamos anteriormente, ao mesmo tempo que mantêm a identidade de sinal.

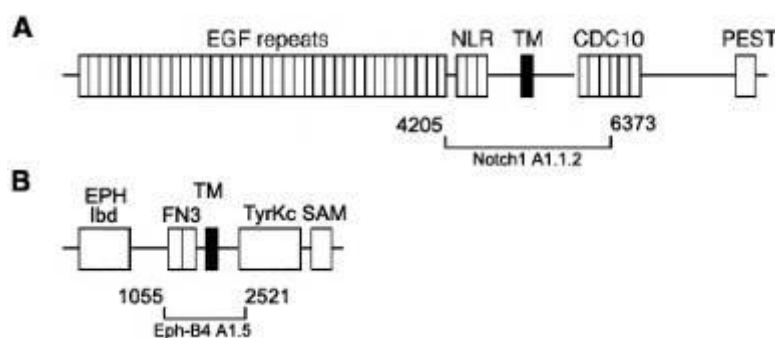


Figura 50 - Esquema dos ADNc de *notch1* e *eph-B4* com referência aos domínios proteicos codificados por estes. As linhas horizontais por debaixo de cada esquema referem-se às regiões escolhidas para servirem de molde para a produção de sondas de ARN *antisense* específicas. A) ADNc de *notch1*, a região escolhida engloba 2168pb que codificam os domínios NLR, TM e parte dos domínios CDC10 (ankirina). B) ADNc de *eph-B4*, a região escolhida engloba 1466pb que codificam os domínios FN3, TM e início do domínio de TyrKc (cinase de tirosinas). Esquemas não estão à escala. Adaptado de (Conlon, *et al.*, 1995).

3.4.5.2 - Resultados de hibridação *in situ*

Existem pelo menos dois tipos de causas possíveis para a origem do fenótipo de fusões arterio-venosas observadas nos embriões DT, causas originadas por alteração nas forças hemodinâmicas ou causas originadas na expressão ectópica de genes responsáveis pela diferenciação ou separação de identidade endotelial. Como o fenótipo de fusões arterio-venosas foi observado também em embriões com 8,25 dpc, antes do início do batimento cardíaco decidimos analisar o padrão de expressão de genes reconhecidos por serem marcadores específicos do endotélio arterial e/ou venoso. Analisaram-se padrões de expressão de alguns genes da via Notch, Ephrin, VEGF e TGF- β , para além de *Connexina-37*. Apesar de alguns destes genes não terem expressão unicamente no endotélio, neste momento apenas se vai referir esta parte do seu padrão de expressão.

Os marcadores endoteliais arteriais estudados foram *Connexina-37* (van Kempen ; Jongsma, 1999) e *Ephrin-B2* (Wang, *et al.*, 1998). Em ambos os casos, nos embriões DT estes marcadores apareceram a marcar o endotélio arterial e o venoso, ao contrário dos embriões WT em que só se detectou a expressão destes genes no endotélio arterial.

O marcador endotelial venoso estudado foi *Eph-B4* (Wang, *et al.*, 1998). Os resultados das hibridações *in situ* para *Eph-B4*, o receptor transmembranar do ligando *ephrin-B2*, indicaram que nos embriões DT não se detecta expressão deste gene no endotélio venoso, ao contrário do que é verificado nos embriões controlo. Este resultado indica a ocorrência de uma diminuição na intensidade de expressão deste gene nos embriões DT.

Para estudar qual a influência da sobre-expressão de *Dll4* no padrão de expressão de outros genes da Via Notch fizeram-se hibridações *in situ* para *Notch1* (Villa, *et al.*, 2001), o principal receptor Notch no endotélio e *Hey1* (Leimeister, *et al.*, 1999), um dos factores de transcrição da família de *enhancer of split* cuja expressão no endotélio já foi confirmada como sendo directamente correlacionada com a actividade da via Notch (Tsunematsu, *et al.*, 2003). *Notch1* é expresso nas AD e VCA até aos 8,75 dpc e a partir desse estágio passa a ser expresso só nas AD. *Notch4* é expresso sempre especificamente no endotélio arterial.

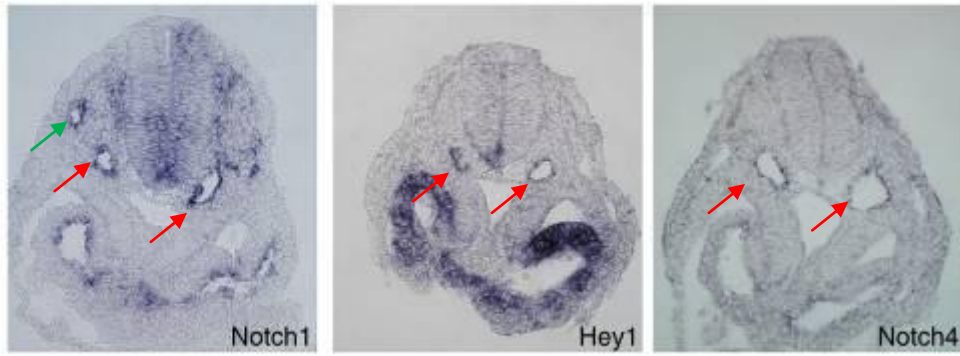


Figura 51 – Expressão de *notch1*, *hey1* e *notch4* em embriões controle com 8 dpc. *Notch1* é expresso nas AD (seta vermelha) e VCA (seta verde), *hey1* e *notch4* são expressos só nas AD.

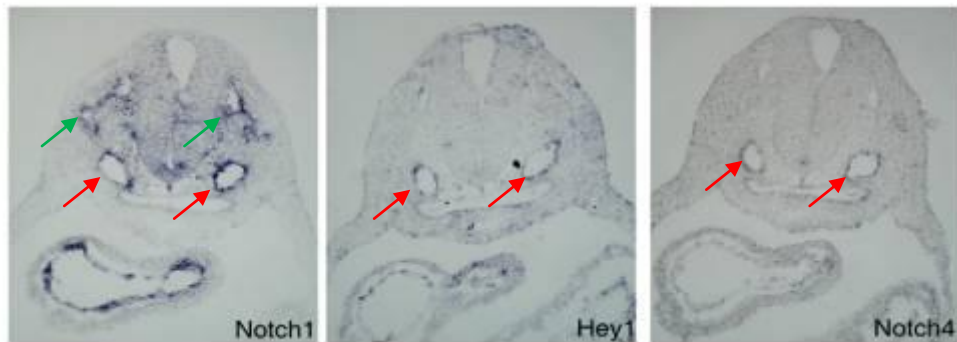


Figura 52 – Expressão de *notch1*, *hey1* e *notch4* em embriões controle com 8,5 dpc. *Notch1* é expresso nas AD (seta vermelha) e VCA (seta verde), *hey1* e *notch4* são expressos só nas AD.

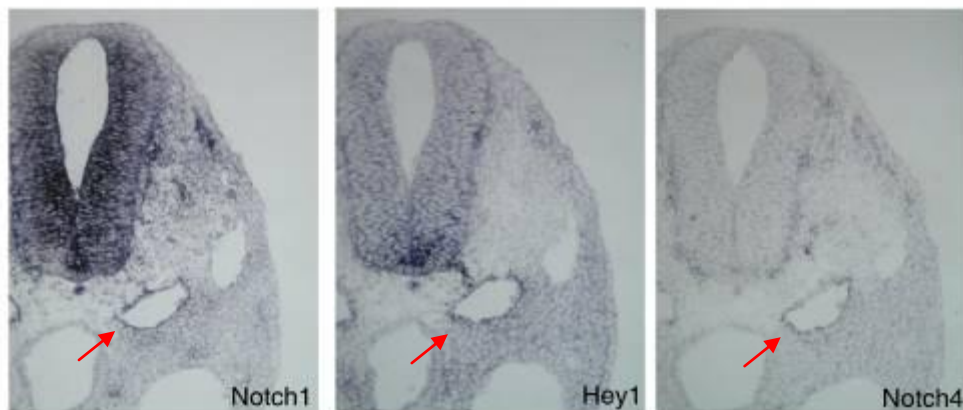


Figura 53 – Expressão de *notch1*, *hey1* e *notch4* em embriões controle com 9,5 dpc. *Notch1*, *hey1* e *notch4* são expressos só nas AD (seta vermelha).

No estágio em que analisamos os embriões DT, quer *Notch1* como *Hey1* são expressos especificamente no endotélio arterial dos embriões WT, no entanto nos embriões DT estes genes são expressos também no endotélio venoso, indicando que nos embriões DT a expressão de *Notch1* não é desligada nas VCA. Tal facto é provavelmente resultado de nos embriões DT existir expressão ectópica de *Dll4* nas VCA, que ao activar a sinalização Notch aí, indicado por haver expressão ectópica de *hey1* nas VCA, impede o desligar da sua expressão.

A expressão de *Flk1*, que codifica VEGF-R2, um gene com expressão generalizada forte no endotélio, apresenta-se reduzida nos embriões DT em relação aos embriões controlo.

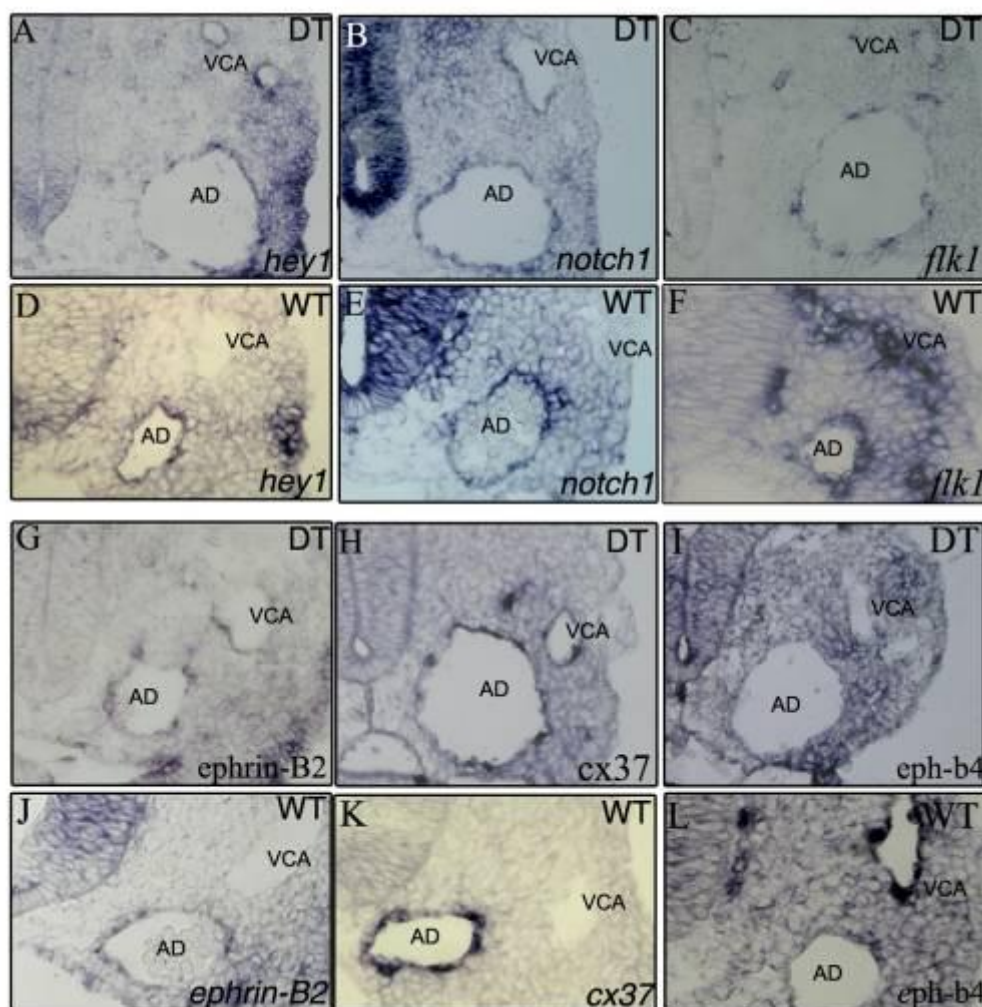


Figura 54 - Hibridação in situ de criosecções de embriões controlo e DT com 9.0 dpc. (A,D) ARNm de *hey1*, (B,E) ARNm de *notch1*. *Notch1* e *hey1* são expressos nas AD e VCA dos embriões DT. Nos embriões controlo (D,E) *notch1* e *hey1* são apenas expressos nas AD. (C,F) ARNm de *flk1* está diminuído nos embriões DT em relação aos WT. (G,J) ARNm de *ephrin-b2*, (H,K) ARNm de *connexin37*. *Ephrin-B2* e *connexin-37* são expressos nas AD e VCA dos embriões DT. Embriões controlo (J,K) expressam estes genes apenas no endotélio das AD. (I,L) ARNm de *eph-B4* não é detectado nas VCA dos embriões DT apesar de estar presente nas VCA de embriões controlo (L).

Uma pergunta que também se tentou responder foi se haveria uma ligação entre a via Notch e a via de TGF- β . Esta pergunta é relevante pois mutantes de perda de função em genes

que codificam receptores e co-receptores de TGF- β , *Alk-1* (Urness, *et al.*, 2000) e *Endoglin* (Sorensen, *et al.*, 2003) respectivamente, também têm um fenótipo composto por um bloqueio generalizado da angiogênese e existência de malformações arterio-venosas. Ambos estes genes têm expressão generalizada no endotélio dos embriões WT e a sua expressão mantém-se quer nas artérias como nas veias dos embriões DT, indicando que a especificidade da expressão de genes da via TGF- β não aparenta ser afectada por mutantes da via Notch.

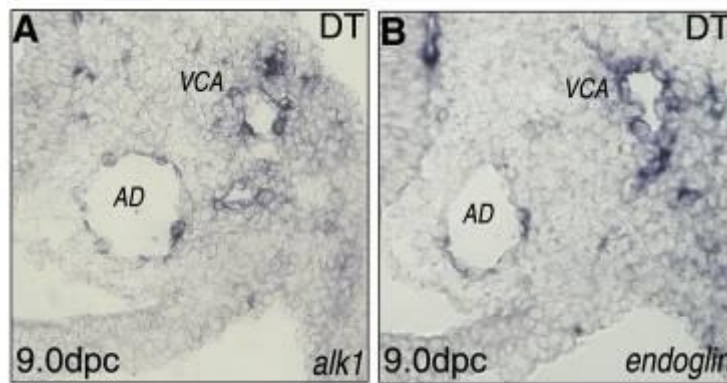


Figura 55 – Expressão de endoglin e *alk1* permanece nas AD e nas VCA dos embriões DT. Hibridação *in situ* em criosecções de embriões DT com 9 dpc.

Para testar se a sobre-expressão de *dll4* afectava a expressão de outros genes *delta* executaram-se hibridações *in situ* com ribosondas para *Dll1*. Os resultados indicam que nos embriões DT deixa de haver expressão de *Dll1* na porção posterior dos sómitos e no tubo neural ou esta fica muito mais fraca nesses locais, no entanto na mesoderme pré-somítica mantém-se a expressão forte de *Dll1*.



Figura 56 - Hibridação *in situ* com ribosonda para *dll1* em embriões com 9,5 dpc. À esquerda: embrião controlo com marcação na mesoderme presomítica (seta preta), tubo neural (seta amarela) e parte posterior de cada sómito (seta verde). Nas 3 fotos à direita: embriões DT com marcação na mesoderme presomítica. Note-se a ausência de marcação nos sómitos e no tubo neural dos embriões DT.

3.4.6 – Estudo da estrutura cardíaca

Sabendo que existem defeitos circulatórios nos embriões DT, analisou-se o coração destes embriões, para detectar possíveis defeitos estruturais.

Os embriões DT apresentam trabeculação miocárdica reduzida nos ventrículos, distensão do átrio e ausência de células nas almofadas do tracto de saída do coração. Nos embriões DT acumulam-se cardiomiócitos na periferia do ventrículo, que não entram nas trabeculações.

O tracto de saída do coração dos embriões DT também apresenta-se alterado, nestes apenas se formam as artérias dos primeiros arcos branquiais, que têm um diâmetro semelhante ao das aortas dorsais, estando por isso, hipertrofiadas. As artérias dos segundos arcos branquiais estão bastante reduzidas ou ausentes destes embriões até à sua morte.

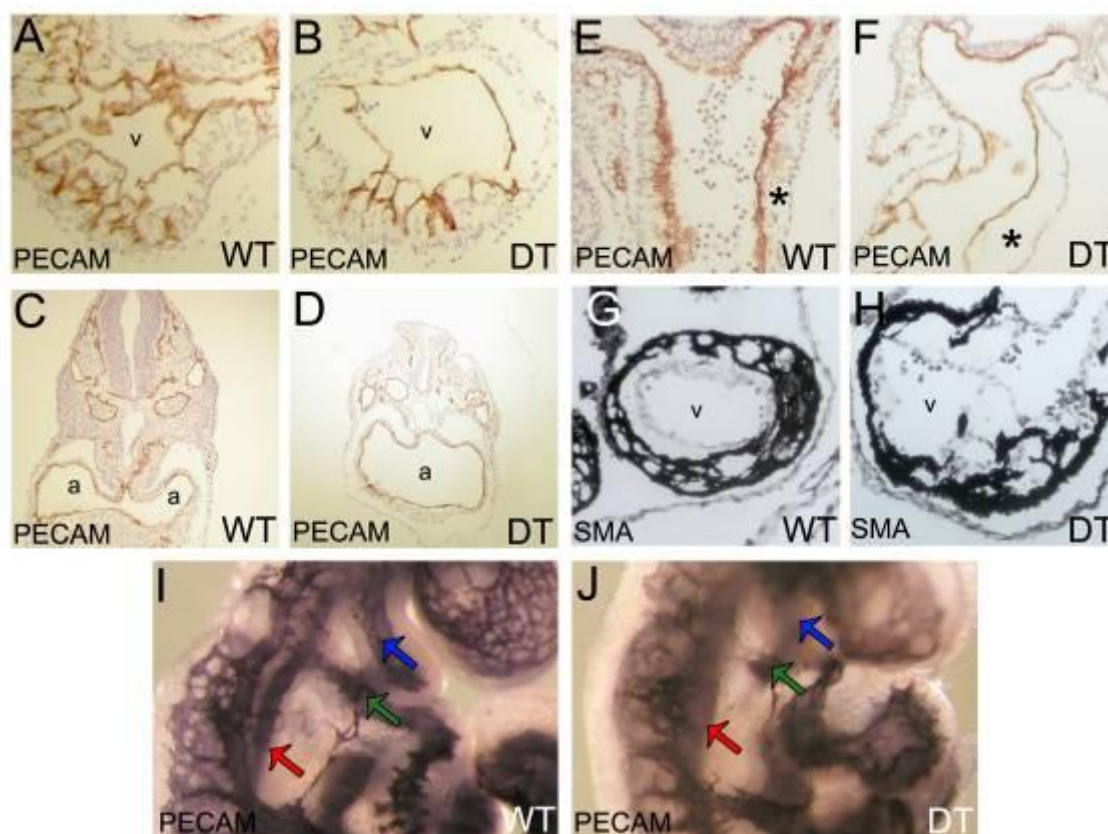


Figura 57 – Defeitos cardíacos em embriões DT. Marcação de imunohistoquímica com anticorpos específicos para PECAM e SMA em criosecções de embriões WT e DT com 9,5 DPC. (A) Ventrículo cardíaco (v) de embrião WT. (B) Ventrículo cardíaco (v) de embrião DT, revelando trabeculação reduzida. (C) Átrio cardíaco (a) de embrião WT. (D) Átrio cardíaco (a) de embrião DT hipertrofiado, em relação a (C). (E) Tracto de saída do coração de embrião WT. (F) Tracto de saída de embrião DT demonstrando acelularização das almofadas (*). (G) Ventrículo cardíaco (v) de embrião WT com imunohistoquímica para SMA. (H) Ventrículo cardíaco (v) de embrião DT revelando a existência de uma agregação de cardiomiócitos na periferia do ventrículo e uma distribuição irregular de cardiomiócitos pelas trabeculações, em relação a (G). Marcação de imunohistoquímica com anticorpos específicos para PECAM e SMA em embriões inteiros a 9,5 dpc. (I) Imagem da região peri-cardíaca de embrião WT, com aorta dorsal (seta vermelha) e artérias dos primeiros (seta azul) e segundos (seta verde) arcos branquiais. (J) Imagem da região peri-cardíaca de embrião DT, revelando a presença de uma artéria do primeiro arco branquial (seta azul) de igual calibre à aorta dorsal hipertrofiada (seta vermelha), e uma artéria do segundo arco branquial (seta verde) muito reduzida ou não existente.

3.4.7 - Estudo da formação e recrutamento de células de músculo liso

Este estudo baseou-se na técnica de imunohistoquímica com anticorpos anti-SMA (Sigma A2547), um marcador de células de músculo liso. Nos embriões, as células de músculo liso diferenciam-se a partir do mesênquima e migram para a superfície do endotélio onde se agregam e formam uma camada de músculo liso que é responsável, em parte, pela integridade dos vasos (Hungerford, *et al.*, 1996).

Estudou-se a presença de células de músculo liso nos embriões controlo aos 9.0 dpc e só se encontrou sinal positivo nos cardiomiócitos e à volta da artéria umbilical. Procurou-se então a sua presença em embriões com 9.5dpc e nestes já se encontrou marcação nas AD dos embriões controlo. Nos embriões DT não se detectou a presença de células de músculo liso nas AD até aos 9.5dpc, indicando que existe um defeito na diferenciação ou na sinalização para migração de células de músculo liso em diferenciação.

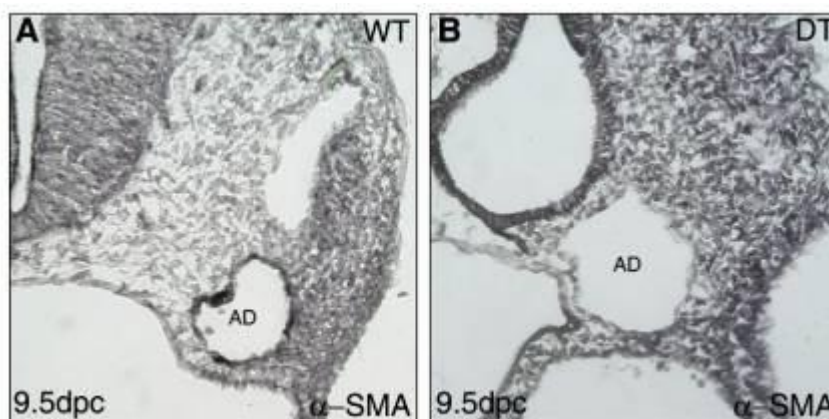


Figura 58 - Marcação de células de músculo liso com anticorpo específico para actina de músculo liso (SMA). A) Nos embriões WT a marcação é evidente à volta da AD. B) Nos embriões DT não se observa marcação com este anticorpo, o que indica que a 9.5dpc não existem células de músculo liso diferenciadas à volta das AD.

3.4.8 - Estudo do efeito da sobre-expressão de Dll4 na proliferação das células endoteliais

A análise dos embriões DT revelou que todos eles tinham AD hipertrofiadas em relação aos embriões controlo. Restava saber se tal era devido a uma dilatação do vaso em si, devido a um aumento na pressão interna do vaso, criada pela existência de uma circulação sanguínea mais curta, ou a uma alteração na taxa de proliferação endotelial. Para discernir

entre estas hipóteses calculou-se a taxa de proliferação endotelial arterial nos embriões mutantes e nos embriões controlo com nove a dez sómitos. Nesta idade os embriões ainda não têm uma circulação sanguínea forte e por isso não há factores extrínsecos ao endotélio a afectar o seu desenvolvimento. Nos embriões DT só se analisaram AD não fundidas com as VCA.

Para calcular esta taxa executou-se a técnica de injeção intraperitoneal de BrdU (bromodeoxiuridina), um análogo de Timidina, na fêmea grávida. Ao serem absorvidos pela mãe, estes nucleótidos chegam aos embriões por via sanguínea e são absorvidos e integrados no ADN genómico quando ocorre uma mitose (Muskhelishvili, *et al.*, 2003).

Os embriões são recolhidos 2h após a injeção e são processados para fazer blocos de gelatina e criosecções. O BrdU é detectado por um anticorpo anti-BrdU (Sigma) mas para tal acontecer é necessário desnaturar o ADN através de um processo em que se passam as criosecções por formamida e depois por HCl, seguindo-se um protocolo de imunofluorescência típico. Para conseguir obter resultados com DAPI (marcador nuclear fluorescente azul) ao mesmo tempo que com BrdU foi necessário fazer primeiro a marcação com anticorpo anti-PECAM e com DAPI, fotografar todas as secções e só depois efectuar o protocolo para a detecção de BrdU, pois sendo o DAPI um agente intercalador não consegue ligar-se ao ADN quando este se encontra desnaturado. Assim foi possível contar o número de células endoteliais por secção de aorta (12 μ m) e o número de células endoteliais em proliferação por secção de aorta. Combinando estas duas contagens para cada aorta de cada secção, para um total de três embriões controlo e três embriões DT chegou-se ao resultado que nos embriões controlo 28% das células endoteliais arteriais entraram em mitose durante as 2h enquanto nos embriões DT apenas 16% das células endoteliais arteriais entraram em mitose. Este resultado corresponde a uma diminuição de 43% na taxa média de proliferação endotelial arterial nos embriões DT em relação aos embriões controlo. Curiosamente a este resultado está associado um aumento de 35% no número total de células endoteliais por aorta.

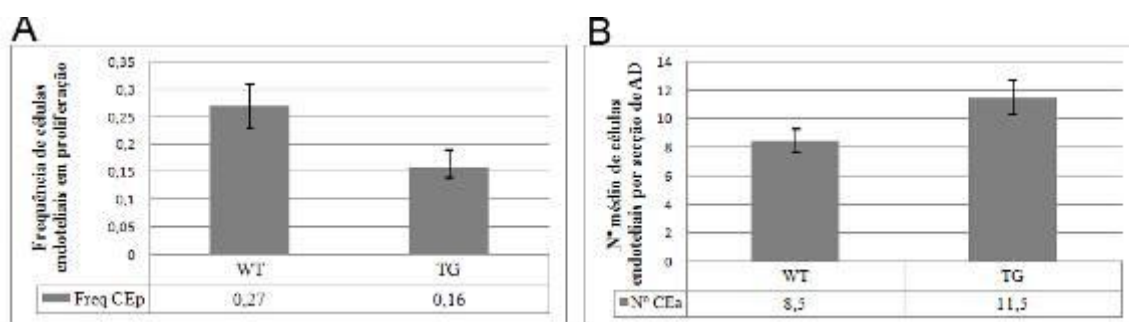


Figura 59 – (A) Gráfico de frequência de proliferação de células endoteliais arteriais. Note-se uma diminuição de 43% na frequência de proliferação de células endoteliais arteriais em embriões DT, face aos embriões controlo. (B) Gráfico do número médio de células endoteliais por secção de aorta. Note-se um aumento de 35% no número médio de células endoteliais por secção de AD nos embriões DT, face aos embriões controlo. Linhas centrais representam a amplitude de variação, média \pm desvio padrão. (A, B) $p < 0,001$ (Wilcoxon W).

Analisou-se também a taxa de apoptose endotelial arterial, de modo a tentar perceber se alterações a nível da sinalização Notch poderiam estar a influenciar os níveis de apoptose endotelial e assim também o número de células endoteliais por secção de aorta. Os resultados indicaram que as células endoteliais das aortas dorsais têm quase o dobro da frequência de apoptose, em relação a embriões controlo equivalentes. No entanto, os níveis de apoptose endotelial arterial dos embriões DT permanecem a 4,7%, um valor relativamente baixo, quando comparado à descida de 43% na taxa de proliferação endotelial.

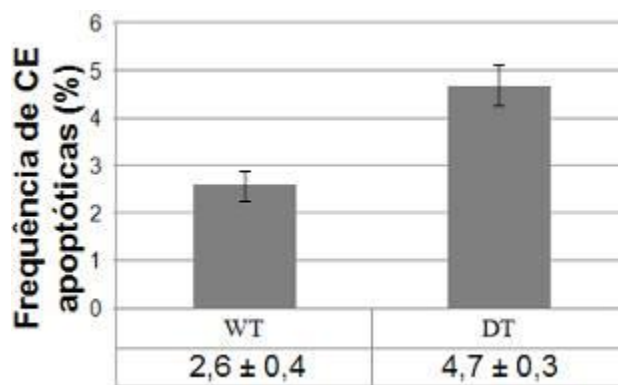


Figura 60 – Gráfico de frequência de apoptose em células endoteliais arteriais. Note-se um aumento de 80% na frequência de células endoteliais em apoptose nos embriões DT, por comparação aos embriões controlo. Linhas centrais representam a amplitude de variação, média \pm desvio padrão. $p < 0,001$ (Wilcoxon W).

Como o resultado de menor taxa de proliferação endotelial arterial e maior taxa de apoptose associado a um aumento no número de células endoteliais arteriais parecia ser contraditório e como as AD dos embriões DT apareciam hipertrofiadas voltámos a observar as AD com mais detalhe.

Observando a região nascente dos vasos intersomáticos, vasos que brotam das AD para a região dorsal dos embriões passando pelo espaço que fica entre dois sómitos vizinhos, reparámos que nos embriões DT estes vasos brotam mais tardiamente e crescem mais devagar no sentido dorsal. A situação normal é de os vasos intersomáticos brotarem no sentido anterior-posterior e sempre com direcção dorsal, acompanhando a formação de novos sómitos. Por exemplo, aos 9.0 dpc os embriões controlo só não têm vasos intersomáticos formados na região intersomática mais posterior (fronteira entre o sómito mais recente e o segundo sómito mais recente), enquanto no resto das regiões intersomáticas já existem vasos. No caso dos embriões DT não existem vasos intersomáticos nas três a quatro regiões intersomáticas mais recentes (posteriores).

Analisando os embriões ao longo do tempo percebe-se que este fenótipo corresponde a um atraso no brotar destes vasos e a um atraso na migração das células endoteliais através do espaço intersomítico, pois em embriões mais velhos mantém-se o atraso nas quatro a cinco regiões intersomíticas mais posteriores, indicando que regiões intersomíticas que, em média, a idades anteriores se apresentam avascularizadas, mais tarde já estão vascularizadas. Os vasos intersomíticos dos embriões DT apresentam-se sempre mais finos que os vasos intersomíticos dos embriões controle. Este atraso no brotar de novos vasos, na migração de células endoteliais arteriais e o reduzido número de células endoteliais por vaso intersomítico pode explicar o aumento no número de células endoteliais arteriais apesar de haver uma diminuição na taxa de proliferação. Há uma redução na saída de células endoteliais das AD, que aí se vão acumulando e formando um vaso hipertrofiado.

A análise pormenorizada da vasculatura da região cefálica dos embriões DT e controle revelou que nos embriões DT há uma diminuição no número de novos brotos vasculares, dando origem a vasos longos e não ramificados, indicando um defeito no remodelamento vascular.

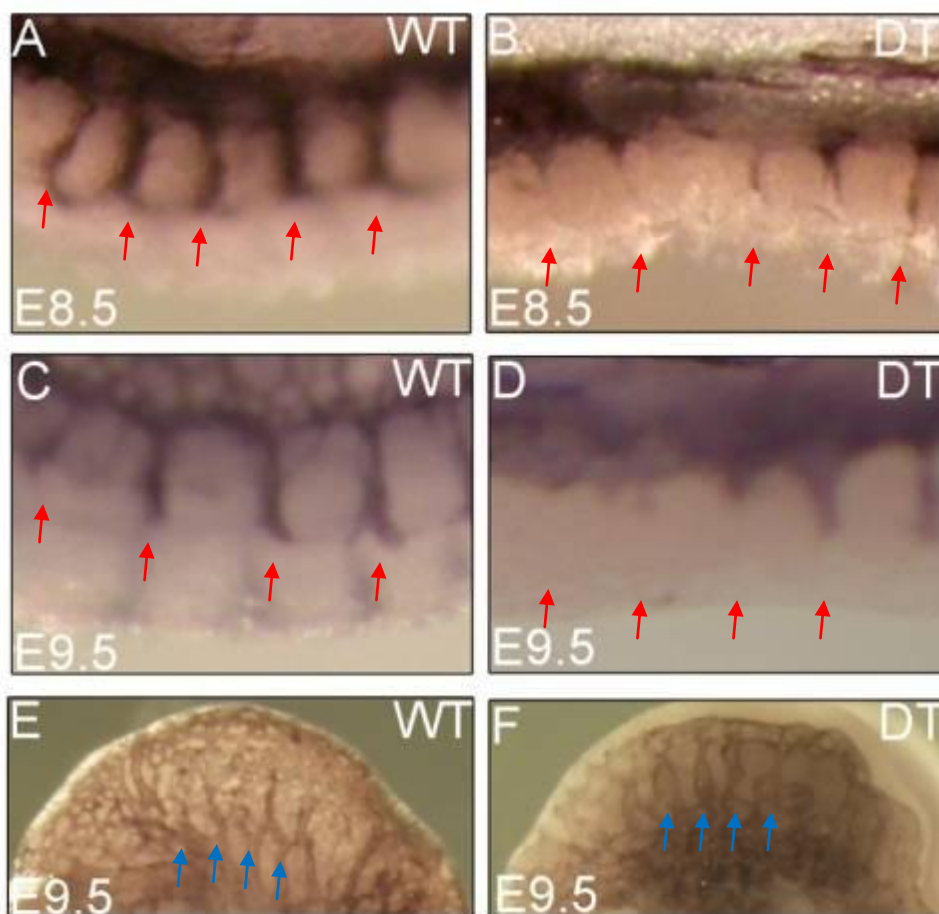


Figura 61 – Defeitos migratório endoteliais e defeitos na ramificação vascular. Embriões DT aos 9,5 dpc com imunohistoquímica para PECAM. (A) Embrião controle aos 8,5 dpc. (B) Embrião DT aos 8,5 dpc revelando um atraso na migração de células endoteliais das AD para formar os vasos intersomíticos (setas vermelhas), em relação ao embrião controle (A). (C) Embrião controle aos 9,5 dpc. (D) Embrião DT aos 9,5 dpc revelando uma continuação no atraso na migração de células endoteliais das AD para formar os vasos intersomíticos (setas vermelhas), em relação ao embrião controle (C). (E) Região cefálica de embrião controle aos 9,5 dpc. (F) Embrião DT aos 9,5 dpc revelando uma diminuição no número de novos brotos vasculares na região cefálica (setas azuis), em relação ao embrião controle (E).

3.4.9 - Análise da estrutura da matriz extracelular

A matriz extracelular é uma estrutura que é regulada pelas células e que por si é capaz de regular diversas facetas das células. Sabe-se por exemplo que um dos primeiros passos que uma célula toma quando vai iniciar um processo migratório é degradar a matriz à sua volta (Coultas, *et al.*, 2005).

Como nos passos anteriores identificámos um defeito migratório nas células endoteliais arteriais decidimos fazer uma análise por imunofluorescência à deposição de constituintes da matriz extracelular, como fibronectina e laminina.

Nos embriões DT observámos um aumento acentuado na marcação para fibronectina, um dos maiores constituintes da matriz extracelular, à volta das AD, em relação aos embriões controlo. Em relação a laminina o aumento já foi mais subtil mas nota-se uma deposição contínua à volta das AD enquanto nos embriões controlo encontramos laminina de forma descontínua à volta das AD.

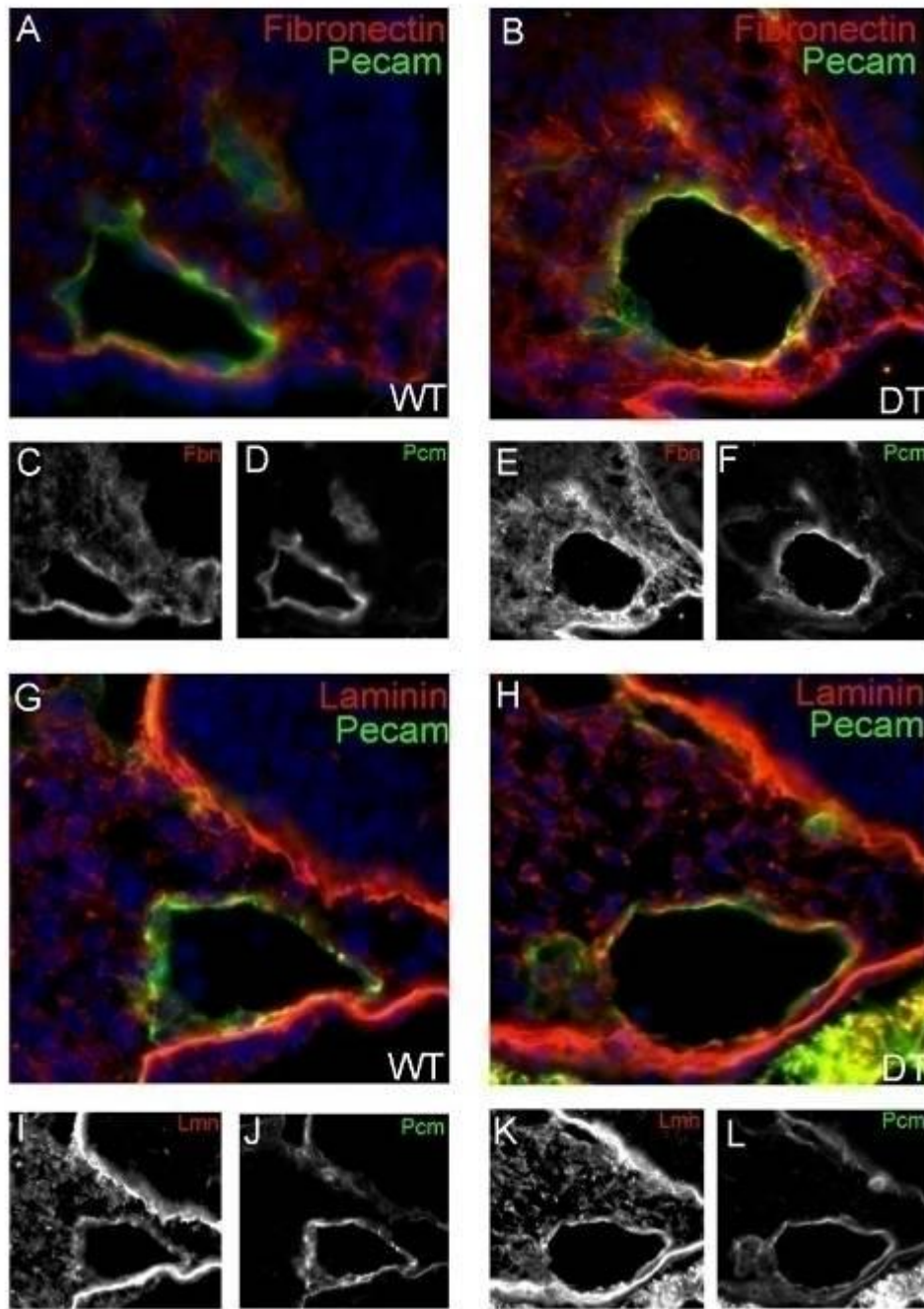


Figura 62 - Deposição de matriz extracelular à volta das AD. Imunofluorescência em criosecções de embriões controlo e DT aos 8,5 dpc. (A) Deposição de Fibronectina à volta de uma AD de um embrião controlo. (B) Criosecção transversal de um embrião DT mostrando um aumento na marcação para Fibronectina (Sigma F3648) à volta da AD. (A), Fibronectina (Fbn) a vermelho (C,E), PECAM (Pcm) a verde (D,F), DAPI a azul. (G) Deposição de Laminina (Sigma L9393) à volta de uma AD de um embrião controlo. (H) Criosecção de um embrião DT mostrando um aumento ligeiro na marcação para Laminina à volta da AD, formando uma linha mais contínua e definida que nos embriões controlo (G), Laminina (Lmn) a vermelho (I,K), PECAM (Pcm) a verde (J,L), DAPI a azul.

3.4.10 – Localização de Dll4 e possível importância para a sua função

Toda a análise feita até ao momento esteve centrada na funcionalidade de Dll4 em diversos contextos de alteração de expressão deste gene.

Os avanços no estudo da função de Dll4 conduziram à tentativa de desenvolvimento de terapias anti-tumorais, através da produção de anticorpos neutralizantes para Dll4. Estes anticorpos monoclonais terão por função o seu uso em terapias, tal como hoje em dia já se faz para VEGF (Panares ; Garcia, 2007).

Este avanço na produção de anticorpos para Dll4 criou a oportunidade de estudar a localização de Dll4 no sistema vascular embrionário, em especial nas AD.

A vantagem do uso de anticorpos face aos resultados já obtidos através de hibridação *in situ* prende-se com o facto de nem sempre a estas duas técnicas darem origem ao mesmo tipo de resultados. É conhecido que a via Notch é regulada ao nível da endocitose, por isso não é difícil imaginar sistemas em que apesar de haver expressão do ARNm não haja localização membranar de Dll4 (Le Borgne, 2006). A possibilidade de existirem sistemas de regulação deste tipo, e as possíveis implicações para a compreensão do funcionamento da via Notch no desenvolvimento vascular, é meritória de um olhar mais aprofundado.

A análise da localização da proteína Dll4 também pode ser importante para a determinação do modelo de funcionamento da via Notch no desenvolvimento vascular.

Para realizar este estudo recebemos cinco anticorpos produzidos no Laboratório do Doutor Parkash S. Gill, Norris Cancer Center, LA, USA, com especificidade para Dll4. Todos os anticorpos revelaram especificidade para Dll4, marcando as células endoteliais das AD de embriões com 9,5 dpc.

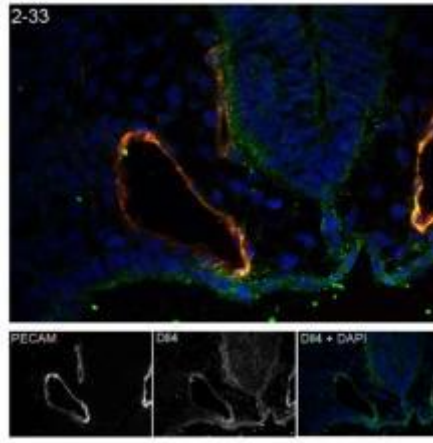
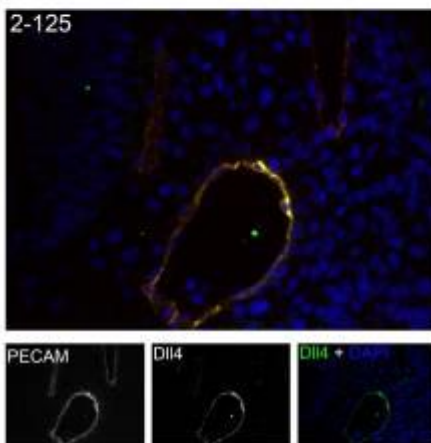
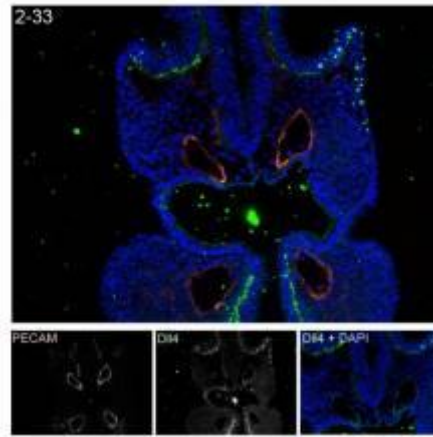
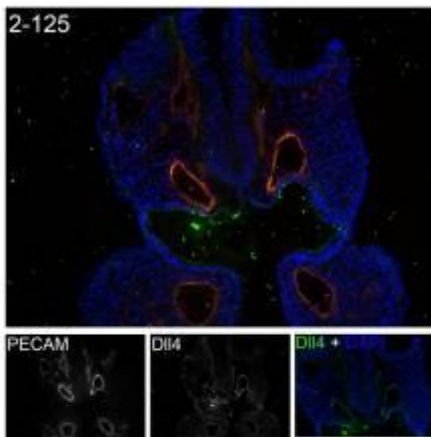
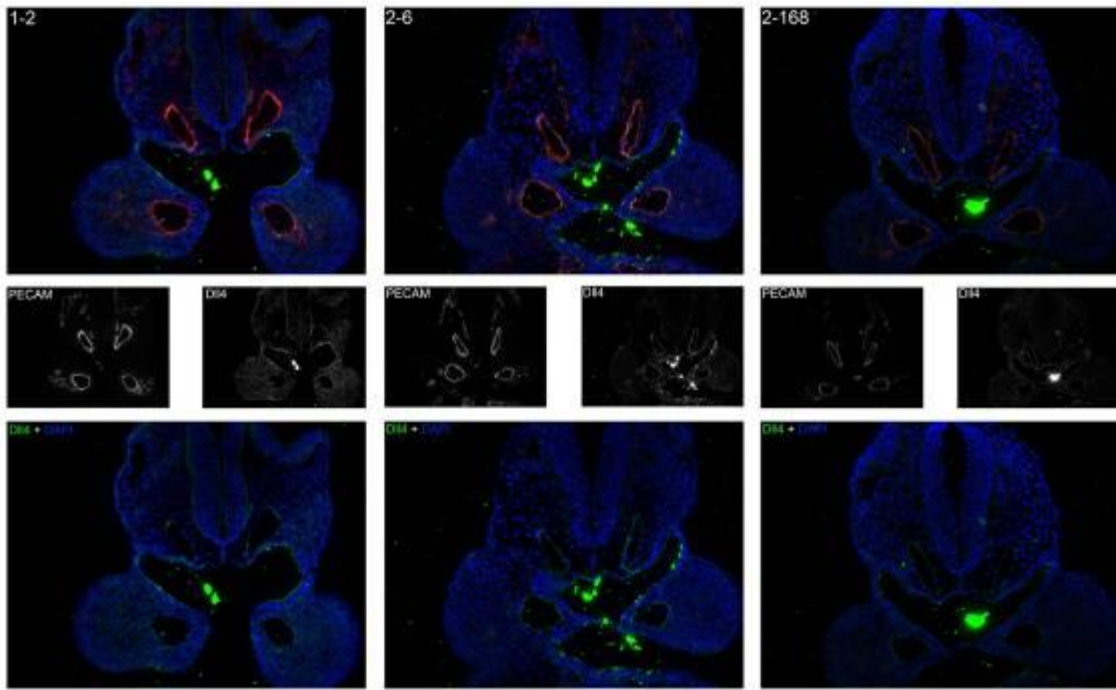


Figura 63 – Imunofluorescência para Dll4 com os anticorpos 1-2, 2-6, 2-33, 2-125 e 2-168, a verde. A vermelho, imunofluorescência para PECAM. A azul, DAPI.

Apesar de todos os anticorpos testados terem revelado sinal positivo nas células endoteliais das AD, os anticorpos 2-33 e 2-125 revelaram ser os mais promissores pois permitem a obtenção do sinal específico mais forte e menos ruído de fundo. Os resultados seguintes foram obtidos com o anticorpo 2-33.

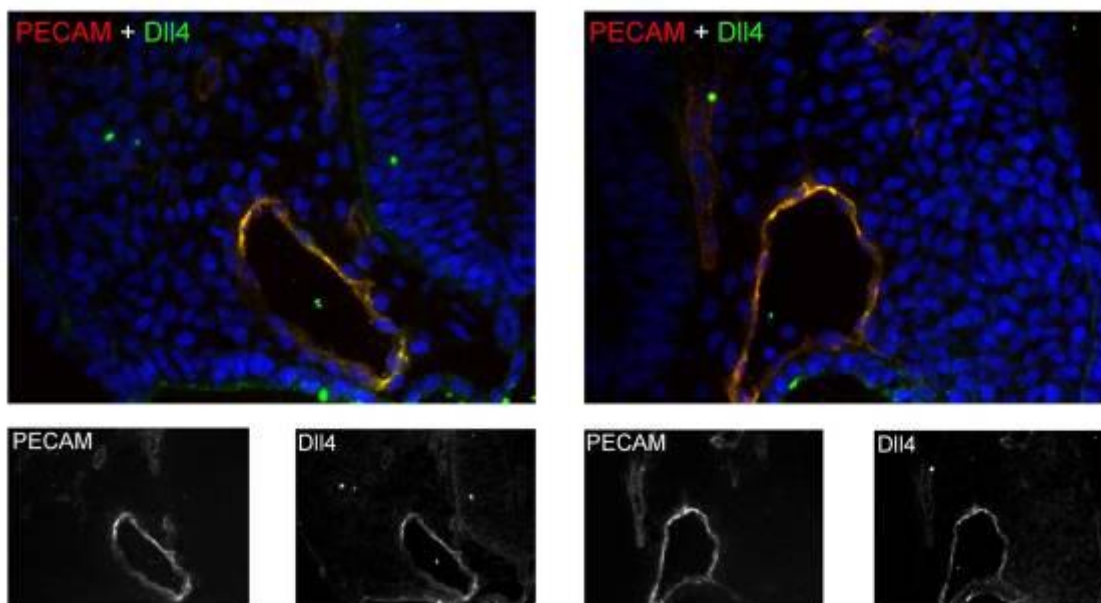


Figura 64 – Imunofluorescência para Dll4 (verde) e PECAM (vermelho) em embrião controlado. Note-se presença de Dll4 nas membranas celulares de todas as células das AD mas não nas VCA. Encontra-se um sinal mais forte de Dll4 na face das AD que está virada para o tubo neural.

Dll4 foi detectado nas membranas celulares de todas as células endoteliais das AD, pois a sua expressão co-localiza com PECAM em todo o perímetro das AD. Segundo os resultados obtidos encontra-se mais Dll4 membranar na face das AD que está virada para o tubo neural.

Analisando os resultados mais detalhadamente detectou-se sinal de Dll4 nas células endoteliais que não co-localiza com PECAM, ou seja, não associado à membrana celular. Este sinal, caracterizado como sendo pontos verdes (o facto de não serem amarelos indica que não co-localizam com PECAM), que aparenta indicar uma localização vesicular de Dll4, surge especialmente na região peri-nuclear. Estes pontos surgem em maior número na face das AD em que o sinal membranar é mais baixo, a face externa. Este resultado foi observado também em marcações de imunofluorescência feitas com o anticorpo 2-125.

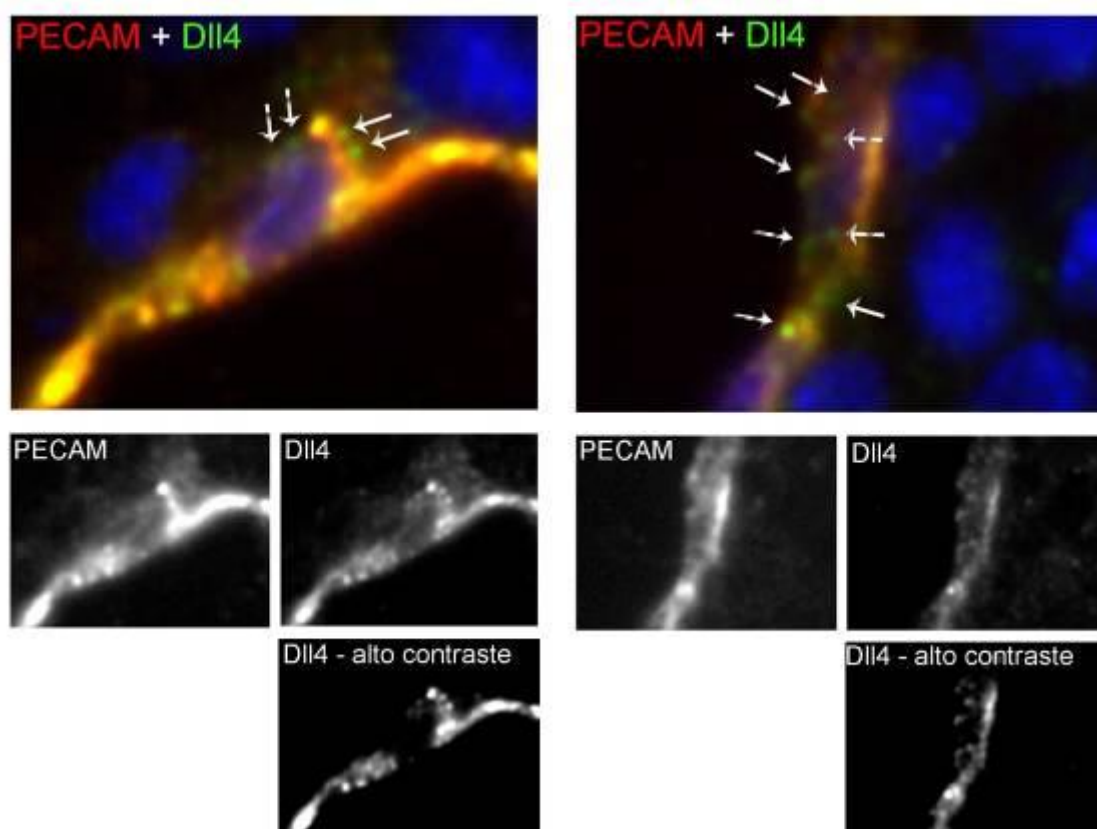


Figura 65 – A proteína Dll4 não tem uma deposição constante. Imunofluorescência para Dll4 (verde) e PECAM (vermelho) em embrião controle, à esquerda face da AD virada para o tubo neural, à direita face externa da AD. Note-se que nas células endoteliais da face externa das AD há mais pontos positivos para Dll4 e negativos para PECAM que nas células endoteliais da face das AD viradas para o tubo neural. Imagens com alto contraste do canal verde (Dll4) permitem uma maior resolução desses pontos.

3.5 – Discussão

3.5.1 - Análise do efeito da sobre-expressão ubíqua de Dll4 no desenvolvimento embrionário

O sistema de transgênesis usado é baseado no sistema Z/EG (Novak, *et al.*, 2000). Este sistema é dependente da presença da recombinase Cre, a qual remove o elemento β geo seguido de sinal de poliadenilação, que se encontra flanqueado por locais *loxP*, permitindo assim que ocorra sobre-expressão de Dll4 acompanhada de expressão de GFP. Assim sendo, o controlo da expressão da recombinase Cre é a base do controlo da sobre-expressão de Dll4 neste contexto.

Para iniciar a análise do efeito de sobre-expressão de Dll4 no desenvolvimento embrionário decidiu-se analisar o efeito da sobre-expressão ubíqua e constitutiva. O objectivo seria fazer uma análise preliminar dos efeitos da sobre-expressão de Dll4 e assim determinar

os tecidos embrionários em que *Dll4* teria função activa, para depois iniciar experiências em que se cruzasse a linha Z/EG-*Dll4* com linhas que expressassem a recombinase Cre especificamente nesses tecidos.

Para atingir o objectivo de expressão ubíqua da recombinase Cre obtiveram-se ratinhos da linha pCAGGS-Cre. Inicialmente cruzaram-se as linhas Nv6.1, Nv2.1 e Z/EG-*Dll4*(FVB) com ratinhos da linha pCAGGS-Cre. Os resultados obtidos com as três linhas testadas foram semelhantes, os embriões duplos transgênicos (DT) para Z/EG-*Dll4* e pCAGGS-Cre apresentavam fluorescência verde ubíqua e forte.

A análise dos embriões DT revelou variados defeitos no desenvolvimento embrionário. Os embriões DT não completam o enrolar da placa neural nas três regiões encefálicas, proencéfalo, diencéfalo e metaencéfalo, embora o tubo neural esteja fechado nas regiões posteriores. Existem defeitos ao nível da somitogénese, em que numa pequena percentagem dos embriões DT se formam sómitos com formas irregulares, não completando o enrolamento embrionário. Os embriões DT apresentam hemorragias ao longo do corpo, pericárdio dilatado e membrana vitelina pálida e aparentemente avascularizada. Os embriões DT apresentam atrasos de crescimento consistentes enquanto sobrevivem, morrendo por volta dos 10,5 dpc. Como em todas as linhas o fenótipo observado foi consistente, decidiu-se analisar profundamente apenas uma das linhas fundadoras. Preteriu-se a linha Z/EG-*Dll4*(FVB) pois esta linha (e todas as outras linhas que usámos, ao longo do trabalho, baseadas em FVB) revelou ter muitos problemas com baixa fertilidade e alta taxa de abortos espontâneos, não associados ao transgene. Entre as linhas Nv6.1 e Nv2.1, apesar de equivalentes em todos os factores analisados, optou-se pela linha Nv6.1, apenas por, naquele momento, ter mais descendência disponível para iniciar um estudo mais aprofundado do fenótipo.

Os defeitos observados a nível do tubo neural dos embriões DT, que não fecha na região cefálica, ao contrário dos embriões controlo, lembram, até certo ponto, os defeitos observados em embriões que expressam uma forma activada de Notch3 no tubo neural (Lardelli, *et al.*, 1996) e em embriões com perda-de-função de *numb* (Zilian, *et al.*, 2001), que foi descrito em *Drosophila* como sendo um inibidor da via Notch. A sobre-expressão de *dll4* dá origem a que a superfície luminal do tubo neural permaneça exposta ao exterior, como duas asas de tecido neural, um defeito conhecido como exencefalia (equivalente às anencefalias em humanos).

No caso dos embriões com sobre-expressão de *Dll4* não ocorre fusão do tubo neural nas 3 regiões encefálicas, dando origem a um grave defeito craniofacial com exencefalia e divisão facial. A acumulação destes dois defeitos é rara pois normalmente nos casos de

exencefalia só há falha na fusão das regiões do metaencéfalo e/ou diencéfalo (Juriloff ; Harris, 2000). Quer no caso de Notch3 activado como de *Numb* este defeito não é tão grave pois não chega a afectar a região rostral do embrião. Este defeito aparenta ser resultante da ocorrência de uma falha a nível da diferenciação de neurónios. A função da via Notch na neurogénese é a de reprimir a diferenciação neural de algumas células ectodérmicas (Henrique, et al., 1997), mantendo-as num estado indiferenciado e em proliferação e com a possibilidade de mais tarde se diferenciarem em células da glia.

No caso dos embriões DT a via Notch deve estar activa em todas as células que expressem um receptor Notch, logo, supondo que a recombinase Cre está activa em todas as células do organismo, irão existir menos células neurais nestes embriões, as quais provavelmente não serão suficientes para completar o fecho do tubo neural. Este fenótipo não deve representar uma função endógena de *Dll4*, pois a expressão neural endógena de *Dll4* é bastante restrita e mais tardia que o surgimento destes defeitos (Benedito ; Duarte, 2005), mas sim da sobre-activação da via Notch no tecido neuroepitelial precoce.

Os defeitos na somitogénese foram pouco caracterizados até ao momento. Observou-se que ocorrem defeitos na forma de alguns sómitos, aparecendo com formas quase triangulares que distorcem o contorno do embrião. Não se sabe se os defeitos na somitogénese são responsáveis pelo bloquear do enrolamento embrionário. Sabe-se que a via Notch está implicada no estabelecimento do padrão rostro-caudal dos sómitos mas até ao momento ainda não se detectou expressão endógena de *Dll4* nos sómitos. Os resultados das hibridações *in situ* com ribosondas para *Dll1* parecem indicar que a sobre-expressão ectópica de *Dll4* nos sómitos impede a expressão de *Dll1* nesses tecidos, possivelmente através de um mecanismo de retroalimentação negativa. Assim sendo, fica apenas *Dll4* nesses tecidos e ou este não consegue activar os receptores Notch nesses tecidos com a mesma eficiência que *Dll1*, causando assim este fenótipo, ou é a própria sobre-activação da via Notch por *Delta4* nesses tecidos que causa o fenótipo.

Os embriões DT apresentam também um defeito morfogenético no estabelecimento da simetria bilateral, revelado pelo facto de efectuarem o enrolamento corporal e cardíaco quer para a esquerda como para a direita, com igual probabilidade, quando os embriões controlo efectuem sempre esses movimentos de enrolamento para a direita. Este defeito deve reflectir um fenótipo ao nível do desenvolvimento do Nó de Hensen. Até ao momento não se detectou expressão de *Dll4* nessa estrutura, o que indica que este fenótipo também deve reflectir uma função ectópica da sobre-expressão de *Dll4*, provavelmente resultante da sua actuação sobre a expressão de *Dll1* no Nó de Hensen (Przemeck, et al., 2003).

3.5.2 - Defeitos cardio-vasculares dos embriões DT

A característica que tem suscitado um grande interesse à volta do estudo do gene *Dll4* é a sua expressão arterial endotelial. Este facto é sugestivo de uma função deste gene na regulação da identidade vascular e da angiogénese. Nos embriões DT, *Dll4* está presente quer na vasculatura endotelial arterial como na venosa. A expressão ectópica de *Dll4* nas VCA leva a que a expressão de *Notch1* não seja desligada, por volta dos 8,75 dpc, confirmando-se a activação da via Notch no sistema vascular venoso, por *Dll4*, pela expressão ectópica de *Hey1*, um efector directo da via Notch no endotélio.

Para avaliar o impacto da sobre-expressão de *Dll4* no desenvolvimento vascular realizou-se uma análise da estrutura vascular dos embriões DT, fazendo recurso à técnica de imunohistoquímica, em embriões inteiros ou embriões crio-seccionados, com anticorpo para PECAM-1 (Newman, *et al.*, 1990, Schnurch ; Risau, 1993).

O defeito vascular mais óbvio nos embriões DT é a hipertrofia das aortas dorsais (AD). A partir dos 8,75 dpc as AD apresentam-se com um volume superior à encontrada nos embriões controlo com o mesmo número de sómitos. A hipertrofia das AD torna-se progressivamente mais evidente com o evoluir dos embriões DT. É a primeira vez que se associa uma hipertrofia aórtica com mutantes da via Notch. Ainda no sistema vascular arterial, nos embriões DT apenas se forma a artéria do primeiro arco branquial. As artérias do segundo e terceiro arco branquial existem apenas como fios endoteliais que não se desenvolvem correctamente. Curiosamente, nos embriões DT a artéria carótida não se apresenta hipertrofiada, sendo que a vasculatura da região cefálica se encontra imatura nestes embriões.

O sistema vascular venoso dos embriões DT também se apresenta afectado pela sobre-expressão de *Dll4*. As VCA surgem como um vaso ramificado, em vez de aparecerem como um vaso único e íntegro. Tal é sugestivo de um defeito na agregação da rede de capilares que se forma na posição das futuras VCA. Este defeito já foi descrito para os mutantes de perda de função em *Ephrin-B2* ou *EphB4*, tendo sido considerado como resultado da falta de interacção entre o sistema vascular arterial e venoso e não entre o mesênquima e o endotélio venoso (Adams, *et al.*, 1999, Gerety ; Anderson, 2002, Gerety, *et al.*, 1999). Esta falta de interacção resulta do facto de nos mutantes de perda de função para *Ephrin-B2* e *EphB4* só haver, respectivamente, identidade venosa e identidade arterial, apenas uma das identidades possíveis. Nos embriões DT existe apenas a identidade arterial, julgando pelo padrão de expressão de *Ephrin-B2*, *EphB4* e *Connexin37*. Desconhece-se até ao momento o

mecanismo exacto responsável pelo defeito venoso. É possível que a coalescência das VCA seja dependente de um mecanismo de comunicação entre artérias e veias, mediado pelo sistema Ephrin-Eph ou então que seja dependente do estabelecimento de um padrão circulatório correcto.

A vasculatura da membrana vitelina dos embriões DT apresenta-se na forma de uma rede de capilares, representativa do plexo vascular primário. Este plexo é a primeira estrutura vascular que se forma na membrana vitelina, resultado da agregação dos progenitores endoteliais nessa estrutura. Esta vasculatura da membrana vitelina dos embriões DT não é remodelada para formar a rede vascular observada nos embriões controlo, composta por vasos de grande calibre (artérias e veias), médio calibre (arteríolas e vénulas) e pequenos capilares, organizados de forma hierárquica. Este defeito no remodelamento da vasculatura vitelínica é semelhante ao observado em vários mutantes com defeitos vasculares, incluindo o lado venoso das membranas vitelinas dos mutantes de perda de função em *EphB4* (Gerety, *et al.*, 1999) e, por exemplo, nos mutantes de perda de função em *Notch1* e *Notch4* (Krebs, *et al.*, 2000), *Dll4* (Duarte, *et al.*, 2004), *Ephrin-B2* (Wang, *et al.*, 1998), *Foxc1* e *Foxc2* (Kume, *et al.*, 2001), *Hey1* e *Hey2* (Fischer, *et al.*, 2004), *Alk1* (Urness, *et al.*, 2000), *Endoglin* (Arthur, *et al.*, 2000), *Coup-TF2* (You, *et al.*, 2005) e é sugerido, por exemplo, nos mutantes de perda de função em *Vegf-A* (Ferrara, *et al.*, 1996). Defeitos similares também surgiram nos mutantes de ganho de função em *Notch4* (Uyttendaele, *et al.*, 2001). O facto de surgirem defeitos semelhantes em mutantes de ganho e perda de função pode indicar que o sistema vascular extra-embriónico é mais susceptível a flutuações homeostáticas ou pode revelar como o remodelamento vascular extra-embriónico é dependente do estabelecimento de uma correcta circulação sanguínea (le Noble, *et al.*, 2004) e que a circulação sanguínea pode estar afectada em todos estes mutantes. Esta ideia é complementada pelo facto de embriões mutantes em que não existe batimento cardíaco, e que por isso não têm circulação sanguínea, também terem defeitos semelhantes ao nível do remodelamento do plexo vascular primário da membrana vitelina (Wakimoto, *et al.*, 2000).

Apesar da existência de vários defeitos ao nível de toda a vasculatura embrionária e extra-embriónica é preciso notar que aparentemente a vasculogénese ocorre sem problemas, pois nos embriões DT continua a formar-se um vaso na posição das AD e um vaso, se bem que ramificado, na região das VCA e formam-se os vários plexos primários presentes em várias regiões do embrião em desenvolvimento. Tal facto leva-nos a determinar que a função do *Dll4* está ligada aos eventos morfogenéticos que se seguem à vasculogénese, a angiogénese, sendo que os fenótipos observados representam defeitos no remodelamento da vasculatura primária formada na vasculogénese.

A análise imunohistoquímica para PECAM em criosecções de embriões DT e controlo revelou a presença de fusões entre as AD e as VCA, também chamadas de malformações artério-venosas. Estas ligações representam uma alteração ao padrão normal de circulação sanguínea, e ocorrem principalmente na região do tracto de entrada do coração, ao nível do seio venoso. Em regiões mais anteriores as VCA encontram-se ramificadas até à zona em que se encontram muito próximo do seio venoso. Nessa zona o vaso coalesce num vaso único, que se encontra, ao mesmo tempo, próximo do seio venoso e da AD e funde-se com ambos, em vez de se ligar apenas ao seio venoso, efectivamente fazendo com que as AD contactem directamente com o tracto de entrada e saída do coração. Este defeito estrutural já havia sido descrito em mutantes de perda de função para genes membros da via TGF-beta, como *Alk1* e *Endoglin* (Sorensen, *et al.*, 2003, Urness, *et al.*, 2000) e foi entretanto também descrito nos mutantes de perda de função para *dll4* (Duarte, *et al.*, 2004, Krebs, *et al.*, 2004). É possível que este processo de fusão ocorra ao nível do tracto de entrada do coração devido ao facto de as AD e VCA estarem a esse nível na sua posição mais próxima. O sistema Ephrin-B2 – EphB4 é responsável pela repulsão entre células endoteliais de identidade diferente (Fuller, *et al.*, 2003). Como nos embriões DT ambos os vasos expressam *Ephrin-B2* e *Connexin37* e as VCA não expressam o marcador de identidade venosa *EphB4*, é muito provável que a formação das fusões entre artérias e veias seja responsabilidade da ausência de identidade venosa e generalização da identidade arterial por toda a vasculatura embrionária em desenvolvimento. Assim sendo, nos embriões DT não existe repulsão entre o sistema vascular arterial e o venoso e nos sítios onde os vasos se encontrem pode ocorrer fusão.

Para confirmar se este defeito estrutural teria implicações funcionais fez-se microangiografia com tinta-da-china. Esta técnica permite determinar o padrão de fluxo sanguíneo pelo embrião, mediado pelo próprio batimento cardíaco do embrião. Esta técnica revelou que nos embriões DT o sangue sai do coração pelo tracto de saída e entra nas AD pela artéria do primeiro arco branquial. A maior parte do sangue segue para regiões posteriores, descendo para a região do tracto de entrada do coração, o seio venoso. Nessa zona o sangue passa para as VCA e entra no coração pelo seio venoso, havendo muito pouco sangue a passar para as restantes regiões do embrião. Este resultado veio confirmar que as fusões artério-venosas produzem um defeito circulatório.

O reconhecimento da existência de um defeito circulatório nos embriões DT levantou a hipótese de parte dos defeitos observados serem secundários ao defeito circulatório. Efectivamente a hipertrofia das AD torna-se mais pronunciada, a partir do momento em que se inicia o batimento cardíaco, logo pode estar também ligada ao estabelecimento da circulação sanguínea. Nota-se também que aos 9,5 dpc a hipertrofia das AD é mais evidente

na região entre o tracto de entrada e saída do coração, a região onde quase todo o sangue do embrião se acumula devido à presença das fusões arterio-venosas. É possível que a hipertrofia das AD represente, pelo menos em parte, uma dilatação do vaso devido à acumulação de sangue nessa região e não apenas um defeito hipertrófico intrínseco às células endoteliais.

Para testar esta hipótese determinou-se a frequência de células endoteliais em proliferação nas AD. O resultado indicou que existe uma diminuição significativa da frequência de células endoteliais em proliferação, de cerca de 43% entre os embriões DT e controlo. Este resultado confirma que a hipertrofia das AD dos embriões DT não pode ser explicada por um aumento da taxa de proliferação endotelial. A análise da frequência de apoptose nas células endoteliais arteriais indicou um aumento nos embriões DT, de cerca de 80%. No entanto, o número de células endoteliais por secção de AD aumenta 35% nos embriões DT, em relação aos embriões controlo. Estas variações foram medidas antes do início da circulação sanguínea e apenas em secções não fundidas, para limitar as contribuições extrínsecas. Estes resultados indicam que a hipertrofia das AD não pode ser explicada apenas como sendo resultado de uma dilatação resultante do aumento de pressão sanguínea devido à ocorrência das fusões. Por outro lado, o facto de as AD de embriões DT não serem tão hipertrofiadas em regiões posteriores ao tracto de saída pode realmente ser explicada como sendo resultado da falta de circulação sanguínea nessa zona, pois antes do início da circulação não existe esse diferencial de calibre entre a região anterior e posterior e como na realidade há um aumento no número de células endoteliais por secção de AD, mesmo nessa zona, tal defeito não pode ser considerado como um defeito primário.

O resultado de diminuição da frequência de células endoteliais em proliferação como resposta à sobre-expressão de Dll4 foi entretanto confirmado em cultura de células HUVEC (células endoteliais de veia umbilical humana) (Williams, *et al.*, 2006).

Os resultados da microangiografia trouxeram também uma possível explicação para os defeitos encontrados ao nível da coalescência das VCA e remodelamento da vasculatura da membrana vitelina. É possível que estes defeitos sejam também resultantes de defeitos circulatórios, no entanto, é difícil discernir entre a hipótese de serem defeitos primários ou circulatórios devido ao facto de o início dos eventos morfogenéticos que remodelam estes sistemas vasculares ser mais ou menos coincidente com o estabelecimento da circulação sanguínea no embrião. Como estes defeitos são recorrentes em muitos mutantes, com genes de várias vias de sinalização, tal pode reflectir a existência de um ponto comum em que todos esses mutantes têm defeitos circulatórios resultantes de defeitos endoteliais primários ou pode reflectir que todas essas vias se interligam de alguma forma, acabando por influenciar os mesmos eventos morfogenéticos.

Detectaram-se defeitos morfogénéticos no coração dos embriões DT a 9,5 dpc. Como *Dll4* não é expresso nos cardiomiócitos, é possível que estes defeitos sejam consequência dos defeitos circulatórios primários e do padrão anormal de circulação sanguínea que se estabelece. No entanto, não se pode excluir a hipótese que a sobre-expressão de *Dll4* no endocárdio possa afectar o recrutamento e organização dos cardiomiócitos que o cobrem.

Enquanto o aumento no número médio de células endoteliais por secção de AD, associado ao aumento na pressão sanguínea resultante do estabelecimento de uma microcirculação entre o tracto de saída e o tracto de entrada do coração, podem explicar a hipertrofia das AD que se observa nos embriões DT, o aumento no número de células endoteliais por secção de AD não pode ser explicado por uma diminuição na taxa de proliferação de células endoteliais e aumento na taxa de apoptose. Para perceber a origem do aumento do número de células endoteliais por secção de AD decidimos olhar de novo para a estrutura da vasculatura embrionária. Detectou-se a existência de um atraso na migração de células endoteliais das AD para a extremidade dorsal dos embriões DT, mais especificamente, um atraso na formação dos vasos intersomáticos. Este atraso pode explicar o aumento no número de células endoteliais por secção de AD como sendo uma acumulação de células não migratórias.

A formação dos vasos intersomáticos ocorre como resposta a um gradiente de factores de crescimento e atractores endoteliais secretados pelos sómitos e tubo neural, que são estruturas dorsais. Entre estes factores encontramos, por exemplo, VEGF-A e ligandos indutivos da família Slit (Yuan, *et al.*, 1999). A existência de este defeito migratório endotelial indica que provavelmente a sobre-expressão de *Dll4* leva a uma redução na capacidade das células endoteliais responderem a gradientes atractores.

Os resultados de hibridação *in situ* para *Vegfr2* indicam que a expressão do principal receptor de VEGF está diminuída no endotélio de embriões DT. Esta ligação entre *Dll4* e a função da via VEGF foi entretanto confirmada em estudos feitos em cultura de células HUVEC (Williams, *et al.*, 2006). Este resultado indica que a interacção entre *Dll4* e a via VEGF é efectuada ao nível dos receptores, afectando por isso as várias funções celulares reguladas por VEGF.

A vasculatura da região cefálica dos embriões DT apresenta-se também com defeitos, apresentando menos ramificação dos vasos. Este defeito pode ser resultado de uma diminuição do número de células endoteliais migratórias, que iniciem um novo broto vascular. Defeitos na migração de células endoteliais foram entretanto associados à sobre-expressão de *Dll4* em cultura de células HUVEC (Williams, *et al.*, 2006).

Estes defeitos migratórios podem ser defeitos intrínsecos à via Notch ou podem reflectir interacções com o funcionamento de outras vias, como a via VEGF. Independentemente da origem, estes defeitos podem ser associados a defeitos na maturação do endotélio e a defeitos na matriz extracelular.

Para avaliar a maturação do endotélio estudou-se a presença de SMA (actina de músculo liso) à volta do endotélio arterial. Este marcador de músculo liso pode revelar se o recrutamento de perícitos está afectado nos embriões DT. É possível detectar SMA no miocárdio embrionário a partir dos 8,5 dpc, mas esta proteína só começa a surgir à volta do endotélio das AD aos 9,5 dpc. Nos embriões DT não se detecta SMA à volta do endotélio das AD até ao momento da sua morte, no entanto como o surgimento deste marcador só ocorre quando os embriões DT já começam a demonstrar deterioração e apoptose pode não ser indicativo da existência de um defeito no recrutamento de perícitos.

Para avaliar o estado da matriz extracelular estudou-se a presença de Fibronectina e de Laminina, dois componentes comuns da matriz extracelular. Nos embriões DT observámos um aumento acentuado na marcação para Fibronectina, um dos maiores constituintes da matriz extracelular, à volta das AD, em relação aos embriões controlo. Em relação a Laminina o aumento já foi mais subtil mas nota-se uma deposição contínua à volta das AD enquanto nos embriões controlo encontramos Laminina de forma descontínua à volta das AD. Estes resultados podem indicar um de dois cenários possíveis, que as células endoteliais secretam mais proteínas da matriz extracelular ou menos proteínas degradadoras de matriz. Este resultado ajusta-se ao resultado obtido anteriormente que referia que as células endoteliais arteriais têm menor capacidade na migração celular.

A disponibilidade de anticorpos para Dll4 permitiu a realização de um estudo à distribuição da proteína Dll4 nas células endoteliais das AD. Este estudo nunca havia sido feito, sendo que até ao momento os únicos dados da expressão de Dll4 são referentes ao seu ARNm e ao repórter lacZ expresso nos mutantes de perda de função para *Dll4*, sob influência do seu promotor endógeno. Sabe-se que os membros da via Notch são sujeitos a vários passos de regulação pós-traducional e regulação de disponibilidade à membrana (Le Borgne, 2006). É por isso bastante provável que Dll4 seja também um alvo de regulação e que essa regulação seja elucidativa do seu modo de funcionamento no endotélio, algo que ainda não foi elucidado.

Os resultados indicaram que Dll4 está presente na membrana celular de todas as células endoteliais das AD. No entanto Dll4 não está presente de igual modo em todas essas células. Existe uma marcação mais forte na face das AD que está virada para o tubo neural e região dorsal do que na face oposta. Esta marcação também está associada à existência de

menos Dll4 vesicular na face das AD que está virada para o tubo neural e região dorsal do que na face oposta.

Estes resultados indicam que há mais Dll4 disponível para sinalização na face das AD que está virada para o tubo neural e região dorsal, portanto na face que está sujeita aos gradientes de factores de crescimento e atractores provenientes do tubo neural e outras estruturas dorsais (Hogan, *et al.*, 2004). Sendo que os dados apresentados anteriormente indicam Dll4 como sendo um regulador negativo da sinalização derivada desses factores dorsais, como VEGF e ligandos Slit, por exemplo, faz sentido que Dll4 esteja mais disponível para sinalizar na face mais exposta a esses factores.

A presença de Dll4 em todas as células endoteliais das AD indica que a sua função neste sistema não deve estar ligada à segregação de uma possível subpopulação, como é o caso com as células ponta na vasculatura das retinas (Hellstrom, *et al.*, 2007, Lobov, *et al.*, 2007, Suchting, *et al.*, 2007). Inicialmente a sua função é a de iniciar a identidade arterial nas células endoteliais das AD, ao activar Notch1 e 4 aí, por oposição às VCA, onde não havendo expressão de Dll4 a via Notch é desligada por Coup-TF2 (You, *et al.*, 2005). Após esta fase é provável que a sua função seja principalmente regulatória, provavelmente actuando em todas as células endoteliais das AD de igual forma. Esta forma de sinalização pode ser classificada como indutiva, pois não está envolvida na segregação de uma população a partir de outra.

Capítulo 4 – Sobre-expressão endotelial de *dll4*

4.1 – Objectivos

Após a confirmação da importância da função de Dll4 no desenvolvimento vascular, com a sobre-expressão ubíqua de *Dll4*, a próxima fase do estudo seria a análise do efeito da sobre-expressão de *Dll4* específica ao endotélio. Este estudo permitiria discernir se o fenótipo descrito no Capítulo 3 reflecte um efeito de Dll4 autónomo do endotélio, ou não-autónomo.

A primeira fase deste trabalho seria completa com o cruzamento da linha Z/EG-Dll4 com linhas de murganhos com expressão endotelial de Cre. A dificuldade de obter uma frequência de recombinação endotelial aceitável neste sistema, e por isso um fenótipo endotelial, levou a que procurássemos meios alternativos de atingir este objectivo. Com esse novo método, a linha tetO₇-Dll4, seria possível distinguir entre a possibilidade de a ausência de fenótipo ser resultado de um problema no funcionamento das linhas Cre endoteliais ou do facto de o fenótipo obtido com a sobre-expressão ubíqua ser não-autónomo ao endotélio. Para isso produziríamos uma nova linha de murganhos transgénicos, baseada no sistema tet-on, que nos permitiria ter um sistema transgénico regulável no tempo e espaço e em dose, manipulando a dose do indutor doxiciclina.

Embriões com sobre-expressão de *Dll4* específica ao endotélio seriam analisados em relação a eventos vasculogénicos e angiogénicos, procurando se os fenótipos vasculares e celulares observados nos embriões com sobre-expressão ubíqua de *dll4* se repetiam neste contexto.

4.2 – Materiais e métodos

4.2.1 - *Material de origem animal:*

- **Embriões de ratinho:** Analisaram-se embriões resultantes de diversos cruzamentos.

Foram analisados embriões resultantes de vários cruzamentos:

- Cruzamento de fêmeas de ratinho da linha Tie1-Cre (Gustafsson, *et al.*, 2001), linha consaguínea com fundo genético C57/BL6, com machos da linha Z/EG-Dll4.

- Cruzamento de fêmeas de ratinho da linha Tie2-Cre (Kisanuki, *et al.*, 2001), linha não consaguínea com fundo genético híbrido entre C57/BL6 e CD1, com machos da linha ROSA26R (Soriano, 1999), linha consaguínea com fundo genético C57/BL6.
- Cruzamento de fêmeas de ratinho da linha Tie2-Cre (Kisanuki, *et al.*, 2001), linha não consaguínea com fundo genético híbrido entre C57/BL6 e CD1, com machos da linha Z/EG-Dll4.
- Cruzamento de fêmeas de ratinho da linha Flk1-Cre (Motoike, *et al.*, 2003), linha não consaguínea com fundo genético híbrido entre C57/BL6 e CD1, com machos da linha Z/EG-Dll4.
- Cruzamentos de fêmeas de ratinho da linha Tie2-rtTA-M2, linha consaguínea com fundo genético C57/BL6, com machos da linha TetO₇-Dll4/Tie2-rtTA-M2, linha com fundo genético híbrido entre C57/BL6 e FVB.

4.2.2 - Estabelecimento de bactérias DH5α competentes.

Para que sejam capazes de ser transformadas, interiorizando os plasmídeos de interesse, é necessário que as bactérias estejam “competentes” a incorporar esse ADN estranho. A competência é o estado fisiológico que leva a que as bactérias possam adsorver ADN livre, protegê-lo das nucleases e incorporá-lo no seu citoplasma.

Um dos métodos de tornar células competentes é o tratamento com soluções frias de catiões di- e multi-valentes, especialmente Ca²⁺, na fase de crescimento exponencial precoce. O mecanismo de entrada do ADN nas células não é ainda bem conhecido, supõe-se que os catiões presentes nas soluções de competência formarão complexos com os fosfolípidos negativamente carregados das biomembranas, neutralizando parte dessas cargas, o que facilitará a entrada da molécula de ADN pois esta, devido ao seu esqueleto fosfatado, também tem uma carga global negativa. Uma hipótese que tem grande aceitação é a de que a presença de elevadas concentrações de Ca²⁺, no início da fase estacionária de crescimento, activa uma via que leva à acumulação de polihidroxibutirato nas membranas, o que leva ao abrir de buracos na membrana externa, deixando a membrana interna disponível.

O grau de competência depende bastante das condições de armazenamento antes e depois de serem tornadas competentes. Para iniciar o protocolo de indução de competência faz-se um riscado numa placa de LB agar a partir de um *stock* de *E. coli* DH5α e deixa-se a incubar durante a noite a 37°C. No dia seguinte transferem-se 4 ou 5 colónias bem isoladas

(cada uma com 1-2 mm), para 1mL de SOB. Em seguida dispersam-se as colónias vortexando a baixa velocidade ou pipetando. Esta suspensão é então diluída em 50mL de SOB num *erlenmeyer* de 1L (para garantir o arejamento). Coloca-se o *erlenmeyer* numa incubadora orbital a 37°C e 200rpm até a cultura atingir uma A_{600} entre 0,4 e 0,6, altura em que a cultura atingiu o pico da fase exponencial de crescimento.

A partir desse ponto é essencial manter as bactérias, material de vidro e plástico e soluções no gelo, para garantir a melhor eficiência no processo.

Após atingirem a fase exponencial de crescimento as bactérias são transferidas para um tubo de polipropileno de 50mL e colocadas no gelo para arrefecerem. Após 10 minutos a cultura é centrifugada a 4000g durante 10 minutos a 4°C. Remove-se o sobrenadante e deixa-se o tubo numa posição invertida durante um minuto para garantir que todo o meio esorra. O precipitado é ressuspendido em 20mL de FSB frio e colocam-se as células no gelo durante 10 minutos. Em seguida volta-se a centrifugar a suspensão celular nas mesmas condições que anteriormente. Remove-se o sobrenadante e deixa-se escorrer os restos de FSB deixando o tubo numa posição invertida durante um minuto. Em seguida ressuspende-se o precipitado em 4mL de FSB e adiciona-se 140µL de DMSO (Sigma #D-5879). Agita-se gentilmente a suspensão e guarda-se no gelo durante 15 minutos. Adiciona-se 140µL de DMSO pela segunda vez e volta-se a agitar gentilmente a suspensão. Guarda-se a suspensão no gelo durante 15 minutos. Em seguida coloca-se alíquotas de 50µL em tubos eppendorf previamente arrefecidos. Estes são congelados rapidamente por imersão em azoto líquido e guardados de seguida no congelador a -80°C.

A eficiência deste método foi estimada pela avaliação da eficiência de transformação, em que se contabiliza o número de CFU (unidades formadoras de colónias) que crescem em meio selectivo (suplementado de ampicilina) após um processo de transformação com 1µg de ADN plasmídico (que contém o gene de resistência à ampicilina). Esta metodologia permitiu a obtenção de bactérias com uma competência da ordem de 10^8 CFU/µg.

4.2.3 - Transformação de bactérias

O factor mais limitante para uma transformação é o número de bactérias competentes numa dada suspensão. A quantidade de ADN usada não deve ser excessiva para que não ocorra a entrada de mais do que um plasmídeo por bactéria. Para além da competência das bactérias, também o tamanho do plasmídeo influi na eficiência de transformação, sendo que esta diminui linearmente com o aumento do tamanho do plasmídeo.

Para se obter um máximo de eficiência, o ADN transformante deverá estar livre de proteínas, fenol, etanol e detergentes.

A transformação de bactérias *E. coli* DH5 α fez-se pelo método do choque térmico a 42°C. Para tal adicionou-se 10ng de ADN plasmídico a alíquotas de 50 μ L de bactérias competentes recentemente descongeladas (a descongelação deve ser lenta, por isso efectua-se no gelo). Estas são incubadas em gelo durante 30 minutos e em seguida são colocadas num banho-maria a 42°C durante 45 segundos, o que permite a entrada do ADN plasmídico nas células bacterianas por aumentar a fluidez das membranas. Em seguida estas são colocadas no gelo durante 3 a 5 minutos. Findo este tempo, adiciona-se 950 μ L de SOC e incuba-se com agitação a 37°C e 200rpm durante uma hora. Este período tem por objectivo permitir às bactérias recém transformadas começarem a expressar o gene que confere resistência à ampicilina, que funciona como marca de selecção. No final desse período plaqueiam-se 50 a 100 μ L da mistura de transformação em placas de LB agar suplementado com ampicilina numa concentração final de 100 μ g/mL, de modo a permitir a selecção dos transformantes. As placas são incubadas a 37°C durante a noite.

4.2.4 - Clonagem em vectores plasmídicos

Inicia-se este protocolo amplificando em bactérias o ADN plasmídico do vector em que se pretende clonar. Este ADN é depois extraído por MidiPrep, como já descrito anteriormente. Em seguida este plasmídeo é quantificado por espectrofotometria e faz-se restrição de 20 μ g de ADN com a enzima de restrição pretendida, ou as enzimas pretendidas, segundo as instruções dos fabricantes. Após se ter verificado que a restrição está completa, por electroforese de uma alíquota em gel de agarose de 1%. Em seguida o ADN é precipitado com adição de 2,5 volumes de etanol absoluto e 1/10 de volume em acetato de sódio 3M pH 5,2. Esta mistura é vortexada durante 20 segundos e em seguida é colocada a -20°C durante duas horas. Após este tempo a amostra é centrifugada a 13000rpm, durante 30 minutos numa microcentrífuga refrigerada. Remove-se o sobrenadante e adiciona-se 1ml de uma solução com 70% etanol em água bidestilada, colocando de seguida a amostra a centrifugar a 13000rpm durante cinco minutos. Após a centrifugação remove-se o sobrenadante e deixa-se a amostra secar ao ar durante 10 a 20 minutos e em seguida ressuspende-se o ADN num volume apropriado de água bidestilada.

Antes da fase de ligação do fragmento de ADN ao vector linearizado é necessário desfosforilar o plasmídeo. Este passo tem por função limitar a capacidade de religação

autónoma do plasmídeo linearizado, facto que limitaria a capacidade das moléculas de plasmídeo se ligarem aos fragmentos de ADN. Este passo é executado de forma diferente consoante as enzimas de restrição usadas gerem cadeias de ADN com extremidades 5' protrudentes ou 5' recedidas ou extremidades cegas. No caso das extremidades 5' protrudentes incubam-se as amostras com 0,1U de CIAP (fosfatase alcalina de intestino de vitelo) (Promega M182A) durante duas vezes 30 minutos. No caso das extremidades 3' protrudentes ou extremidades cegas incubam-se as amostras duas vezes com 0,1U de CIAP a 37°C durante 15 minutos e 56°C durante 15 minutos. Em seguida as amostras são lavadas em coluna de *Qiagen QIAquick Gel extraction kit*, segundo instruções do fabricante para limpeza de ADN.

O fragmento de ADN a introduzir é preparado por restrição de ADN com as enzimas apropriadas de forma a libertar o fragmento pretendido de forma inequívoca. Após se obter uma restrição completa, carrega-se a amostra inteira em gel de agarose, colando os poços necessários de forma a poder acomodar o volume de reacção. Após se ter obtido uma migração suficiente para que consiga distinguir bem a banda pretendida, coloca-se o gel num transiluminador de baixa intensidade e remove-se o fragmento de agarose que contém a banda pretendida. Em seguida os fragmentos de agarose são processados pelo *Qiagen QIAquick Gel extraction kit*, para obter o fragmento de ADN pretendido.

Após se ter obtido o fragmento de ADN e o vector de clonagem é preciso estimar a concentração de ADN de ambos, o que é feito por espectrofotometria.

A ligação do fragmento de ADN ao vector de clonagem é executada ao colocar ambos na mesma solução e adicionar 1U de Ligase de ADN de bacteriófago T4 (Promega M180B), em solução tamponada específica, indicada pelo fabricante. Existem dois factores importantes na preparação de uma reacção de ligação, o rácio entre moléculas de vector e moléculas de fragmento de ADN e a temperatura de incubação. Estes dois factores são alterados consoante a ligação seja efectuada entre moléculas com extremidades coesivas ou cegas e consoante a dificuldade da ligação.

A decisão do rácio entre quantidade de fragmento de ADN e vector de clonagem é feita com recurso à seguinte fórmula:

$$\frac{ng \text{ de vector} \times \text{tamanho de fragmento (Kb)}}{\text{tamanho do vector (Kb)}} \times \text{rácio molar de } \frac{\text{fragmento}}{\text{vector}} = ng \text{ de vector}$$

A temperatura de reacção varia consoante o tipo de extremidades em reacção. No caso de serem extremidades coesivas a reacção decorre a 16°C durante a noite e no dia seguinte

transforma-se o resultado em bactérias competentes. No caso de as extremidades serem cegas a reacção decorre a 22°C durante a noite e no dia seguinte transforma-se o resultado em bactérias competentes.

Nestas experiências faz-se sempre um controlo negativo da reacção, que é igual à reacção experimental mas em que não se adiciona o fragmento de clonagem. Normalmente a mistura de ligação é determinada de L1 e a mistura de controlo é determinada de L0.

Nestas experiências usou-se sempre entre 100 e 200ng de ADN vector, e a quantidade correspondente ao rácio calculado em fragmento de ADN a clonar, num volume final de 10µl.

4.2.4.1 - Teste rápido de recombinação

Após as misturas de ligação terem sido transformadas em bactérias competentes, é necessário testar as colónias resultantes para a presença da forma recombinada do vector de clonagem, que inclui a integração do fragmento de ADN, por oposição à presença da forma não recombinada, correspondente apenas à religação do vector de clonagem.

Inicialmente prepara-se uma placa de LB agar (Sigma L2897) com 100µg/ml de ampicilina, que é separada em quadrícula, de forma a comportar dezenas de riscados por placa. Em seguida contam-se as colónias nas placas L0 e L1, se o número de colónias for semelhante entre as placas então a probabilidade é alta para que todas as colónias na placa L1 não sejam recombinantes. Se o número de colónias for superior na placa L1 do que na placa L0 então é provável que na placa L1 existam colónias com o vector recombinado. Quanto maior for a diferença entre o número de colónias nas placas L0 e L1 e quanto menor for o número de colónias na placa L0, menos colónias precisam ser verificadas pelo seguinte métodos de rastreio.

Picam-se as colónias das placas de transformação L0, apenas uma colónia, e o número desejado de colónias L1, uma a uma, com o auxílio de uma ponta de micropipeta de 200µl, para o fundo de um tubo eppendorf marcado, onde se faz um riscado e de seguida para a quadrícula correspondente na placa de isolamento, que é colocada em estufa a 37°C.

Adiciona-se 25µl de 0,1M EDTA pH8 e vortexam-se os tubos até se ressuspenderem as bactérias dos riscados no tubos. Adiciona-se 25µl de solução de *cracking* (0,2M NaOH, 0,5% SDS, 20% sacarose, em água bidestilada) e vortexam-se as amostras durante dez segundos. Colocam-se as amostras durante cinco minutos a 70°C e em seguida adiciona-se 4µl de 4M KCl e 4µl de tampão de carregamento (40% de sacarose, 2,5mg/ml de azul de

bromofenol em tampão TAE – 40mM Tris, 20mM de ácido acético e 1mM de EDTA, em água bidestilada) e vortexam-se as amostras. Em seguida as amostras são colocadas em gelo durante cinco minutos e depois são centrifugadas a 13000 rpm, em microcentrífuga de bancada, durante três minutos. Corre-se 20 a 30µl de sobrenadante em gel de agarose a 1%, de forma a separar as formas superenroladas dos plasmídios.

A partir dos resultados da electroforese seleccionam-se os clones que tenham uma banda de ADN plasmídico de tamanho superior ao registado pela amostra retirada da placa L0, indicando que possivelmente resultam da recombinação do vector de clonagem e o fragmento. Esses clones são recuperados da placa de isolamento e colocados em cultura para realização de *minipreps* e posterior confirmação da integração do fragmento no vector de clonagem por análise de padrão de restrição e sequenciação de ADN.

4.2.5 - Microinjecção pronuclear

O vector linearizado, e com as sequências bacterianas removidas, é diluído a 2-3ng/µl em tampão de injeção (10mM Tris-HCl pH7,5, 0,1mM EDTA pH8). O ADN vector foi preparado e purificado de acordo com o mesmo protocolo usado para microinjecção pronuclear de Z/EG-D114.

Para obter grandes quantidades de embriões, superovulam-se fêmeas da estirpe consanguínea FVB/N, como descrito anteriormente, e cruzam-se com machos reprodutores. A meio do dia seguinte, recolhem-se zigotos da região da *ampulla* do oviduto. Os zigotos são tratados com hialuronidase (Sigma H4272), para remover as células *cumulus*, depois são lavados duas vezes em meio M2 e armazenados em meio M16 a 37°C em estufa com 5% de CO₂.

Removem-se 10 a 20 zigotos de cada vez, da estufa, para a placa de micromanipulação. Os zigotos são microinjectados individualmente. Prende-se um zigoto, por aspiração, e usa-se uma pipeta de injeção para injectar 1-2pl de ADN vector no pronúcleo masculino. Este processo é repetido para todos os zigotos na placa de microinjecção. Em seguida os zigotos são colocados de novo na estufa e transferem-se novos para a placa de microinjecção. No fim deste processo escolhem-se os zigotos que sobreviveram ao procedimento de microinjecção e são transferidos para o oviduto de fêmeas pseudo-gestantes com 0,5 dpc, em grupos de 10-15 zigotos por cada lado.

4.2.6 – Administração de doxiciclina

Nos cruzamentos com linhas baseadas no sistema tet, a doxiciclina (Sigma D9891) foi administrada às fêmeas gestantes a partir dos 5,5dpc, na água, a 4 mg/ml. As garrafas de água foram envoltas em alumínio e a solução renovada todos os dias.

4.3 – Resultados

4.3.1 - Cruzamento da linha Z/EG-Dll4 com linhas Cre endoteliais

De modo a obter um fenótipo resultante da sobre-expressão de *Dll4* só no endotélio recorremos a linhas de murganhos com expressão endotelial da recombinase Cre.

Obtivemos três linhas de murganhos com expressão endotelial de Cre, Tie1-Cre (Gustafsson, *et al.*, 2001), Tie2-Cre (Kisanuki, *et al.*, 2001) e Flk1-Cre (Motoike, *et al.*, 2003).

Testámos o cruzamento de várias linhas Z/EG-Dll4, produzidas por agregação de mórulas e por microinjecção pronuclear, com as várias linhas Cre específicas do endotélio que possuíamos, quer em heterozigotia como em homozigotia de ambos *loci*.

Cruzamentos em que só resultassem duplos heterozigóticos simples (verificado por PCR) nunca deram origem a embriões com fluorescência detectável no endotélio e logo nunca surgiram defeitos vasculares.

Os melhores resultados foram obtidos quando se usou a linha Tie2-Cre e em cruzamentos que dessem origem a embriões com homozigotia do alelo Cre. Nesses casos surgiram embriões que, inteiros, tinham uma expressão endotelial dispersa de EGFP. Quando se analisava a expressão de EGFP em criosecções, por imunofluorescência (ver 3.2.8), confirmava-se que a expressão era restrita apenas a algumas células endoteliais das aortas e que, dependendo do embrião analisado, poucas ou nenhuma célula endotelial das veias

cardinais expressava na realidade EGFP. Tal como anteriormente, não se observaram defeitos vasculares nos embriões com o endotélio fluorescente.

A análise estatística feita a seis embriões DT (Tie2-Cre x Z/EG-Dll4) revelou que apenas 21,2% das células endoteliais arteriais apresentavam recombinação mediada por Cre, e por isso sobre-expressão de Dll4. Em relação às VCA, apenas 3,6% das células endoteliais venosas apresentavam recombinação mediada por Cre.

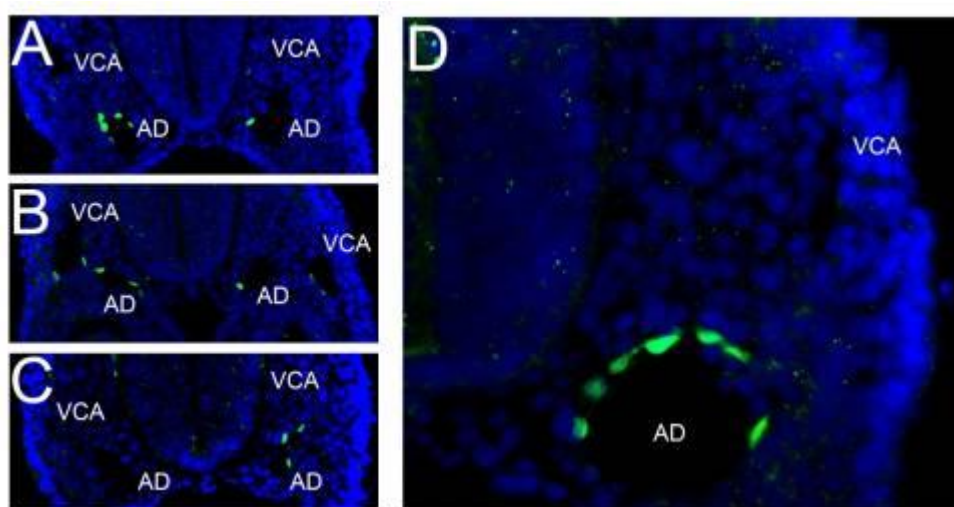


Figura 66 - Resultado de imunofluorescência para GFP (verde) em embriões DT para Tie2-Cre e Z/EG-Dll4 a E8.75. A) Imunofluorescência para GFP indica a presença de 6/26 células positivas nas aortas dorsais e 0/23 células nas veias cardinais B) Imunofluorescência para GFP indica a presença de 4/24 células positivas nas aortas dorsais e 4/29 nas veias cardinais. C) Imunofluorescência para GFP a indicar a presença de 3/24 células positivas nas aortas dorsais e nenhuma nas veias cardinais (0/22). D) Imunofluorescência para GFP a marcar 7/11 células positivas na aorta dorsal mas nenhuma na veia cardinal (0/10). AD, aorta dorsal; VCA, veia cardinal anterior.

Para confirmar a actividade da linha Tie2-Cre, esta foi cruzada com a linha repórter ROSA26R (Soriano, 1999) e fez-se coloração com X-Gal dos embriões DT para este cruzamento (ver 2.2.14). O resultado serve como repórter de actividade do transgene Cre na linha Tie2-Cre e indicou que a eficiência de recombinação não é total. Observou-se coloração no endotélio mas com um padrão incompleto quando comparado com embriões marcados para PECAM por imunohistoquímica (ver 3.2.13). As VCA apresentam muito pouco sinal positivo e os vasos arteriais apresentam uma marcação descontínua e não muito forte.

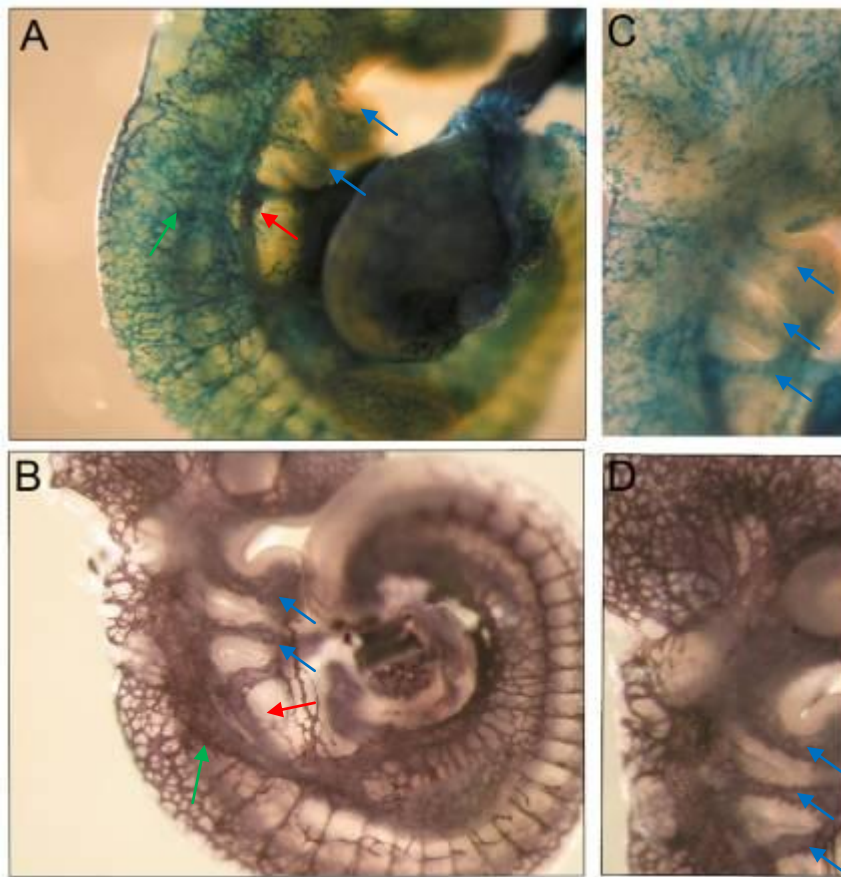


Figura 67 – Embriões DT para Tie2-Cre e Rosa26 reporter com coloração com X-Gal e imunohistoquímica para PECAM. A) Coloração com X-Gal revela um padrão vascular incompleto, quando comparado com imunohistoquímica para PECAM em embriões da mesma ninhada (B). Nota-se, por exemplo a falta de marcação nas VCA (setas verdes e um padrão muito descontínuo nos grandes vasos arteriais do tronco, aortas dorsais (setas vermelhas) e artérias dos arcos branquiais (setas azuis). B) Imunohistoquímica para PECAM . C) Coloração com X-Gal, aproximação da região cefálica e ao nível do tracto de entrada do coração, confirmando o padrão disperso de marcação com X-Gal, quando comparado com imunohistoquímica para PECAM em embriões da mesma ninhada (D). D) Imunohistoquímica para PECAM.

A análise dos embriões DT para Tie2-cre e Z/EG-Dll4 foi feita até aos 14.5 dpc, em que se observava claramente EGFP num subgrupo de células endoteliais dos capilares superficiais, mas nos quais não se conseguiu observar qualquer deficiência vascular, alterações ao nível da ramificação ou atraso no desenvolvimento dos embriões DT em si.

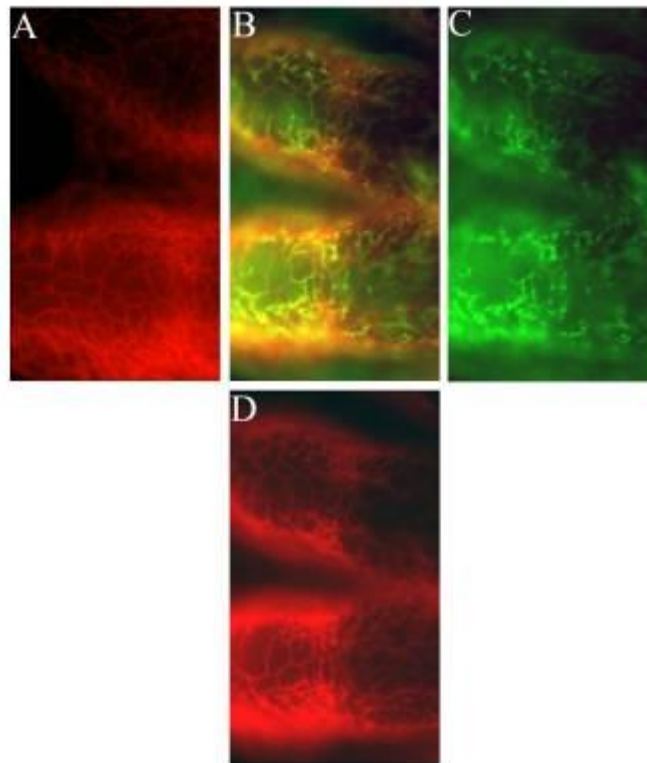


Figura 68 - Resultado de imunofluorescência para PECAM (vermelho) e GFP (verde) em membros anteriores de embriões DT para Tie2-Cre e Z/EG-Dll4 e controlo. A) sinal resultante da marcação dos vasos sanguíneos superficiais de dedos de embrião controlo com anticorpo para PECAM. B) compósito com o sinal combinado da fluorescência de ambos anticorpos mostrando que a expressão de GFP é específica do endotélio mas não marca todas as células endoteliais em embriões DT para Tie2-Cre e Z/EG-Dll4. C) sinal resultante da marcação com o anticorpo para GFP em dedo do embrião representado em B). D) sinal resultante da marcação com o anticorpo para PECAM em dedo do embrião representado em B).

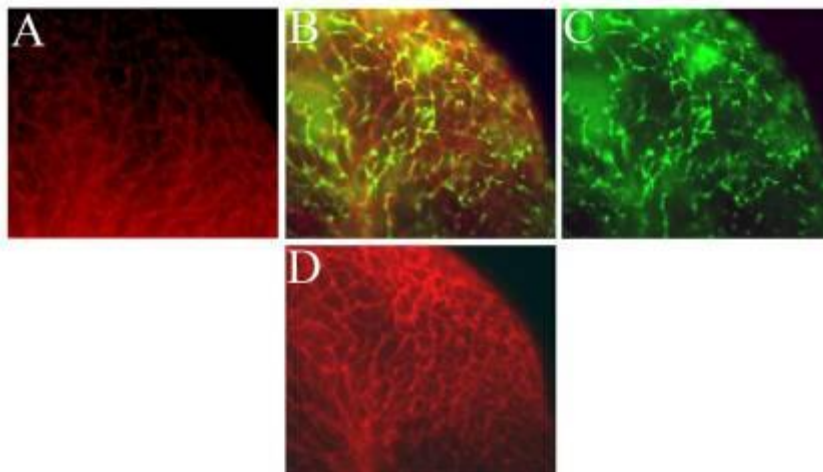


Figura 69 - Resultado de imunofluorescência para PECAM (vermelho) e GFP (verde) em membros posteriores de embriões DT para Tie2-Cre e Z/EG-Dll4 e controlo. A) sinal resultante da marcação de dedos de embriões controlo com anticorpo para PECAM. B) compósito com o sinal combinado da fluorescência de ambos anticorpos mostrando que a expressão de GFP é específica do endotélio mas não marca todas as células endoteliais em embriões DT para Tie2-Cre e Z/EG-Dll4. C) sinal resultante da marcação com o anticorpo para GFP em dedo do embrião representado em B). D) sinal resultante da marcação com o anticorpo para PECAM em dedo do embrião representado em B).

Analisou-se o número de capilares presentes na rede vascular dérmica de dedos de embriões controlo e DT e os resultados indicaram que não existe uma diferença significativa entre os dois. A análise do número de vasos positivos para GFP indicou que, em média, apenas 32% dos vasos capilares apresentam recombinação mediada por Cre.

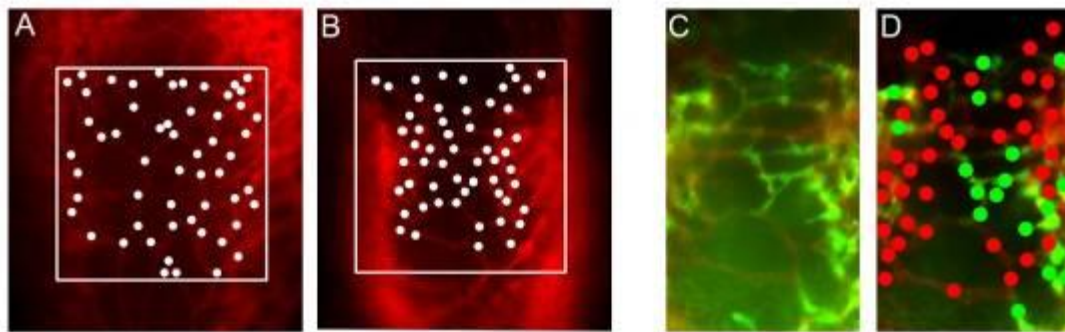


Figura 70 - Resultado de imunofluorescência para PECAM (vermelho) e GFP (verde) em membros anteriores de embriões DT para Tie2-Cre e Z/EG-Dll4. A) Vasculatura superficial de dedo de embrião controlo, pontos brancos marcam os locais de ramificação vascular. B) Vasculatura superficial de dedo de embrião DT, pontos brancos marcam os locais de ramificação vascular. O número de pontos de ramificação na área determinada (quadrado branco) é igual a 56 no embrião DT e no controlo. C) Dupla imunofluorescência para PECAM e GFP em dedo de embrião DT. D) Dupla imunofluorescência para PECAM e GFP em dedo de embrião, pontos vermelhos representam capilares positivo apenas para PECAM, pontos verdes representam capilares positivos para PECAM e GFP. Este resultado indica que apenas 32% dos capilares superficiais são positivos para GFP.

4.3.2 - Produção de uma linha de ratinhos transgênicos com sobre-expressão condicional indutível de *Dll4*

O facto de as linhas Z/EG-Dll4 e/ou as linhas Cre obtidas até ao momento não terem sido capazes de gerar uma boa eficiência de recombinação nos cruzamento para obtenção de sobre-expressão específica de *Dll4* fez-nos pensar em técnicas alternativas para obter sobre-expressão condicional de um gene. O melhor sistema alternativo é possivelmente o sistema indutível pela tetraciclina (Belteki, *et al.*, 2005), sendo actualmente, de longe, o sistema mais usado para obtenção de linhas de murganhos transgênicos (Mallo, 2006). O facto de este sistema não ser dependente de recombinação faz com que seja mais adaptável para uso em adultos, por ser reversível. É bastante sensível à presença da doxíciclina, bastando para variantes mais recentes de rtTA, 10 ng/ml para produzir uma indução robusta. No seu ponto de saturação conseguem aumentar até 100000x o nível de expressão de um gene (Urlinger, *et al.*, 2000).

O ADNc de *Dll4* foi excisado com a enzima de restrição *XhoI* do vector pBS-DL4 e as extremidades foram preenchidas para formar extremidades cegas. Este fragmento foi clonado no local *EcoRV* do vector p(tetO₇)-CMV-bGH, gentilmente cedido pelo Doutor J.A. Whitsett (Division of Pulmonary Biology, Cincinnati Children's Hospital Medical Center).

Alternativamente criou-se também um vector de transgénese onde se clonou o fragmento Dll4-IRES-GFP, encontrado no vector Z/EG-Dll4. Este sistema tem a vantagem de conter um repórter de expressão, que permite confirmar a ocorrência de activação de expressão.

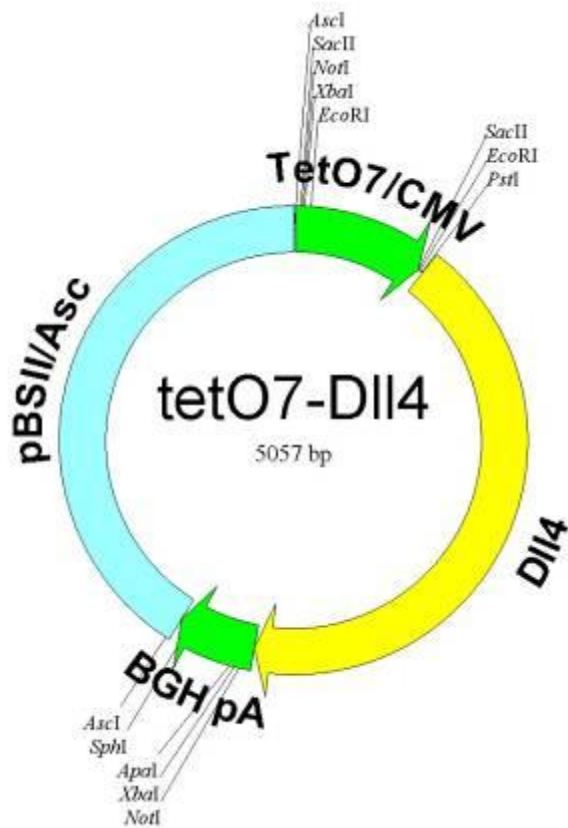


Figura 71 – Esquema do vector tetO7-DII4. Estão indicados os locais de restrição localizados nas fronteiras dos módulos funcionais do vector.

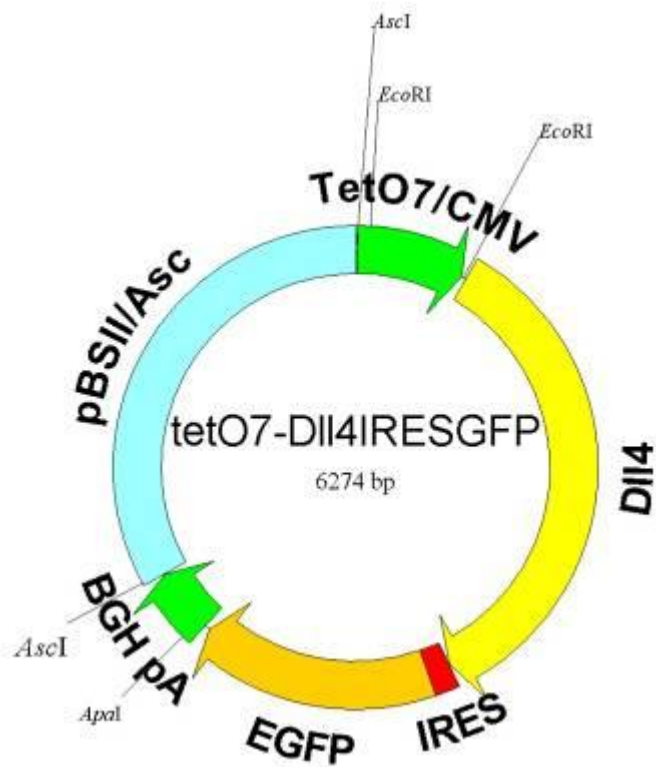


Figura 72 – Esquema do vector tetO7-DII4-IRES-GFP. Estão indicados os locais de restrição localizados nas fronteiras dos módulos funcionais do vector.

4.3.2.1 – Microinjecção pronuclear de pTetO₇-Dll4

Partiu-se de 10µg de ADN vector, que se restringiu com *AscI*, de modo a remover as sequências bacterianas. Correu-se o resultante em gel de agarose e separou-se a banda de 3,1Kb, tal como foi descrito anteriormente. A banda de gel foi então processada pelo sistema *Qiagen Qiaquick Gel extraction kit*, usando cerca de 400mg de agarose por coluna e o ADN foi eluído em 30µl de TE estéril. A concentração de ADN foi medida por espectrofotometria e estimada a 150ng/µl. No dia da microinjecção o ADN vector foi diluído a 2-3ng/µl em tampão de injecção.

O trabalho de microinjecção pronuclear foi realizado no Laboratório de manipulação embrionária da Secção de Reprodução e Obstetrícia da Faculdade de Medicina Veterinária. A execução deste protocolo na Faculdade de Medicina Veterinária foi possível devido à aquisição de um novo microscópio invertido associado a um micromanipulador.

Deste procedimento nasceram vinte murganhos, com fundo genético fixo da estirpe FVB/N, dos quais dois eram transgênicos, uma fêmea (2.2) e um macho (1.9).

A linha de murganhos transgênicos TetO₇-Dll4IRESGFP ainda não foi produzida.

4.3.2.2 - Análise do efeito da sobre-expressão endotelial de *Dll4* no desenvolvimento vascular embrionário

Para atingir o objectivo de sobre-expressar *Dll4* especificamente no endotélio, cruzámos as linhas TetO₇-Dll4 2.2 e 1.9 com a linha de ratinhos Tie2-rtTA-M2, uma gentil oferta do Doutor Urban Deutsch, Theodor Kocher Institute, Universidade de Berna. Esta linha, já baseada numa versão com sensibilidade melhorada da rtTA (Urlinger, *et al.*, 2000), permite que só ocorra sobre-expressão de *Dll4* em células endoteliais, se houver doxiciclina no organismo.

Para que se obtivessem embriões com sobre-expressão endotelial de *Dll4* (Dll4e) cruzaram-se machos duplos transgênicos para TetO₇-Dll4 e Tie2-rtTA-M2, com fêmeas Tie2-rtTA-M2. Esta decisão prendeu-se com a alta probabilidade de se obterem defeitos vasculares placentários, resultantes da administração de doxiciclina a fêmeas gestantes, duplas transgênicas para TetO₇-Dll4 e Tie2-rtTA-M2. A estratégia adoptada baixa a frequência de embriões duplos transgênicos para TetO₇-Dll4 e Tie2-rtTA-M2, mas garante que os defeitos observados seriam apenas derivados da sobre-expressão de *Dll4* nos embriões e não nas mães.

Para activar a expressão do transgene TetO₇-Dll4, administrou-se doxiciclina às fêmeas gestantes desde o dia 5,5 dpc, na água de beber, *ad libitum*. Deste modo, a administração de doxiciclina precede o início de expressão do promotor Tie2 em pouco mais de dois dias, dando tempo para que o organismo esteja saturado no momento em que se inicia a expressão da *rtTA*.

Os embriões foram dissecados aos 9,5 dpc e rastreados por PCR, para identificar os embriões Dll4e. Até ao momento já se analisaram 15 embriões, tendo sido obtida uma frequência de 13,15% (próximo da frequência Mendeliana esperada, de 12,5%).

Na primeira fase de análise realizou-se uma análise histológica dos embriões Dll4e, através de imunofluorescência em criosecções. Imunofluorescência para PECAM revelou que os embriões Dll4e têm AD hipertrofiadas e VCA ramificadas. Por sua vez, imunofluorescência para Dll4 confirmou que nos embriões Dll4e, existe Dll4 em todas as células endoteliais, ao contrário dos embriões controlo, em que apenas se detecta Dll4 nas células endoteliais arteriais. Este resultado confirmou o funcionamento correcto da linha de ratinhos TetO₇-Dll4 1.9.

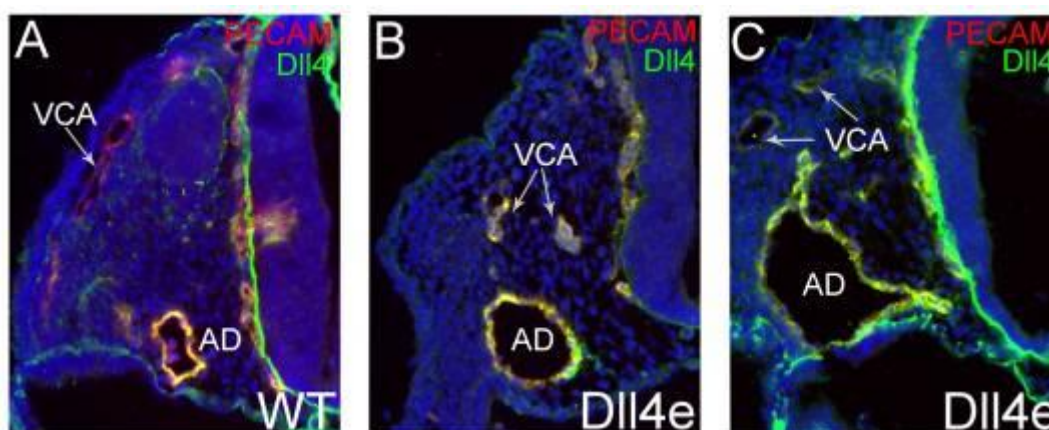


Figura 73 – Nos embriões Dll4e, *dll4* é expresso em todo o endotélio. Imunofluorescência para PECAM e Dll4 em criosecções de embriões controlo e Dll4e. As AD de embriões Dll4e (B e C) apresentam-se hipertrofiadas, quando comparadas com embrião controlo (A) As VCA de embriões Dll4e (B e C) apresentam-se ramificadas, enquanto no embrião controlo (A) estes vasos se encontram íntegros.

A análise do padrão vascular dos embriões Dll4e em criosecções também revelou a existência de hipertrofia cardíaca e que a hipertrofia das AD revela maiores proporções na região posterior do embrião.

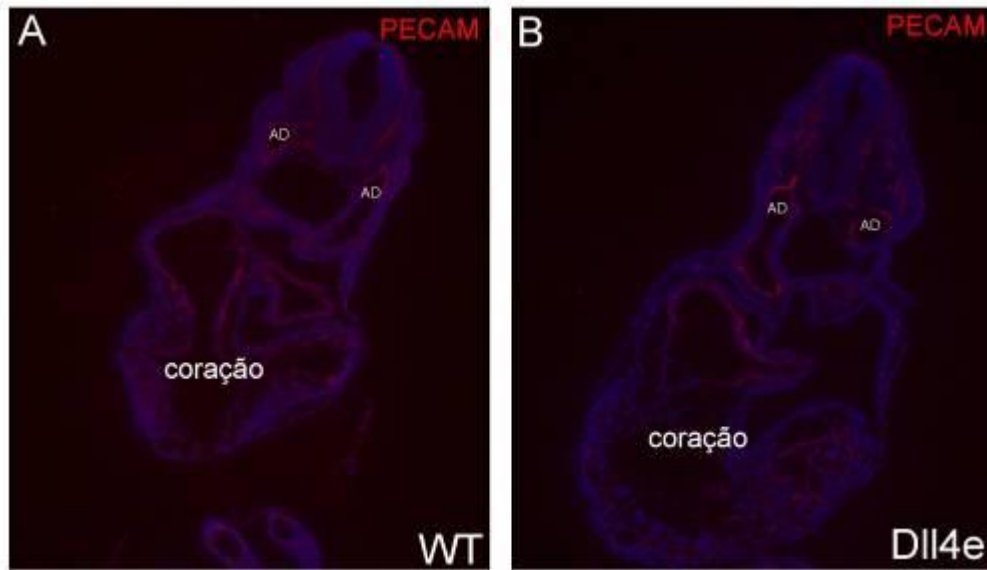


Figura 74 – Imunofluorescência para PECAM de criosecções de embriões Dll4e e controlo. Embrião Dll4e (B) apresentando hipertrofia cardíaca, comparado com embrião controlo (A).

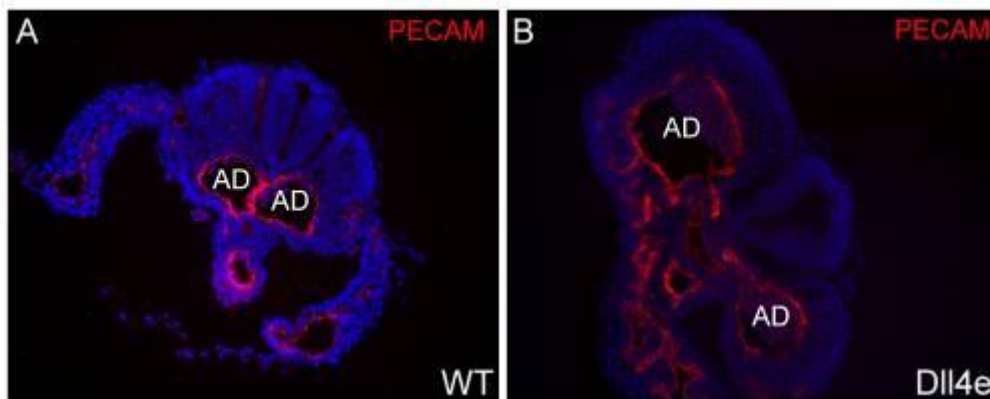


Figura 75 - Embrião Dll4e apresentando hipertrofia das AD na região posterior. Imunofluorescência para PECAM de criosecções de embriões Dll4e e controlo.

Estudo de proliferação celular com BrdU revelaram que existe uma diminuição de 50% na frequência de proliferação de células endoteliais arteriais nos embriões Dll4e, relativamente aos embriões controlo. A contagem do número de células endoteliais por secção de AD indicou que existe um aumento de 55% nos embriões Dll4e, em relação aos embriões controlo. Usaram-se três embriões controlo e três embriões Dll4e para as contagens e doze criosecções por embrião.

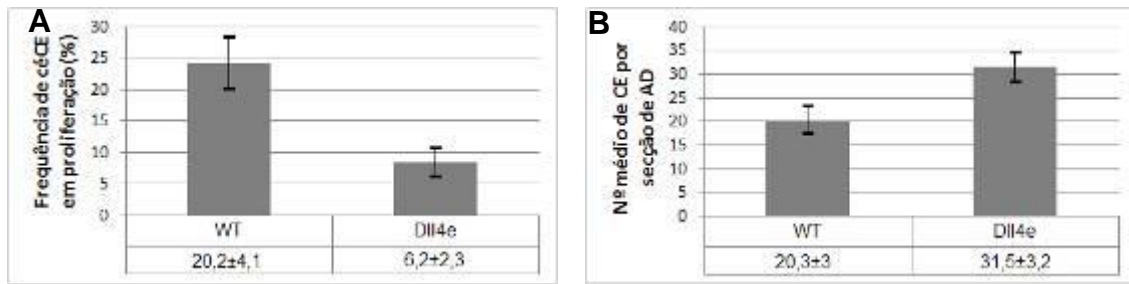


Figura 76 – (A) Gráfico de frequência de proliferação de células endoteliais arteriais. Note-se uma diminuição de 50% na frequência de proliferação de células endoteliais arteriais em embriões DT, face aos embriões controlo. (B) Gráfico do número médio de células endoteliais por secção de aorta. Note-se um aumento de 55% no número médio de células endoteliais por secção de AD nos embriões DT, face aos embriões controlo. Linhas centrais representam a amplitude de variação, média \pm desvio padrão. (A, B) $p < 0,001$ (Wilcoxon W).

Os embriões Dll4e recapitulam outro defeito dos embriões DT, a formação de malformações artério-venosas entre as AD, as VCA, e o seio venoso do coração.

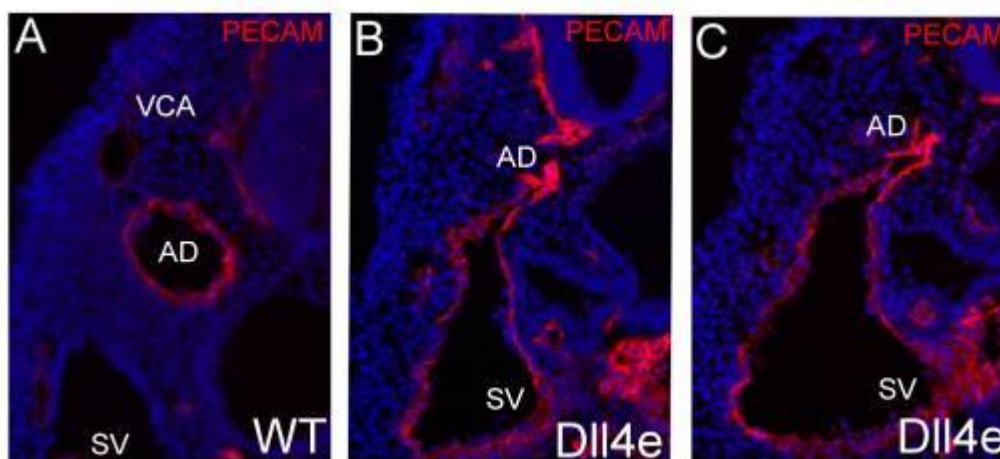


Figura 77 – Malformações artério-venosas em embriões Dll4e. Imunofluorescência para PECAM de criosecções de embriões controlo e Dll4e. Note-se a formação de uma ligação discreta entre as AD e o seio venoso (SV), nos embriões Dll4e (B e C), por comparação ao embrião controlo (A), em que a VCA se mantém separada da AD.

O recrutamento de células de músculo liso para a AD está aumentado nos embriões Dll4e, revelando que estes embriões têm uma maturação acelerada das células endoteliais arteriais.

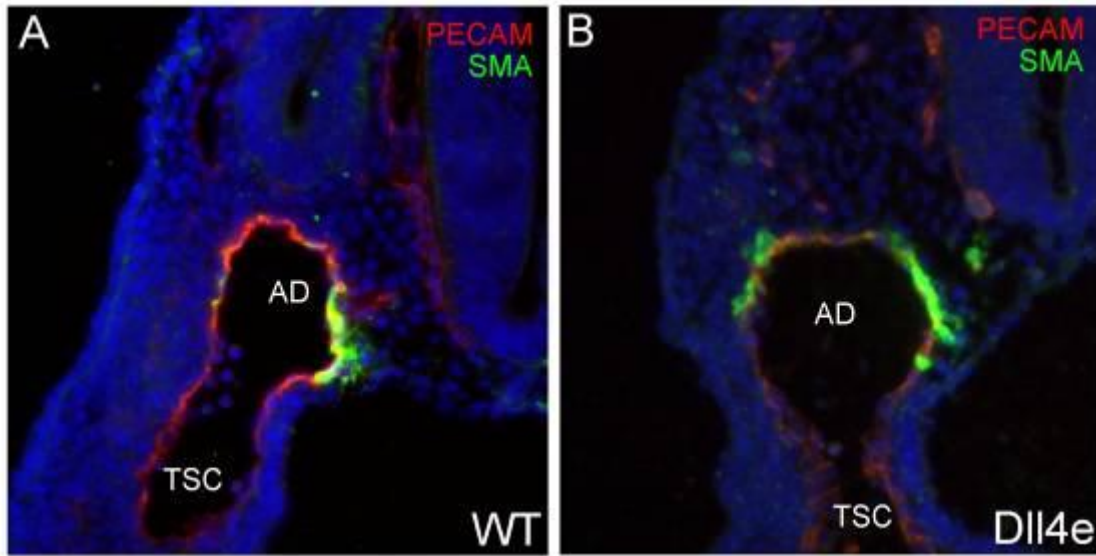


Figura 78 – Recrutamento de músculo liso nas aortas dorsais. Imunofluorescência para PECAM e SMA de crioseções de embriões controle e Dll4e. As AD dos embriões Dll4e (B) apresentam um aumento no recrutamento de células de músculo liso, por comparação aos embriões controle (A).

Tal como acontecia nos embriões DT, os embriões Dll4e têm também um aumento na produção de matriz extracelular rodeante às AD.

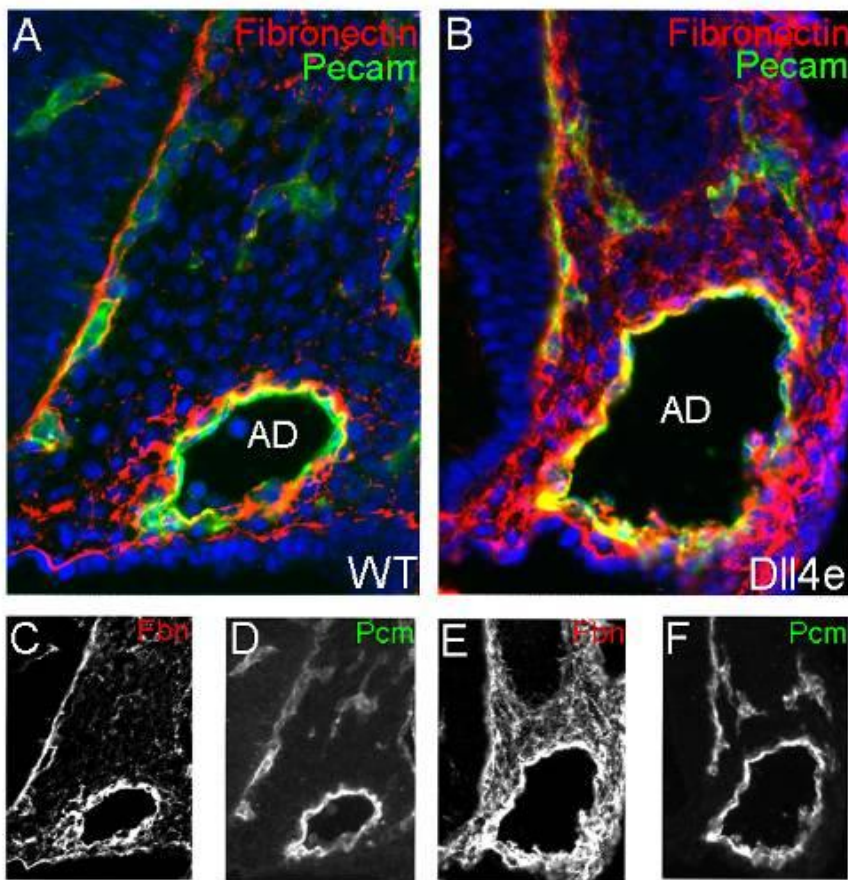


Figura 79 – Imunofluorescência para Fibronectina e PECAM em crioseções de embriões controle e Dll4e. Note-se o aumento de produção de matriz extracelular ao redor da AD do embrião Dll4e (B), por comparação com o embrião controle (A).

4.4 – Discussão

Para obter sobre-expressão endotelial de *Dll4*, por oposição à sobre-expressão ubíqua analisada até agora, decidiu-se cruzar a linha Z/EG-Dll4 com uma linha de murganhos transgênicos com expressão endotelial de Cre.

Testaram-se três linhas de murganhos, Tie1-Cre (Gustafsson, *et al.*, 2001), Tie2-Cre (Kisanuki, *et al.*, 2001) e Flk1-Cre (Motoike, *et al.*, 2003). Quando cruzada com a linha Z/EG-Dll4 ou com a linha repórter ROSA26R (Soriano, 1999) nenhuma das linhas produziu uma expressão endotelial robusta da recombinase Cre. O melhor resultado foi obtido quando se analisaram embriões DT, Z/EG-Dll4^{+/-}, Tie2-Cre^{+/+}. Estes embriões revelaram uma expressão vascular de EGFP, embora fosse dispersa, avaliada como estando presente em 21,2% das células endoteliais das AD e apenas 3,6% das células endoteliais das VCA aos 9,5 dpc e como 32% dos capilares dérmicos aos 14,5 dpc. Estes embriões foram analisados desde os 9,5 dpc até aos 14,5 dpc, nunca apresentando defeitos vasculares visíveis ou mensuráveis.

O facto de não se terem detectado defeitos vasculares nos embriões com sobre-expressão endotelial de *Dll4* pode ser explicado de várias formas. É provável que seja resultado da baixa frequência de recombinação no endotélio e que este facto esteja associado ao modo de funcionamento de Dll4, e da via Notch, no endotélio. O facto de apesar da baixa frequência de células endoteliais a sobre-expressarem *Dll4* não se ter produzido defeitos vasculares pode indicar que havendo células endoteliais com expressão endógena de *Dll4*, o fenótipo a produzir é suprimido ou compensado.

Comparando com os resultados obtidos com a sobre-expressão ubíqua de *Dll4*, considerando o fenótipo visível esperado, a falta de hipertrofia das AD pode ser explicada pelo facto de, praticamente, não haver células das VCA a sobre-expressarem *Dll4* e que por isso nestes embriões não existe apenas uma identidade endotelial e logo não aparecem fusões artério-venosas. O facto de haver células endoteliais arteriais que não sobre-expressam *Dll4* também levanta a hipótese de haver células endoteliais que não sofrem o efeito da sobre-activação de sinalização Notch e que por isso respondem normalmente aos gradientes atractores de factores de crescimento, tendo por isso um padrão de migração normal para as regiões dorsais e compensando o defeito apresentado pelas células que acabem por sofrer os efeitos da sobre-activação localizada da via Notch.

O problema subjacente à ausência de fenótipo pode ser intrínseco à actividade das linhas de murganhos transgênicos com expressão endotelial de *cre*. Os resultados obtidos com estas linhas foram sempre fracos e esporádicos. Sabendo que a linha CAG-Cre usada anteriormente tem a capacidade de produzir recombinação em todas as células do embrião

pode-se especular que o problema esteja na potência do promotor usado. Os promotores endoteliais usados poderão ter um nível de expressão mais baixo que o conjunto promotor/*enhancer*, CAG. Nesse caso o problema pode também estar associado à capacidade da recombinase Cre actuar em baixas concentrações, ou seja, à sua sensibilidade.

O problema pode também estar associado ao tempo de actuação da recombinase Cre. No caso da linha CAG-Cre, a expressão de *cre* está sempre ligada, desde o estágio de óvulo fertilizado. Este facto faz com que estatisticamente seja muito provável que, por volta dos 7,5 – 8 dpc, quando se começa a formar o sistema vascular, já ocorreu recombinação na maior parte das células do embrião, provavelmente há várias gerações clonais. No caso das linhas de murganhos transgénicos com expressão endotelial de *cre* a expressão de *cre* começa ao mesmo tempo que o sistema vascular se começa a formar e, provavelmente, com um nível de expressão mais baixo que no caso da CAG-Cre. Esta pode ser a razão para a baixa frequência de células endoteliais recombinadas aos 9,5 dpc, que sobe aos 14,5 dpc, embora mantendo-se num nível suficientemente baixo para não produzir defeitos vasculares.

O facto de não termos conseguido obter uma sobre-expressão robusta de *Dll4* no endotélio embrionário com o sistema Z/EG e Cre, levou-nos a procurar um método alternativo de conseguir esse propósito. Esse método teria de ser bastante sensível, para que, mesmo usando um promotor específico do endotélio, que sendo um tecido de crescimento lento tem níveis de expressão basal baixos, consiga obter sobre-expressão numa proporção elevada de células endoteliais, preferencialmente em 100%. O sistema escolhido foi o sistema Tet.

Produziram-se dois vectores de sobre-expressão que diferem no facto de um deles incorporar um sistema de repórter. Devido a limitações de tempo não foi possível produzir ambas as linhas de murganhos, sendo que só a linha de murganhos TetO₇-*Dll4* se encontra produzida.

Os trabalhos de cruzamento das linhas TetO₇-*Dll4* com a linha Tie2-rtTA-M2 revelaram que o fenótipo de sobre-expressão de *Dll4* específica ao endotélio é idêntico ao analisado nos embriões com sobre-expressão ubíqua de *Dll4*. Em ambos os casos, resultam embriões com AD hipertrofiadas e com defeitos no remodelamento das VCA. A hipertrofia das AD é causada, não por um aumento na taxa de proliferação endotelial arterial, mas sim pela acumulação de células endoteliais nas AD, células que não iniciam, ou atrasam, processos migratórios estimulados por factores pró-angiogénicos. Em ambas as linhas, a sobre-expressão de *Dll4* causa um aumento na produção de matriz extracelular, um fenótipo associado à indução de um estado de quiescência e maturação vascular. Os resultados da análise ao recrutamento de perícitos também confirmam esta indução de maturação endotelial, sendo curiosamente um fenótipo não observado nos embriões DT. É provável que a situação

dos embriões DT seja resultado da sobre-activação da via Notch em células de músculo liso ou nos seus progenitores (Domenga, *et al.*, 2004).

Estes resultados confirmam que o fenótipo vascular analisado com os embriões DT, revela de facto um ganho-de-função autónomo ao endotélio. A linha TetO₇-Dll4 fica confirmada como sendo funcional, sendo bastante importante para uma futura análise dos efeitos da sobre-expressão de *Dll4* na homeostasia vascular de ratinhos adultos e no desenvolvimento da vasculatura tumoral e dos tumores em si.

Os trabalhos de microinjecção pronuclear do vector TetO₇-Dll4IRESGFP ainda se encontram em curso.

Capítulo 5 - Análise transcriptômica

5.1 – Introdução

A análise do fenótipo gerado pela sobre-expressão de *dll4*, apresentado nesta tese, e pela perda de função em *Dll4* (Duarte, *et al.*, 2004, Gale, *et al.*, 2004, Krebs, *et al.*, 2004) revelou a importância deste gene na regulação da angiogénese, em que mesmo pequenas alterações no nível de expressão deste gene têm consequências graves no correcto desenvolvimento vascular embrionário. Estes factos levaram ao início de novas linhas de investigação neste laboratório, expandindo o interesse neste gene e na sua função na vasculatura.

O primeiro passo na expansão da análise da função de Dll4 na angiogénese foi a realização de uma análise transcriptômica nos embriões DT, comparada com embriões controlo. Esta análise, fazendo recurso da tecnologia de *chips* de oligonucleótidos da Affymetrix, GeneChip, permite analisar a variação de nível de expressão de praticamente todos os genes expressos em ratinhos, entre amostras. O objectivo desta análise foi determinar os genes que são activados pela sobre-activação da via Notch induzida pela sobre-expressão de *Dll4* no endotélio. Estes resultados têm o potencial de revelar quais os efectores da via Notch no endotélio, quais os genes que são activados ou desactivados como resposta à activação da via Notch para produzir uma determinada resposta celular e quais os genes que estabelecem pontos de ligação com outras vias de sinalização com função conhecida na angiogénese. Outro ponto de potencial interesse foi a identificação de novos genes que possam ser potencialmente alvos terapêuticos, tal como *Dll4* entretanto se revelou (Noguera-Troise, *et al.*, 2006, Ridgway, *et al.*, 2006, Sclafani, *et al.*, 2007).

Esta análise seria efectuada em embriões com sobre-expressão ubíqua de *Dll4*. Esta escolha foi baseada em limitações temporais e de disponibilidade de murinhos de sobre-expressão de *Dll4* específica ao endotélio. Como os resultados do capítulo anterior indicaram que os defeitos vasculares observados nos embriões com sobre-expressão ubíqua de *Dll4* eram autónomos ao endotélio, decidiu-se usar ARN extraído de células endoteliais isoladas de embriões com sobre-expressão ubíqua de *Dll4*, e seus respectivos controlos, para esta experiência.

5.2 – Materiais e métodos

5.2.1 - Dissociação e imunomarcção de embriões para citometria

Recolhem-se os embriões e separam-se conforme os grupos pretendidos para o estudo e conforme o genótipo. Coloca-se os embriões em DMEM com 5% de soro fetal bovino (Hyclone SH30070.03), a 4°C, e partem-se os embriões em três partes, para acelerar o processo de dissociação. Em seguida transferem-se os fragmentos para tubos *eppendorf* e centrifuga-se durante cinco minutos a 200g, a 4°C. Remove-se o sobrenadante e ressuspendem-se os fragmentos em 1ml de PBS e em seguida centrifuga-se de novo, ressuspendendo em 500µl de uma solução de colagenaseIII (Worthington) com 312,5U/ml. Colocam-se os tubos a 37°C, em banho-maria durante 15 minutos, passando as células 15 vezes por uma seringa com agulha de 18G de cinco em cinco minutos, para ajudar à dissociação.

Após o tempo de incubação adiciona-se 10% de soro fetal bovino em DMEM à suspensão celular para bloquear a actividade da colagenase. Em seguida centrifugam-se os tubos e ressuspende-se as células em 800µl de HBSS (Gibco BRL 14025-050) e passa-se as células por um filtro de *nylon* com poro de 40µm (BD Falcon 352340), passando por gravidade. Em seguida passa-se 400µl de HBSS pelo mesmo filtro, para o lavar, e adiciona-se 100µl de soro fetal bovino à suspensão celular filtrada e centrifugam-se as células. Ressuspende-se as células em 50µl de HBSS e adiciona-se 2,5µl de soro de rato (Sigma R9759) e incubam-se as células em gelo, durante 20 minutos para bloquear as ligações inespecíficas. Em seguida adiciona-se anticorpo anti-PECAM acoplado a APC (BD Pharmingen 551262), de modo a perfazer uma diluição de 1:400 e incubam-se as células em gelo, durante 30 minutos. No fim desse tempo adiciona-se 1ml de HBSS com 10% de soro fetal bovino, para diluir o anticorpo não acoplado ao antigénio, e centrifugam-se as células. As células são ressuspendidas em 250µl de PBS com 1% de soro fetal bovino e transferidas para tubos de citometria.

5.2.1.1 - Citometria de fluxo

Para esta análise usámos o citómetro Becton Dickinson FACScalibur, um citómetro que permite analisar até quatro marcações independentes na amostra. Neste caso usámos apenas três marcações independentes, iodeto de propídio (PI), que marca células mortas e é lido nos canais FL2 e FL3, EGFP, que marca as células que sobre-expressam *Dll4* e é lido no canal FL1, e anti-CD31-APC (PharMingen), para marcar as células endoteliais e é lido no canal FL4.

Após o protocolo de dissociação dos embriões e marcação com o anticorpo pretendido, as amostras foram analisadas no citómetro. Por técnicas correntes de análise citométrica definimos as características de potência de cada *laser*, voltagem dos detectores e de compensação entre os vários *lasers* de modo a que uma amostra de células não marcadas não permitisse a presença de eventos positivos para nenhum tipo de fluorescência. Em seguida analisam-se as amostras com fluorescência, confirmando sempre que surgem eventos positivos para a fluorescência esperada em cada amostra testada, PI, EGFP e APC no caso de amostras de embriões DT e PI e APC no caso de amostras controlo.

Para as contagens foram consideradas todas as células endoteliais, com fluorescência no canal FL4, no caso dos embriões controlo, e as células que fossem duplas positivas para EGFP, com fluorescência no canal FL1, e APC, com fluorescência no canal FL4, no caso dos embriões DT.

5.2.1.2 - Isolamento de células endoteliais por FACS

O isolamento de células endoteliais foi executado no aparelho Cytomation MoFlo, sob supervisão do Dr. Alexis Gonzalez, Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras. As células pretendidas foram determinadas da mesma forma que havia sido feito na fase de citometria de fluxo e foram recolhidas em 500µl de tampão RLT + 1% beta-mercaptoetanol, do *kit* comercial Qiagen RNeasy (Qiagen 74104), a 4°C.

5.2.2 - Extração de ARN de células endoteliais isoladas

As células endoteliais isoladas foram lisadas e homogenizadas ao serem vortexadas durante um minuto. Em seguida seguiu-se o protocolo do *kit* Qiagen RNeasy segundo as instruções do fabricante, fazendo todos os passos opcionais. No fim do protocolo o ARN foi eluído em 30µl de água bidestilada, fornecida no *kit* comercial, e congelado a -80°C até ser usado.

5.2.2.1 - Análise da qualidade do ARN

O ARN extraído foi quantificado inicialmente num espectrofotómetro Nanodrop. Neste aparelho usa-se apenas 1µl de amostra para obter a quantificação e qualificação do ARN, através da medição do rácio de absorção a 260nm e 280nm, que deve ser superior a 1,8 em amostras de ARN puro, que foi o caso em todas as amostras testadas. Em seguida as amostras foram entregues ao Serviço de expressão génica da Unidade de Genómica do Instituto Gulbenkian de Ciência para verificação da qualidade e integridade dos ARNs e amplificação, marcação, hibridação com os GeneChips e leitura dos GeneChips hibridados.

As amostras foram analisadas por electroferograma num Agilent 2100 BioAnalyzer. Os resultados obtidos das diferentes amostras que foram usadas para hibridar com GeneChips revelaram picos correspondentes ao ARN ribossomal 28s e 18s bem definidos, com rácio superior a 1,2, que por si não pode ser considerado como um indicador de boa ou má qualidade de ARN. O BioAnalyzer calcula um valor, determinado RIN (número de integridade de ARN), que corresponde a uma avaliação da integridade da amostra de ARN. Este valor varia entre 0 e 10, sendo que 10 corresponde a uma amostra em que todas as moléculas de ARN se encontram intactas. Este valor é o melhor indicador de qualidade de ARN que se pode usar. As seis amostras usadas para hibridar com GeneChips apresentavam valores de RIN superiores a 7,5. A análise do electroferograma indica também uma estimativa de concentração de ARN na amostra que se revelou mais precisa que a medição efectuada no NanoDrop, sendo este o valor usado para os cálculos seguintes.

5.2.3 - Amplificação das amostras de ARN e hibridação com GeneChips

Após a selecção das amostras que cumprissem os critérios de quantidade (mais de 100ng de ARN total), e qualidade pretendidos, as amostras foram amplificadas pelo protocolo de amplificação de amostras de pequena concentração da Affymetrix, *Genechip two-cycle target labelling and control reagents*. Depois de amplificadas, 100 a 1000 vezes, e marcadas com biotina as amostras foram fragmentadas, produzindo moléculas com um tamanho compreendido entre as 35 e as 200 bases. A hibridação da amostra fragmentada com os GeneChips é realizada a 45 °C, durante 16 horas, num forno *GeneChip® Hybridization Oven 640* da *Affymetrix*. Após a hibridação os GeneChips são lavados no aparelho *GeneChip® Fluidics Station 400* da *Affymetrix* e em seguida são lidos num *GeneChip® Scanner 3000* da *Affymetrix*. O trabalho realizado pela Unidade de Genómica incluiu ainda a análise estatística e normalização dos dados, fornecendo-nos uma lista de genes que variavam entre as amostras de forma considerada como estatisticamente significativa.

5.2.3.1 - Controlo de qualidade dos microarrays

Antes de se proceder à análise dos resultados, analisam-se os resultados dos controlos, para verificar se a ensaio decorreu como era esperado. O primeiro consiste em adicionar, ao ARN total, moléculas de ARN, com caudas *poly-A*. Estes ARN são transcritos de genes bacterianos, não presentes em eucariotas e cuja quantidade na amostra é conhecida. Se os passos de amplificação e hibridação decorrerem sem incidentes, deve haver uma relação directa entre a quantidade de ARN inicial e a fluorescência detectada pelo *scanner*. Verificou-se em todas as experiências uma relação aproximadamente linear, com factores de correlação superiores a 0,98.

Os controlos OligoB2, já marcados com biotina, hibridam em células alternadas à volta do chip e nos cantos (figura 3.1). O objectivo destes controlos é simplesmente permitir alinhar a grelha que o software constrói para analisar as imagens obtidas.

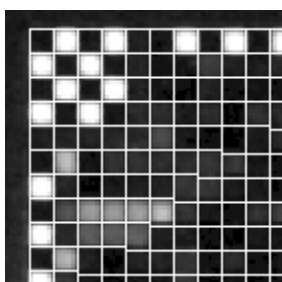


Figura 80 - Fotografia ilustrativa do padrão quadriculado característico formado nos quatro cantos do *chip* e do padrão alternado existente ao longo do bordo exterior, resultantes da hibridação do controle Oligo B2.

Por último, os chips contêm conjuntos de sondas para genes expressos constitutivamente, como a actina ou o GAPDH. Os valores dos sinais medidos para as sondas 3' e 5' de cada gene devem ser semelhantes. A razão 3'/5' deve ser próxima de um e nunca maior que três, o que pode revelar a existência de cARN degradado, uma ineficiente transcrição do ADNc de cadeia dupla, ou mesmo uma ineficiente marcação do ARNc com biotina.

5.2.3.2 - Normalização

A intensidade média global pode variar entre dois *chips* diferentes. Através do recurso ao *software* dChip v1.3 (Haigh, *et al.*, 2003), é possível normalizar as intensidades de modo a se poderem comparar os *chips*. É escolhido um que serve de referência e o programa altera os outros de modo a ficarem com uma intensidade média global semelhante. Para isso compara iterativamente as células com sondas PM dos dois *chips*, seleccionando aquelas em que as diferenças são menores, que são utilizadas para o traçado de uma curva de normalização.

5.2.3.3 - Análise dos níveis de expressão

A determinação do nível de expressão de um gene leva em consideração o conjunto dos 11 pares de sondas diferentes para esse gene. Cada sonda está presente em quantidades diferentes das outras, originando um perfil diferente para cada gene. Espera-se, portanto, que a intensidade de fluorescência medida esteja de acordo com esse perfil. Uma célula completamente desajustada em relação ao esperado é eliminada. Quanto maior for o ajuste ao perfil, menor é o erro da medição. Isto permite considerar os erros provocados por hibridações cruzadas.

Os valores do nível de expressão de um gene num chip são comparados com os do chip de controlo (neste caso os mutantes comparados com os normais), tendo em conta os erros. Nesta fase da análise estatística geram-se três valores diferentes de variação para cada gene, *lower bound of Fc* (valor mínimo de variação significativa), *upper bound of Fc* (valor máximo de variação significativa), *average variation* (valor médio de variação). Estes três valores representam uma janela de variação na expressão de um determinado gene entre amostras, tendo em conta os valores de erro associado às leituras dos diferentes pares de sondas nas diferentes repetições e associado a variações de leitura face aos controlos internos, positivos e negativos. Esse valor de erro é então somado (*upper bound of Fc*) ou subtraído (*lower bound of Fc*) do valor de variação média, gerando uma janela de confiança de variação. Para as comparações dos níveis de expressão utiliza-se o limite inferior do intervalo (*lower bound of confidence*), uma vez que se estabelece um valor mínimo de variação como critério de selecção. Ao valor da variação é atribuído o sinal positivo ou negativo, conforme a expressão do gene esteja aumentada ou diminuída em relação ao controlo.

5.2.4 - Análise de expressão génica por PCR em tempo real semi-quantitativo

A análise de variação de níveis de expressão génica por PCR em tempo real foi realizada em amostras de ARN idênticas às usadas para GeneChips. As amostras de ARN foram sujeitas ao mesmo processo de amplificação, até à fase de ARNc biotínido, estando portanto amplificado a níveis idênticos que os usados na experiência de *microarrays*.

A primeira fase desta experiência envolveu o desenho de oligonucleótidos iniciadores específicos para os vários genes que se pretendia estudar. Os oligonucleótidos iniciadores foram desenhados no programa Primer3, acessível em http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi, seleccionando um tamanho de amplificação pretendido entre 80 e 120 pb, um conteúdo G+C entre 40 e 80%, uma temperatura de *melting* entre 62 e 65°C e deixando as outras opções na selecção por defeito. Como base de trabalho usaram-se as sequências de ADNc de referência para *Mus musculus* para cada gene a testar, obtidas em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Gene>.

Para produzir ADNc fez-se recurso a uma reacção de transcrição reversa, em que se usaram oligonucleótidos oligo(dT)₂₀ e oligonucleótidos hexâmeros aleatórios como pontos de

partida para a reacção. Este sistema, parte do *kit SuperScript III First-strand synthesis supermix for qRT-PCR* (Invitrogen 11752-050), permite uma transcrição reversa fiável e consistente de todas as moléculas de ARNc presentes nas amostras. As reacções foram executadas seguindo as instruções do fabricante.

As reacções de PCR em tempo real semi-quantitativo foram realizadas com o *kit Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems 4367659), segundo as instruções do fabricante. O SYBR Green é um agente intercalador, fluorescente quando ligado à dupla cadeia de DNA (Morrison, *et al.*, 1998). A reacção amplificação de ADN é acompanhada, medindo a fluorescência ao fim do passo de extensão. Para cada amostra obtém-se um valor de C_T , correspondente ao início da fase exponencial da emissão de fluorescência. Este valor é inversamente proporcional à quantidade de ADN deste gene, presente na amostra.

Usou-se o termociclador em tempo real, Applied Biosystems 7300. As condições de reacção foram sempre 40 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 95°C e um minuto de emparelhamento e extensão a 60°C, precedidos de um passo de desnaturação e activação da polimerase de ADN, AmpliTaq. No fim do protocolo seguiu-se um passo de desnaturação sucessiva a temperaturas crescentes, até que, no ponto em que as cadeias se separam, verificasse uma diminuição brusca da fluorescência. A temperatura a que isto acontece (T_m) está relacionada com o comprimento da molécula de ADN, pelo que moléculas iguais têm T_m iguais. O objectivo da realização desta curva é verificar se em cada reacção foi amplificado apenas um fragmento e se este foi igual em todas as reacções de amplificação de um determinado gene.

Para todas as reacções usou-se o gene *beta-actina* (Suchting, *et al.*, 2007) como controlo interno de expressão e avaliou-se a presença de mais do que um produto de amplificação em solução, indicando inespecificidade da reacção. Os resultados apresentados representam reacções em que se formou apenas um produto de amplificação.

5.3 – Resultados

5.3.1 - FACS de células endoteliais de embriões

Para realizar o estudo do padrão de variação transcriptómica resultante da sobre-expressão de *dll4* decidiu-se produzir amostras de ARN a partir de células endoteliais isoladas por FACS (sorteamento de células activado por fluorescência) de suspensões obtidas da dissociação de embriões controlo e DT com 8-10 sómitos (8,5 dpc) marcadas com anticorpo anti-PECAM acoplado ao fluorocromo APC (Pharmingen). Decidiu-se usar embriões desta idade pois ainda não têm circulação sanguínea activa, excluindo-se assim um factor que poderia influenciar os resultados.

O estudo iniciou-se com a citometria de fluxo de amostras de células extraídas da dissociação de embriões WT, que em média deu origem a 3×10^5 células por embrião de 8-10 sómitos. Este processo serviu para determinar a eficácia do anticorpo no isolamento das células endoteliais e para determinar a diluição de anticorpo a usar. Para tal compararam-se os valores de frequência de células endoteliais em amostras marcadas com diferentes concentrações de anticorpo. Optou-se pela concentração mais baixa antes de começar a baixar a frequência, neste caso, 1:400.

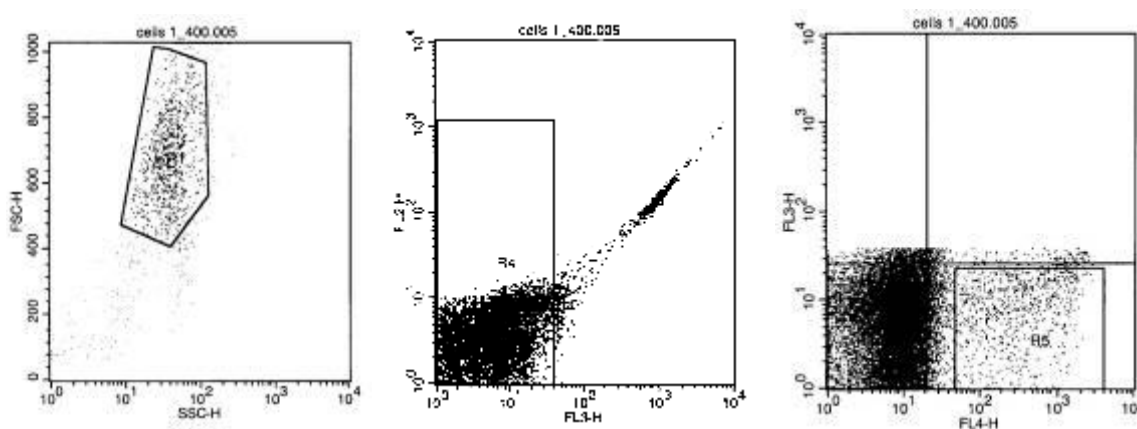


Figura 81 – Gráficos de pontos relativos à análise em citometria de fluxo de amostras de células extraídas, por dissociação, de embriões controlo, marcadas com anticorpo anti-PECAM-APC. À esquerda, comparação de propriedades de *forward scatter* e *side scatter* das células da amostra. As células endoteliais são muito diversas em tamanho e forma, revelando uma distribuição lata neste gráfico. Ao meio, comparação dos canais de fluorescência FL2 e FL3. As células positivas em ambos os canais de fluorescência correspondem a células mortas, sendo positivas para Iodeto de Propídio, representando cerca de 5% dos eventos totais. À direita, comparação dos canais de fluorescência FL3 e FL4. As células com fluorescência elevada no canal FL4 são consideradas células endoteliais. Correspodendo a cerca de 1,66% dos eventos totais.

Os resultados indicaram que a população de células endoteliais embrionárias tem uma grande variabilidade de tamanho e rugosidade, determinado pelo facto de as células

marcadas pelo anticorpo anti-PECAM terem uma distribuição de *forward scatter* (difracção frontal, é proporcional ao diâmetro das células) e *side scatter* (difracção lateral, é proporcional à rugosidade das células) muito lata (esta marcação foi confirmada num protocolo em que se usaram dois anticorpos, anti-PECAM-APC e anti-Flk1-PE ao mesmo tempo). Deste modo determinou-se que 1,66% dos eventos detectados por citometria de fluxo correspondiam a células endoteliais.

Passando à fase de sorteamento de células a experiência passou a ser feita com embriões DT e WT. Decidiu-se que seriam seleccionadas as células positivas para PECAM no caso dos embriões WT e as células que fossem positivas para GFP e PECAM no caso dos embriões DT. Devido a diferenças entre o aparelho de citometria de fluxo (BD FACS Calibur) e de FACS (MoFlo), e a uma maior restringência na selecção das células positivas, a percentagem de células seleccionadas baixou. Para *sorting* foram seleccionadas, em média, 0,4% dos eventos detectados. Sabendo que conseguíamos extrair entre 150 a 250ng de ARN a partir de cerca de 4000 células endoteliais decidimos usar três embriões por amostra. Este número permitia também que se normalizassem os resultados face à variabilidade introduzida pelo facto de se trabalhar com embriões mantidos em cruzamentos não consaguíneos.

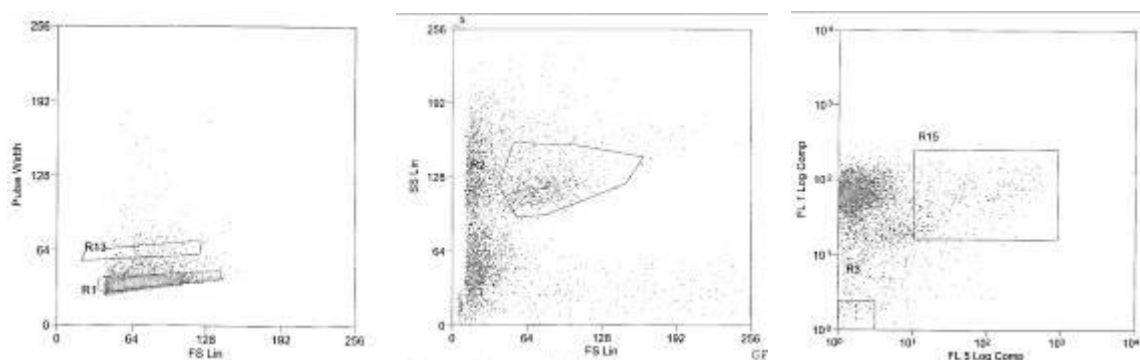


Figura 82 - Gráficos de pontos relativos à análise em citometria de fluxo de amostras de células extraídas, por dissociação, de embriões DT, marcadas com anticorpo anti-PECAM-APC. À esquerda, foi seleccionado o *gate* R1, que corresponde a células isoladas. Ao meio, comparação de propriedades de *forward scatter* e *side scatter*, neste caso seguiu-se o padrão que se havia determinado anteriormente na fase de citometria de fluxo. À direita, comparação dos canais de fluorescência FL1 (GFP) e FL5 (APC). As células endoteliais de embriões DT são seleccionadas por terem fluorescência em ambos os canais.

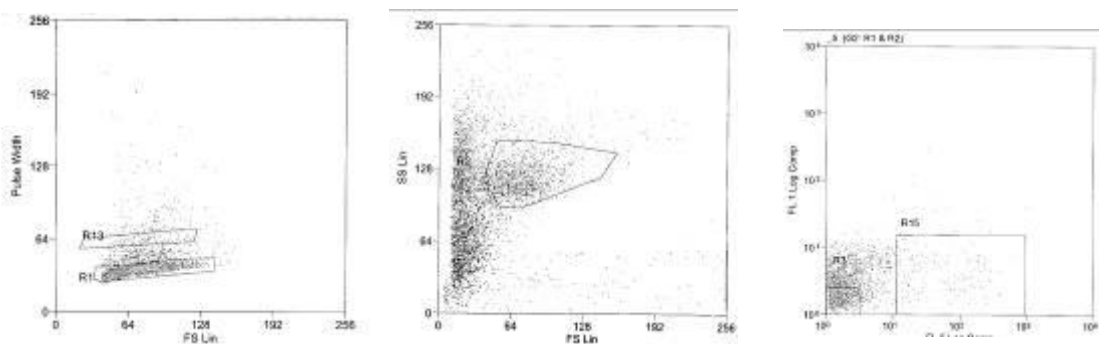


Figura 83 - Gráficos de pontos relativos à análise em citometria de fluxo de amostras de células extraídas, por dissociação, de embriões controle, marcadas com anticorpo anti-PECAM-APC. À esquerda, foi seleccionado o *gate* R1, que corresponde a células isoladas. Ao meio, comparação de propriedades de *forward scatter* e *side scatter*, neste caso seguiu-se o padrão que se havia determinado anteriormente na fase de citometria de fluxo. À direita, comparação dos canais de fluorescência FL1 (GFP) e FL5 (APC). As células endoteliais de embriões DT são deleccionadas por terem fluorescência apenas no canal FL5.

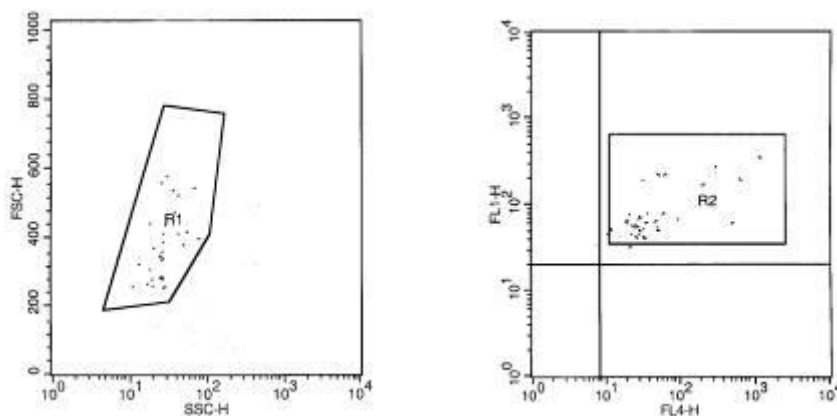


Figura 84 - Gráficos de pontos relativos à análise em citometria de fluxo de amostras de células resultantes de sorting de embriões DT. À esquerda, foi seleccionado o *gate* R1, que corresponde a células isoladas. À direita, comparação dos canais de fluorescência FL1 (GFP) e FL4 (APC). As células sorteadas têm as propriedades desejadas, fluorescência em ambos canais, FL1 e FL5, indicando um nível de pureza de 100%.

As células foram recolhidas em tampão RLT do sistema de extracção de ARN, *Qiagen* RNeasy. Deste trabalho resultaram vários conjuntos independentes de amostras de ARN que foram analisadas de modo a determinar a sua qualidade e quantidade.

5.3.2 – Processamento dos ARN e hibridação com GeneChips

A análise de qualidade e quantidade de ARN obtido foi efectuada num *Agilent 2100 Bioanalyser*. É de extrema importância a identificação dos picos 18S e 28S nas amostras de ARN total. Para amostras de ARN total de elevada qualidade, no electroferograma devem ser observados dois picos bem definidos, correspondentes às subunidades de ARN ribossómico 18S e 28S com uma razão de 28S:18S de aproximadamente 2:1. Caso houvesse degradação de ARN, esta seria detectada como um desvio na distribuição de tamanhos das moléculas de ARN na direcção dos menores fragmentos e por um decréscimo no sinal de fluorescência dos picos correspondentes. O *software* do *Bioanalyser* permite ainda a determinação do parâmetro RIN (*ARN integrity number*) que permite avaliar a integridade das amostras de ARN total obtidas. O seu valor varia entre 0 e 10, sendo tanto melhor a integridade das amostras quanto mais próximo de 10 estiver o valor. Dado à exigência pretendida, todas as amostras de ARN total analisadas possuíam um RIN superior a 8.

Como a quantidade de ARN total por amostra variou entre os 30ng e os 80ng, consoante a eficiência de sorteamento, em especial em relação à quantidade de células usadas para definir a população de interesse, e a eficiência de extracção de ARN obtida em cada caso. Decidiu-se usar amostras que tivessem mais de 60ng e usar 60ng como a quantidade inicial de ARN a processar. Esta quantidade levou a que se usasse o protocolo para pequenas amostras da Affymetrix, que se destina a amostras entre 10 e 100 ng de ARN.

As amostras foram amplificadas num processo em que se converte os ARNm em ADNc adicionado de um promotor de fago T7. Em seguida faz-se um passo de transcrição *in vitro*, que efectivamente amplifica uniformemente todas as moléculas de ARNm originais, convertendo-as em ARNc. Segue-se outro passo de transcrição reversa, seguido de novo de transcrição *in vitro*, amplificando de novo a amostra. No terceiro passo de amplificação os ARNc amplificados são convertidos de novo em ADNc e alvo de transcrição *in vitro* usando nucleótidos marcados com biotina (ddUTP-biotina e ddCTP-biotina), fazendo com que toda a população de moléculas de ARNc presentes na amostra final, amplificada três vezes, fique biotinilada. O ARNc marcado com biotina é fragmentado em moléculas com um tamanho compreendido entre as 35 e as 200 bases. Estas amostras foram então usadas num estudo com GeneChips da Affymetrix, executado pela Unidade de Genómica, em colaboração com o Dr. Jorg Becker, no Instituto Gulbenkian de Ciência. Para tal hibridaram-se 3 conjuntos independentes (WT e DT) de amostras de ARNc com *microarrays*. Os chips utilizados neste trabalho foram *Mouse Genome 430 2.0 Arrays* (Affymetrix #900495).

Após a hibridação os *chips* são lavados e em seguida são incubados com estreptavidina-ficoeritrina, que se liga à biotina, fazendo com que só nos poços em que houver hibridação entre a amostra e os ADNc alvo é que vai haver fluorescência quando, na fase de leitura, se incide um laser em cada poço. A quantidade de fluorescência emitida é directamente proporcional à quantidade de ARNm presente na amostra inicial. Assim torna-se possível comparar níveis de expressão de praticamente todos os genes transcritos entre amostras.

5.3.3 - Resultados dos GeneChip

No primeiro passo da análise dos resultados obtidos, os *arrays* são normalizados para que sejam reduzidas variações de origem não-biológica que possam existir. Depois, utilizando métodos estatísticos aplicados às intensidades de fluorescência obtidas para os pares de sondas que representam cada gene no *array*, é calculado um valor que traduz a abundância relativa de cada transcrito nas amostras analisadas. Adicionalmente, é determinado o grau de confiança com que um determinado transcrito é detectado (presente) ou não (ausente). O único pré-requisito absoluto para a obtenção de dados reprodutíveis e de confiança é a elevada qualidade da amostra de ARN que se pretende analisar (Becker ; Feijo, 2003).

Nas análises comparativas subsequentes compararam-se os valores de expressão obtidos para cada gene entre as diferentes amostras analisadas, sendo assim possível identificar os genes cuja expressão aumentou ou diminuiu entre as diferentes condições representadas pelas amostras e quantificar essas mesmas alterações (Becker ; Feijo, 2003).

Os resultados da análise da leitura dos seis GeneChip hibridados foram analisados na Unidade de Genómica do Instituto Gulbenkian de Ciência. Essa análise revelou 835 genes com expressão alterada dentro dos valores considerados como estatisticamente significativos, 1,15x de *lower bound of Fc* (valor mínimo de variação com confiança). Fazendo recurso de bases de dados públicas, como NCBI Gene Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>) e a Simple Modular Architecture Research Tool (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) analisou-se a informação disponível para cada um desses genes, quer a nível da sequência nucleotídica, como proteica (domínios codificados), como a nível funcional. Para 161 desses genes já existem linhas de ratinhos com perda de função, enquanto para a maioria, 531, ainda não existem ratinhos mutantes.

Os genes com expressão alterada nos embriões DT foram analisados individualmente quanto à sua função conhecida (se conhecida) e inseridos em conjuntos consoante a sua

função e/ou via de sinalização em que se inseriam. A tabela seguinte descreve os genes que se determinou serem mais interessantes entre os 835 genes.

Função	LocusLink	Média lower bound FC
Regulação de progressão no ciclo celular		
myeloproliferative leukemia virus oncogene	17480	-1,48
cyclin D1	12443	-1,19
G1 to S phase transition 1	14852	-1,69
cell division cycle 25 homolog A (S. cerevisiae)	12530	-1,2
Via Notch		
WD repeat domain 12	57750	-1,37
delta-like 4 (Drosophila)	54485	1,30
hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	15213	1,95
hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 2	15214	1,23
hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)	15205	1,51
hairy and enhancer of split 5 (Drosophila)	15208	1,98
forkhead box C2	14234	1,37
deltex 3 homolog (Drosophila)	80904	1,49
Receptores membranares associados a vias angiogénicas		
Neuropilin 2	18187	-1,33
FMS-like tyrosine kinase 1	14254	1,6
transforming growth factor, beta receptor II	21813	1,28
connective tissue growth factor	14219	1,85
transforming growth factor, beta induced	21810	1,53
Via MAPK		
regulator of G-protein signaling 4	19736	1,59
sprouty homolog 4 (Drosophila)	24066	1,42
Via Bcl2		
BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3-like	12177	1,33
Via PI3K		
Pleckstrin	56193	-2,17
Via mTOR		
ADN-damage-inducible transcript 4	74747	4,61
Migração celular		
neuron navigator 1	215690	-1,33

PTK2 protein tyrosine kinase 2	14083	-1,4
fascin homolog 1, actin bundling protein	14086	-1,23
astrotactin 1	11899	-1,57
actinin, alpha 1	109711	1,52
Gelsolin	227753	2,16
Nischarin	64652	1,44
Adesão celular e matriz extracelular		
integrin beta 5	16419	1,74
integrin alpha 4	16401	1,22
procollagen, type XIV, alpha 1	12818	2,16
procollagen, type IX, alpha 3	12841	1,3
matrilin 3	17182	1,3
Von Willebrand factor homolog	22371	1,76
a disintegrin-like and metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 7	108153	1,41
fibulin 1	14114	1,39
protocadherin 8	18530	2,4
cadherin 10	320873	1,84
vascular cell adhesion molecule 1	22329	2,41
Gap junction membrane channel protein alpha 7	14615	1,43
sorbin and SH3 domain containing 1	20411	1,21
discoidin domain receptor family, member 1	12305	1,8
Sinalização Wnt		
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 5	399510	-1,62
Lymphoid enhancer binding factor 1	16842	-1,21
secreted frizzled-related protein 2	20319	1,39
wingless-related MMTV integration site 5A	22418	1,52
wingless-related MMTV integration site 2	22413	2
dickkopf homolog 2 (<i>Xenopus laevis</i>)	56811	1,52

Tabela 22 – Organização dos genes considerados mais interessantes, após análise da literatura específica e domínios proteicos codificados pelo gene, em classes.

5.3.3.1 - Regulação de progressão no ciclo celular

myeloproliferative leukemia virus oncogene, -1,48x, está envolvido na interacção com várias vias celulares, como PI3K e MAPK. A sua função como activador do ciclo celular é dependente do estado de activação da via PI3K/AKT e MAPK p42/44 (Milot, *et al.*, 2002).

cyclin D1, -1,19x, diminuição de expressão de *ciclina D1* está associado a um bloqueio do ciclo celular na fase G1, sendo considerado um factor limitante à progressão da fase G1 da mitose (Quelle, *et al.*, 1993).

G1 to S phase transition 1, -1,69x, diminuição da expressão está associada a um bloqueio na fase de separação dos cromossomas replicados e assim a um bloqueio na mitose (Valouev *et al.* 2002).

cell division cycle 25 homolog A, -1,2x, é necessário para a transição G1/S, estando associado à activação dos complexos ciclina E-cdk2 e ciclina A-cdk2 (Hoffmann, *et al.*, 1994, Nguyen, *et al.*, 2002).

5.3.3.2 - Via Notch

WD repeat domain 12, -1,37x, sabe-se que é uma proteína nuclear que interacciona com o domínio intracelular de Notch1 (Nal, *et al.*, 2002).

delta-like 4, 1,3x, é o gene sobre-expresso nos embriões mutantes.

hairly/enhancer-of-split related with YRPW motif 1 e 2, 1,95x e 1,23x, alvos directos da sinalização Notch, são repressores transcricionais implicados na determinação do destino celular endotelial arterial (Fischer, *et al.*, 2004). Aumento de expressão de *hey1* está associado a uma diminuição na expressão de *vegfr2* e uma inibição da proliferação, migração a formação de redes vasculares (Henderson, *et al.*, 2001).

hairly and enhancer of split 1 e 5, 1,51x e 1,98x, alvos directos da sinalização Notch, são repressores transcricionais implicados em variados sistemas de decisão celular dependentes de sinalização Notch (Iso, *et al.*, 2003).

forkhead box C2, 1,37x, factor de transcrição necessário à expressão de *notch1* e *dll4* e por conseguinte à determinação do destino celular endotelial arterial (Seo, *et al.*, 2006).

deltex 3 homolog, 1,49x, funciona como ligase E3 de ubiquitina para Notch1, sendo responsável pela reciclagem do receptor, em membranas endocíticas, de volta à membrana celular onde pode contactar com os ligandos (Hori, *et al.*, 2004, Le Borgne, *et al.*, 2005, Takeyama, *et al.*, 2003). Os membros da família Deltex são considerados reguladores positivos de sinalização Notch.

5.3.3.3 – Receptores membranares associados a vias angiogénicas

Neuropilin 2, -1,33x, receptor de semaforinas de classe III e co-receptor de VEGF. É expresso no endotélio venoso e é necessário para a formação de capilares e vasos linfáticos (Yuan, *et al.*, 2002).

FMS-like tyrosine kinase 1, 1,6x, receptor 1 de VEGF-A. O facto de os mutantes de perda de função morrerem aos 8,5 dpc com defeitos vasculares e mutantes com remoção do domínio de cinase de tirosinas em ambos alelos serem viáveis e férteis, apenas com defeito na migração de macrófagos, levantou a noção de que este receptor actua apenas como armadilha para VEGF no desenvolvimento vascular (Fong, *et al.*, 1995, Hiratsuka, *et al.*, 1998).

transforming growth factor, beta receptor II, 1,28x, receptor de TGF-beta cuja perda de função resulta em letalidade aos 10,5 dpc com defeitos angiogénicos e hematopoiéticos (Oshima, *et al.*, 1996). Sinalização por TGF-beta foi implicada em determinação de identidade endotelial e na regulação de angiogénese (Sorensen, *et al.*, 2003). Este receptor está normalmente associado a ALK5 e em conjunto inibem a migração celular e proliferação (Lebrin, *et al.*, 2005).

connective tissue growth factor, 1,85x, tem a capacidade de interagir directamente com TGF-beta, potenciando a sua capacidade de interagir com os seus receptores (Abreu, *et al.*, 2002). Sabe-se que pode interagir com VEGF e pensa-se que ao fazê-lo o sequestra numa forma inactiva na matriz extracelular, regulando assim a sua libertação (Inoki, *et al.*, 2002). Também está envolvido na produção de matriz extracelular devido à sua capacidade de mediar a deposição de fibras de colagénio (Ivkovic, *et al.*, 2003).

transforming growth factor, beta induced, 1,53x, é uma proteína da matriz extracelular que ao interagir com a integrina $\alpha v\beta 3$ induz a adesão celular e inibe a migração (Nam, *et al.*, 2003).

5.3.3.4 – Via MAPK/ERK

regulator of G-protein signaling 4, 1,59x, inibidor selectivo da activação mediada por pequenas proteínas G da MAPK p38. Como consequência ocorre redução de proliferação endotelial, migração e redução de expressão de VEGF (Albig ; Schiemann, 2005).

sprouty homolog 4, 1,42x, inibidor da capacidade de FGF2 induzir a activação da via ERK através da interacção com a cinase Sos1 (Ozaki, *et al.*, 2005).

5.3.3.5 – Via Bcl2

BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3-like, 1,33x, gene pró-apoptótico que funciona inibindo a função de Bcl-2 e Bcl-XL (Chen, *et al.*, 1999).

5.3.3.6 – Via PKC/PI3K

Pleckstrin, -2,17, é o maior alvo de fosforilação por PKC e está envolvido na via PI3K (Tyers, *et al.*, 1989). Pleckstrin fosforilado também interage com integrinas e induz migração celular (Roll, *et al.*, 2000).

5.3.3.7 – Via mTOR

ADN-damage-inducible transcript 4, 4,61x, proteína induzida por *stress* que é um inibidor de mTOR (Corradetti, *et al.*, 2005).

5.3.3.8 – Migração celular

neuron navigator 1, -1,33x, proteína ligada aos microtúbulos necessária para a migração celular dependente de netrinas (Martinez-Lopez, *et al.*, 2005).

PTK2 protein tyrosine kinase 2, -1,4x, (FAK, cinase de adesões focais) é um mediador de sinalização por integrinas e factores de crescimento, como VEGF, necessário para a migração e proliferação endotelial (Ilic, *et al.*, 2003, Shen, *et al.*, 2005).

fascin homolog 1, -1,23x, proteína ligada ao citoesqueleto de actina com função de induzir a formação de estruturas filopodiais e lamelipodiais e assim induzir a mobilidade celular (Yamashiro, *et al.*, 1998).

astrotactin 1, -1,57x, a perda de função está associada a uma redução na migração de neurónios dependente de células da glia (Adams, *et al.*, 2002), funcionando como um ligando entre neurónios e glia (Zheng, *et al.*, 1996).

actinin, alpha 1, 1,52x, é uma enzima que produz ligações cruzadas entre moléculas de actina, formando filamento de actina, e que também se encontra em junções aderentes. Aumento de expressão de este gene está associado a uma redução significativa na mobilidade celular (Gluck ; Ben-Ze'ev, 1994).

gelsolin, 2,16x, está envolvido na reciclagem de actina em filamentos, sabe-se que é mais expresso em células não migrantes (Arora ; McCulloch, 1996).

nischarin, 1,44x, proteína intracelular que interacciona com integrinas e com a cinase PAK1, impedindo-a de fosforilar substratos e assim inibindo a migração celular (Alahari, *et al.*, 2004).

5.3.3.9 - Adesão celular e matriz extracelular

integrin beta 5, 1,74x, funciona essencialmente como uma molécula de adesão a vitronectina, um componente da matriz extracelular (Smith, *et al.*, 1990).

integrin alpha 4, 1,22x, tem a capacidade de funcionar como uma molécula de adesão a fibronectina, matriz extracelular, e adesão célula a célula, ao ligar-se a VCAM-1 (Yang, *et al.*, 1995).

procollagen, type XIV, alpha 1, 2,16x, constituinte da matriz extracelular, é também um indutor de quiescência e diferenciação (Ruehl, *et al.*, 2005).

procollagen, type IX, alpha 3, 1,3x, componente da matriz extracelular.

matrilin 3, 1,3x, componente da matriz extracelular.

Von Willebrand factor homolog, 1,76x, está presente na matriz extracelular do endotélio independentemente de colagénio (Wagner, *et al.*, 1984), podendo actuar como um indicador de disfunção endotelial (Lip ; Blann, 1995).

a disintegrin-like and metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 7, 1,41x, metaloprotease secretada com função na proteólise da matriz extracelular (Somerville, *et al.*, 2004). Dentro desta família de genes ADAMST1 tem função anti-angiogénica por sequestrar VEGF-A (Luque, *et al.*, 2003).

fibulin 1, 1,39x, proteína da matriz extracelular que se associa a ADAMST1, sendo um potenciador da função anti-angiogénica desta enzima (Lee, *et al.*, 2005).

protocadherin 8, 2,4x, pertence a um subgrupo da família das caderinas, moléculas de adesão célula a célula dependentes de Ca^{2+} (Makarenkova, *et al.*, 2005).

cadherin 10, 1,84x, caderina clássica de tipo II com função conhecida na microvasculatura do cérebro, barreira hematoencefálica e vasculatura da retina (Williams, *et al.*, 2005).

vascular cell adhesion molecule 1, 2,41x, molécula de adesão célula a célula também conhecida por mediar interações endotélio-leucócitos (Osborn, *et al.*, 1989).

Gap junction membrane channel protein alpha 7, 1,43x, membro da família das conexinas, responsáveis pela formação de junções de hiato – estruturas com função de comunicação

célula a célula. A perda de função deste gene replica muito fielmente o fenótipo de perda de função em *dll4* (Kruger, *et al.*, 2000).

sorbin and SH3 domain containing 1, 1,21x, proteína de ligação a I-afadina e vinculina, localizada em junções aderentes (Mandai, *et al.*, 1999).

discoidin domain receptor family, member 1, 1,8x, receptor membranar com domínio de cinase de tirosinas cujos ligandos são moléculas de colagénio, mediando assim a ligação célula-matriz extracelular (Vogel, *et al.*, 2001).

5.3.3.10 - Wnt signaling

Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 5, -1,62x, associa-se a GSK3 β estando envolvida na correcta fosforilação de GSK3 β , o que é necessário para a sua inactivação, estabilizando a beta-catenina para se deslocar para o núcleo (Shi, *et al.*, 2006).

Lymphoid enhancer binding factor 1, -1,21x, proteína de ligação ao ADN que forma complexos com beta-catenina e TCF, sendo essencial à localização nuclear de beta-catenina, conduzindo à activação da expressão de genes em resposta a sinalização Wnt/beta-catenina (Henderson, *et al.*, 2002).

secreted frizzled-related protein 2, 1,39x, proteína secretada que interacciona com ligandos Wnt para impedir sinalização subsequente (Satoh, *et al.*, 2006).

wingless-related MMTV integration site 5A, 1,52x, ligando da via Wnt capaz de induzir proliferação e sobrevivência de células endoteliais (Masckauchan, *et al.*, 2006).

wingless-related MMTV integration site 2, 2x, ligando da via Wnt, funciona como um regulador positivo de diferenciação endotelial (Wang, *et al.*, 2007).

dickkopf homolog 2, 1,52x, regulador negativo de sinalização Wnt, interacciona com o co-receptor LRP5/6 (Mukhopadhyay, *et al.*, 2006).

5.3.3.11 - Genes sem mutantes de perda de função conhecidos, com possível interesse

A escolha destes genes foi feita através da análise pormenorizada de todos os genes incluídos nos resultados dos microarrays. Selecionamos os genes que não tinham, ao momento, mutantes de perda de função descritos na literatura, que tivessem níveis de fluorescência superiores a 100 e variações superiores a 1,4x ou -1,4x. Dentro desses seleccionamos aqueles que tenham algum tipo de ligação possível à via Notch. O objectivo deste estudo foi tentar descobrir novos genes ligados à via Notch, com possibilidade de se revelarem alvos terapêuticos, tal como Dll4 se revelou. A análise seguinte passará por analisar os padrões de expressão destes genes e escolher os mais sugestivos para produzir mutantes de perda de função.

ankyrin repeat domain 37, 2,78x, codifica uma proteína com três repetições do domínio de *ankirina*, um domínio de interacção proteína-proteína, também presente em Notch, normalmente presente em factores de transcrição e reguladores de ciclo celular entre outros (Mosavi, *et al.*, 2004). É o segundo gene com maior variação no grupo analisado.

transmembrane 4 superfamily member 1, 1,94x, codifica uma proteína da superfamília transmembranar-4, previamente membros da família das tetraspaninas, foi associado à regulação do potencial metastático de um tumor (Kao, *et al.*, 2003, Wright, *et al.*, 2000).

sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4C, 1,76x, codifica uma proteína da família das semaforinas, moléculas reconhecidas pela sua ligação à migração de neurónios e diferenciação terminal de mioblastos em miotubos (Ko, *et al.*, 2005).

Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5, 1,76x, codifica uma GTPase da família Ras que funciona como *factor de troca do nucleótido guanina* (GEF) com Rap1, cujo aumento de função está associado à inibição de migração de células endoteliais e aumento de adesão celular (Chang, *et al.*, 2006, Rebhun, *et al.*, 2000).

Notch-regulated ankyrin repeat protein, 1,72x, codifica uma proteína com duas repetições do domínio de *ankirina*, reconhecido como sendo um regulador negativo de função do domínio intracelular de Notch, cuja expressão é induzida por sinalização Notch (Pirrot, *et al.*, 2004, Yun ; Bevan, 2003).

claudin domain containing 1, 1,7x, codifica uma proteína da família das claudinas, proteínas componentes das junções apertadas, com funções em adesão celular, transdução celular e tumorigénese (Oliveira ; Morgado-Diaz, 2007).

regulator of G-protein signaling 4, 1,59x, codifica uma proteína activadora de GTPases envolvida na regulação do processo de tubogénese em endotélio e epitélio, sendo um regulador negativo de migração, proliferação e de função de sinalização VEGF (Albig ; Schiemann, 2005).

WD repeat domain 78, 1,54x, codifica uma proteína com duas repetições do domínio WD40, cuja função é normalmente servir de suporte à montagem de complexos multi-proteínas, comum em proteínas envolvidas em transdução de sinal, regulação de transcrição e controlo de ciclo celular.

transforming growth factor, beta induced, 1,53x, codifica uma proteína secretada, com expressão responsiva a TGF-beta e função aparente na adesão célula-matriz extracelular através da sua capacidade de adesão a integrinas e glicosaminoglicanos (Ferguson, *et al.*, 2003).

dickkopf homolog 2, 1,52x, codifica uma proteína secretada que funciona como um inibidor de sinalização Wnt, tendo reconhecida expressão endotelial (Monaghan, *et al.*, 1999).

actinin, alpha 1, 1,52x, codifica uma proteína que produz ligações cruzadas entre moléculas de actina, formando filamento de actina, e que também se encontra em junções aderentes. Aumento de expressão de este gene está associado a uma redução significativa na mobilidade celular (Gluck ; Ben-Ze'ev, 1994).

deltex 3 homolog, 1,49x, codifica uma proteína ligase E3 de ubiquitina para Notch1, sendo responsável pela reciclagem do receptor, em membranas endocíticas, de volta à membrana celular onde pode contactar com os ligandos (Hori, *et al.*, 2004, Le Borgne, *et al.*, 2005,

Takeyama, *et al.*, 2003). Os membros da família Deltex são considerados reguladores positivos de sinalização Notch.

limb-bud and heart, 1,48x, codifica um regulador transcricional com expressão reconhecida no coração em desenvolvimento (Briegel, *et al.*, 2005).

chromobox homolog 4, 1,48x, codifica uma proteína com domínio *Chromo*, modificador de estrutura de cromatina, com possível função como regulador transcricional.

nischarin, 1,44x, codifica uma proteína intracelular que interage com integrinas e com a cinase PAK1, impedindo-a de fosforilar substratos e assim inibindo a migração celular (Alahari, *et al.*, 2004).

ankyrin repeat domain 56, 1,44x, codifica uma proteína com duas repetições do domínio de *ankirina* com função sugerida como regulador transcricional.

zinc finger protein 69, 1,44x, codifica uma proteína com domínio de dedo de zinco com função prevista como regulador transcricional.

IQ motif and WD repeats 1, 1,43, codifica uma proteína com função prevista como regulador transcricional.

REST corepressor 1, -1,4x, codifica uma proteína com domínio de ligação a ADN, com possível função como regulador transcricional.

growth factor independent 1B, -2,05x, codifica uma proteína de ligação a ADN com função de repressor transcricional ao converter eucromatina em heterocromatina nos genes alvo (Vassen, *et al.*, 2006).

LIM homeobox protein 6, -2,41x, codifica uma proteína com homeodomínio, tendo função na regulação da transcrição. Redução de expressão deste gene em interneurónios corticais está associada a uma inibição da migração (Alifragis, *et al.*, 2004).

5.3.4 - Análise de variação de expressão génica por PCR em tempo real (RT-PCR)

Para confirmar os resultados obtidos nos *microarrays* decidimos realizar experiências de RT-PCR em amostras idênticas às usadas nos *microarrays*. Para esta experiência usámos duas amostras de ARN, amplificadas da mesma forma que para os *microarrays*, de modo a evitar variações extrínsecas às amostras, entre experiências. O objectivo foi confirmar os níveis de variação de sete genes presentes nos resultados dos *microarrays*, de forma a confirmar as tendências de variação de níveis de expressão observadas nos resultados de GeneChips. Outro objectivo desta experiência foi o de verificar os níveis de variação de expressão de genes conhecidos por estarem ligados à função da via Notch no endotélio mas que não surgiram nos resultados dos *microarrays*.

Os ARN, 1µg de cada, foram convertidos em ADNc e estes foram depois usados como molde para as experiências. Usámos duas amostras de cada genótipo (WT e DT) e seis repetições para cada gene.

Para a análise dos resultados calculou-se a média dos valores de Ct (*cycle threshold*, ciclo a partir do qual a curva de crescimento da concentração de ADN passa a ser exponencial) para cada conjunto de gene em estudo por amostra (WT ou DT). Calculou-se também o desvio padrão (DP) destes valores. Em seguida calculou-se a diferença entre a média dos valores de Ct do gene em estudo e a média dos valores de Ct do gene controlo usado, β-actina, este valor é chamado de δCt. Este cálculo é usado para determinar o valor de erro a propagar ao resultado final, fazendo recurso a uma fórmula de cálculo de propagação de erro (Z).

$$Z=[\delta Ct_{(\text{gene de interesse})} \pm DP_{(\text{gene de interesse})}] - [\delta Ct_{(\beta\text{-actina})} \pm DP_{(\beta\text{-actina})}]$$

Estes cálculos são efectuados para cada conjunto (gene de interesse)/β-actina, obtendo-se assim dois valores de δCt para cada gene de interesse, um relativo à amostra WT e outro à amostra DT. Em seguida calcula-se a diferença entre o valor de δCt_{DT} e δCt_{WT}, que se determina de δδCt associada ao valor de erro calculado para a amostra DT. Como a diferença entre δCt_{WT} e δCt_{WT} é igual a zero não se calcula o valor de erro associado a este valor. Para calcular a relação entre os níveis de expressão do gene de interesse nas duas amostras usou-se a fórmula (Livak ; Schmittgen, 2001):

$$\text{Variação de expressão} = 2^{-\delta\delta Ct}$$

Para calcular o erro associado a cada resultado usa-se a seguinte fórmula:

$$\text{Variação de expressão} = 2^{(-\delta\delta Ct \pm Z)}$$

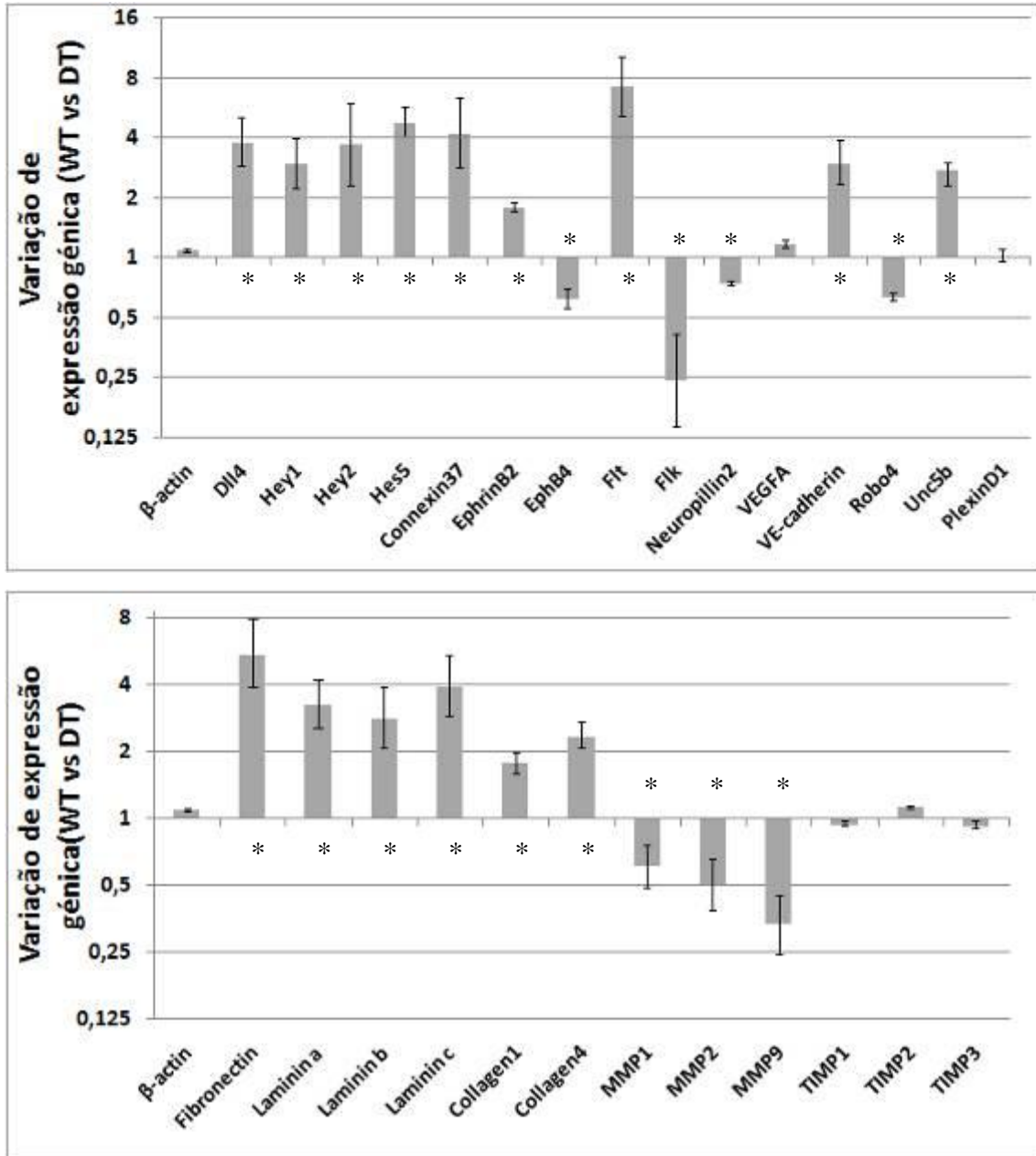


Figura 85 - Histogramas representam os valores de média de variação de expressão (gene de interesseDT / gene de interesseWT; normalizado para β -actina) . Níveis de VEGFA medidos a partir de ARN extraído de embriões inteiros, todos os outros genes foram avaliados a partir de ARN extraído de células endoteliais sorteadas de embriões. Barras representam a variação entre $2^{(-\delta\delta Ct+Z)}$ e $2^{(-\delta\delta Ct-Z)}$ (Livak ; Schmittgen, 2001). * Marca $p < 0,01$ (Wilcoxon W).

Os resultados de RT-PCR confirmam as tendências de variação de expressão génica observadas nos resultados dos microarrays. Foram testados sete genes que aparecem nos resultados dos microarrays, *Dll4*, *Hey1*, *Hey2*, *Flt1*, *Neuropillin-2*, *Lef1* e *G1 to S phase transition 1*. Em todos os casos a tendência de variação foi mantida e em todos os casos os níveis de alteração de expressão foram maiores do que os revelados pelos resultados dos microarrays. Este facto indica que os resultados dos microarrays subestimam muito as alterações de expressão génica, ou que tomam medidas muito conservativas na avaliação dos níveis de fluorescência em cada célula do *chip*.

Gene	<i>microarrays</i>	RT-PCR
<i>Dll4</i>	1,3x	3,8x
<i>Hey1</i>	1,95x	2,94x
<i>Hey2</i>	1,23x	3,71x
<i>Flt1</i>	1,6x	7,19x
<i>Neuropillin-2</i>	-1,33x	0,73 (-1,37x)
<i>Lef1</i>	-1,21x	0,57 (-2x)
<i>G1 to S phase transition 1</i>	-1,69x	0,28 (-3,57x)

Tabela 23 – Comparação entre os valores de variação de expressão génica derivados dos *GeneChips* e de RT-PCR.

Alterações na proporção de variação entre os resultados obtidos dos microarrays e os resultados obtidos nos RT-PCRs são devido às diferentes formas estatísticas de correcção de erro aplicadas nas diferentes experiências.

Avaliaram-se também os níveis de expressão de outros genes, que se esperou que surgissem nos resultados dos microarrays mas que tal não aconteceu, como são os casos de: *Hes5*, *Connexin-37*, *Ephrin-B2*, *EphB4*, *Robo4*, *Unc-5b*, *Plexin-D1*, *Vegfa*, *Flk*, *Bcl2*, *Ve-cadherin*, *Fibronectin*, *Laminin a/b/c*, *Colagénio1/4*, *Mmp1/2/9* e *Timp1/2/3*.

Hes5 tem expressão aumentada no endotélio dos embriões DT, indicando que é também um efector directo da via Notch no endotélio, ao lado de *Hey1* e 2.

Connexin37 e *Ephrin-B2* têm expressão aumentada no endotélio dos embriões DT. Estes resultados já eram previsíveis face aos resultados obtidos por hibridação *in situ*, sendo genes exclusivamente arteriais que nos embriões DT passam a ser expressos em toda a vasculatura. Por outro lado, *EphB4* tem expressão diminuída no endotélio dos embriões DT, confirmando também os resultados obtidos por hibridação *in situ* e a arteriolização funcional da vasculatura embrionária mutante.

Robo4 é um receptor de ligandos da família Slit, estando envolvido na regulação positiva da migração de células endoteliais. A sua expressão está diminuída

significativamente. *Unc5B* é o receptor de *Netrin1*, que actua como inibidor de ramificação vascular. A sua expressão está aumentada significativamente no endotélio dos embriões DT. *PlexinD1* é um receptor de semaforinas, envolvido na mediação do direccionamento de vasos intersomáticos. A sua expressão não é alterada significativamente.

A expressão de *Vegfa* foi medida a partir de ARN extraído de embriões inteiros (em vez de células endoteliais sorteadas) de modo a que se conseguisse medir a presença de fenómenos de retroalimentação positiva dentro da via VEGF, cuja sinalização se encontra diminuída nos embriões DT, independentemente das próprias células endoteliais. A sua expressão encontra-se aumentada mas não significativamente. *Flk* é o receptor-2 de VEGF, o principal receptor com capacidade de sinalizar para a cascata de sinalização activada por VEGF. A sua expressão está diminuída no endotélio dos embriões DT, confirmando a diminuição no potencial de sinalização por VEGF quando a via Notch está activada.

Bcl2 é um gene anti-apoptótico que é directamente regulado por VEGF, a sua expressão está diminuída no endotélio dos embriões DT, indicando que a sinalização VEGF está diminuída.

Ve-caderina é um gene que codifica um dos principais componentes das ligações aderentes entre células endoteliais. A sua expressão está aumentada nas células endoteliais de embriões DT, confirmando que um aumento na adesão célula-célula faz parte do fenótipo observado.

Fibronectina e *laminina a/b/c* são genes que codificam membros da matriz extracelular. Estes resultados vêm confirmar os resultados obtidos por imunofluorescência.

Os níveis de expressão de *Colagénio1 e 4* encontram-se aumentados, indicando que o aumento na produção de matriz extracelular parece ser generalizado.

Mmp1/2/9 (metaloproteinases da matriz extracelular), codificam enzimas que degradam a matriz extracelular. Este resultado veio indicar que o aumento de matriz extracelular se deve conjuntamente a um aumento nos níveis de expressão de genes que codificam componentes da matriz extracelular mas também a uma diminuição nos níveis de expressão de genes que codificam enzimas degradadoras de matriz.

Timp1/2/3 (*Tissue inhibitors of metalloproteinases*) codificam inibidores de MMPs, possíveis responsáveis pela diminuição de função das MMPs observada nos embriões DT. A sua expressão não se encontra alterada significativamente.

Estes resultados de RT-PCR vieram trazer mais confiança aos resultados obtidos dos microarrays. Apesar de nos termos baseado em variações muito pequenas nos microarrays, a

análise por RT-PCR confirmou que esses resultados são significativos e que as tendências de variação de expressão se mantêm.

A análise por RT-PCR também permitiu esclarecer os níveis de variação de expressão de alguns genes reconhecidos como sendo afectados pela via Notch mas que se encontravam ausentes dos resultados finais dos microarrays. Pode-se concluir então que para níveis de variação baixos a técnica de RT-PCR pode permitir ter significância em situações em que os microarrays não conseguem.

5.4 – Discussão

Para realizar a análise transcriptómica dos embriões DT fez-se sorteamento (FACS) de células endoteliais de embriões DT e controlo, antes do início da circulação sanguínea. Como tínhamos determinado antes, a circulação sanguínea pode ser, em parte, responsável por defeitos ao nível do remodelamento da vasculatura das VCA e da hipertrofia das AD. Assim, decidimos fazer a análise num momento do desenvolvimento em que a sobre-expressão de Dll4 é o único factor a variar entre os embriões comparados. O passo de sorteamento de células serviu para eliminar a contribuição de outros tipos celulares para os resultados, que resultaria num aumento de ruído de fundo e diminuição da especificidade do teste.

A baixa frequência de células endoteliais encontrada, 0,4%, e o baixo número total de células obtidas da dissociação dos embriões analisados, cerca de 300000 células por embrião, levou a que decidíssemos considerar que cada amostra corresponderia a três embriões. Esta escolha possibilitou também normalizar os resultados para variações intrínsecas ao facto de o trabalho ser realizado em animais não congénicos e mesmo dentro da mesma ninhada haver variação entre os embriões. Assim sendo cada amostra analisada corresponderia sempre à média dos resultados de três embriões da mesma ninhada.

Os resultados obtidos com os GeneChip foram analisados primariamente na Unidade de Genómica do Instituto Gulbenkian de Ciência. Realizaram a análise estatística dos valores de leitura de todos os pares de sonda de cada gene, em todos os GeneChip hibridados, seis no total. Estes valores foram comparados entre as diferentes células de cada par de sondas e depois, entre as amostras DT e controlo, para determinar valores médios de variação de expressão entre embriões DT e controlo.

Para esta análise decidiu-se usar apenas o valor de *lower bound of Fc*, pois representa o valor de maior confiança de variação, em que o erro é menor. Este facto faz com que os valores de variação de expressão apresentados sejam baixos. A análise subsequente, feita por RT-PCR de sete genes presentes nos resultados dos *GeneChip* confirmou a tendência de variação revelada e adicionou o facto de os valores de variação revelados pelos *GeneChip* serem de facto muito conservativos em relação à avaliação da variação de expressão entre amostras.

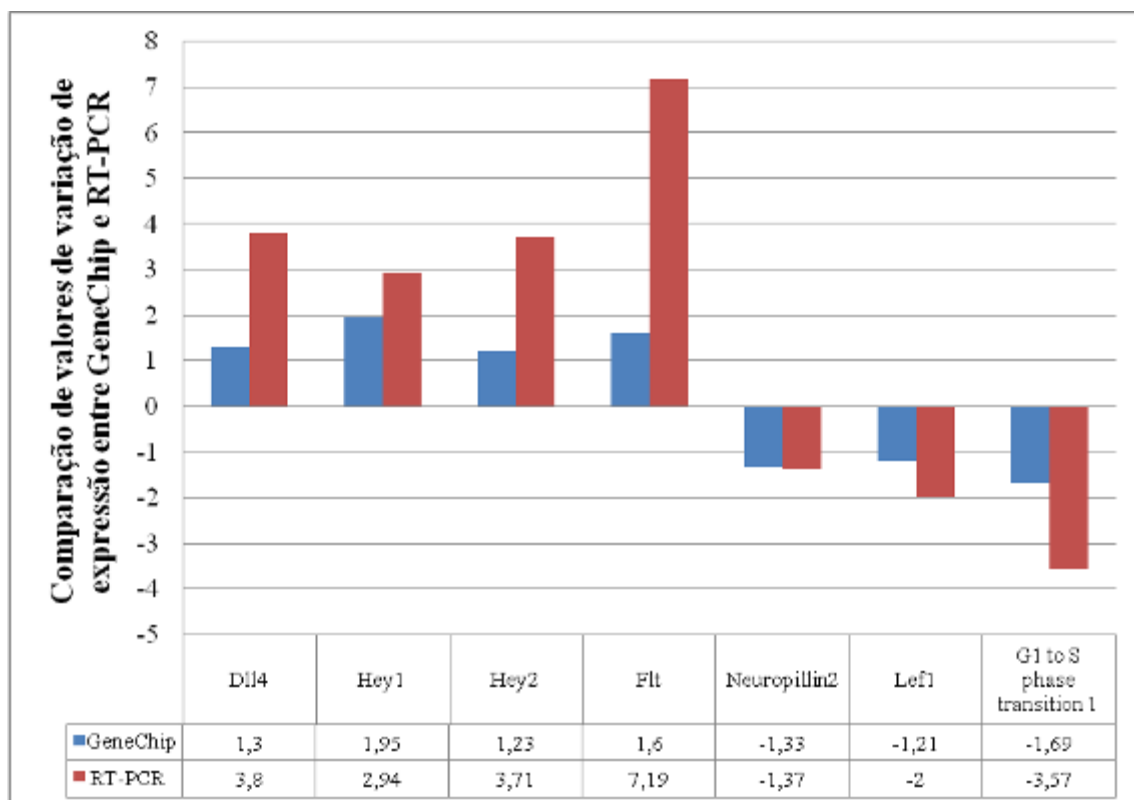


Figura 86 - Gráfico representando os valores de variação de expressão entre amostras de células endoteliais DT e controlo usando GeneChips ou RT-PCR. A avaliação da variação de expressão entre amostras é mais conservativa quando se usam GeneChips do que quando se usa a técnica de RT-PCR em amostras equivalente.

Este resultado trouxe confiança para avançar com a análise dos resultados obtidos nos *GeneChips*, mesmo quando se baseiam em valores de variação de expressão tão baixos como 1,15x de valor mínimo de variação considerada significativa.

A análise primária dos resultados envolveu o estudo pormenorizado de cada gene referido nos resultados dos *GeneChip*, ao todo, 835 genes. Analisou-se a literatura existente para cada gene, de modo a determinar o que já se conhecia acerca desse gene, em termos de expressão, integração em vias de sinalização conhecidas e função. Na ausência de informação na literatura analisou-se a sequência proteica, procurando a existência de domínios proteicos conhecidos que pudessem dar alguma pista para a função desse gene.

A análise dos resultados dos GeneChips foi complementada por uma análise baseada em RT-PCR, feita com amostras de ARN obtidas e processadas de forma idêntica à usada para os GeneChips, de forma a eliminar variações extrínsecas às amostras, entre experiências. Nesta análise estudou-se o nível de variação de expressão de vários genes não presentes nos resultados dos GeneChips, mas que se pressupunha estivessem ligados à funcionalidade da via Notch no endotélio. A razão pela qual esses genes não apareceram nos resultados dos microarrays pode ser simplesmente que, por algum motivo, o nível de erro para esses pares de sondas fosse mais alto e estatisticamente esses genes tivessem sido removidos dos resultados com variações consideradas significativas. Pode ser também que a variação real desses genes fosse baixa e devido ao carácter mais conservativo da análise por GeneChip, acabassem por ser filtrados dos resultados considerados significativos.

Em relação à via Notch, os resultados indicaram que para além de *Hey1* e *2*, também *Hes5* aumenta o seu nível de expressão com a sobre-activação da via Notch, revelando-se como sendo mais um efector da via Notch no endotélio. Os genes específicos do endotélio arterial, *Connexin37* e *Ephrin-B2*, que não aparecem nos resultados dos GeneChip, têm a sua expressão aumentada nos embriões DT, segundo os resultados de RT-PCR, confirmando assim os resultados de hibridação *in situ* e a sua função reconhecida na regulação da identidade vascular (Duarte, *et al.*, 2004, Iso, *et al.*, 2006, Lawson, *et al.*, 2002).

Os resultados de ambas análises indicaram várias interações entre diferentes vias de sinalização celular. Os resultados indicam a capacidade da via Notch regular negativamente o funcionamento da via VEGF (Coultas, *et al.*, 2005), quer ao nível dos receptores transmembranares como ao nível da via de transdução de sinal. A via VEGF é a via pró-angiogénica mais importante que se conhece. Ao nível dos receptores existe uma diminuição no nível de expressão de VEGF-R2 (-4x em RT-PCR) e um aumento no nível de VEGF-R1 (1,6x em GeneChip; 7,2x em RT-PCR). Considerando que VEGF-R2 é o receptor sinalizador de VEGF-A (Shibuya, 2006) e que VEGF-R1 actua principalmente como uma armadilha para VEGF-A (Hiratsuka, *et al.*, 1998), impedindo-o de se ligar a VEGF-R2 e actuar como factor de crescimento, estes resultados indicam que a sobre-activação da via Notch no endotélio resulta numa diminuição do potencial de sinalização por VEGF-A. A expressão do co-receptor de VEGF, Neuropilin2 também está diminuída, revelando mais um factor de diminuição de capacidade de sinalização VEGF ao nível do endotélio. Ao nível da expressão do ligando VEGFA, a sua expressão encontra-se ligeiramente elevada (embora não significativamente, indicando uma ligeira resposta do organismo à diminuição da capacidade de sinalização por VEGF. Em princípio, pode-se excluir a explicação deste resultado por um possível aumento dos níveis de hipoxia no embrião pois no estágio em que os embriões foram

analisados ainda não há batimento cardíaco e o embrião ainda obtém os seus nutrientes por difusão. Ao nível da transdução de sinal VEGF ressalta a interacção negativa ao nível da via das cinases MAP, cinases RAS, BCL2 e ao nível da via de fosfatidilinositol-3-fosfato (Byrne, *et al.*, 2005), que no seu conjunto regulam mecanismos como o ciclo celular, adesão celular, transcrição de ARN e migração celular, condicionante a VEGF. A interacção da via Notch com a via VEGF foi entretanto descrita em trabalhos feitos na vasculatura da retina murina (Hellstrom, *et al.*, 2007, Lobov, *et al.*, 2007, Suchting, *et al.*, 2007) e na vasculatura de embriões de peixe-zebra (Leslie, *et al.*, 2007, Siekmann ; Lawson, 2007).

Os resultados obtidos também indicam a existência de uma interacção da via Notch com a via Wnt (Clevers, 2006), regulando negativamente MAPKKK5, que é necessário para estabilizar beta-catenina, possibilitando a sua ida para o núcleo, e Lef1, que é necessário para a função de beta-catenina como factor de transcrição. A via Notch também regula positivamente dois reguladores negativos de sinalização por Wnts. Estes resultados indicam a capacidade da via Notch regular a sinalização Wnt quer ao nível dos ligandos e receptores como ao nível da transdução de sinal por beta-catenina. Existe também um aumento da expressão de dois ligandos *Wnt*, 5a e 2, em resposta ao aumento de sinalização Notch. É possível que tal reflecta uma auto-compensação da via Wnt ou então uma resposta autónoma ou não autónoma da célula, reflectindo uma função da via Wnt no endotélio ainda desconhecida. Já se conhecem interacções entre a via Notch e a via Wnt noutros contextos celulares, em que também a via Notch actua como um inibidor da via Wnt e por consequência como um inibidor de desenvolvimento (Duan, *et al.*, 2006, Sancho, *et al.*, 2004).

A via Notch também regula positivamente a via TGF-beta (Lebrin, *et al.*, 2005), ao nível do receptor *Tgfr2* e via de transdução de sinal, em especial TGF-beta induced. A interacção entre a via Notch e a via TGF-beta já havia sido descrita anteriormente (Kluppel ; Wrana, 2005), sendo que a expressão de *Hey1* é regulada sinergisticamente pelas vias Notch e TGF-beta (Itoh, *et al.*, 2004). Estes resultados podem descrever mais um ponto de ligação entre estas duas vias, em que Notch também potencia a sinalização por TGF-beta.

Mais geralmente nota-se uma diminuição no nível de expressão de reguladores positivos do ciclo celular, o que vai de encontro aos resultados obtidos anteriormente, que revelaram uma diminuição na taxa de proliferação celular. Em especial nota-se que os reguladores de ciclo celular afectados são maioritariamente reguladores da transição G1/S.

Os resultados também apontam para um aumento na expressão de genes que codificam proteínas da matriz extracelular e uma diminuição na expressão de genes que codificam metaloproteases degradadoras da matriz extracelular. Assim sendo o fenótipo observado por imunofluorescência para Fibronectina e Laminina é confirmado por RT-PCR e

adicionado do facto de também haver uma diminuição de proteínas degradadoras da matriz, potenciando o aumento na matriz extracelular. Detectou-se também um aumento na expressão de genes envolvidos em adesão célula a célula, associados a junções aderentes e de hiato.

Os resultados apontam também para uma inibição da migração das células endoteliais (aumento no nível de expressão de reguladores negativos de migração celular e diminuição no nível de expressão de reguladores positivos de migração celular), o que também vai de encontro aos resultados obtidos na análise histológica dos embriões DT. Os resultados de RT-PCR revelaram uma diminuição de expressão de *Robo4*, um receptor de ligandos da família Slit, envolvido na regulação da migração endotelial (Park, *et al.*, 2003). Em peixe-zebra a perda de função neste gene está associada a uma diminuição na migração de células endoteliais (Kaur, *et al.*, 2006) e atraso no brotar dos vasos intersomáticos (Bedell, *et al.*, 2005). É a primeira vez que se estabelece uma ligação entre a via Notch e a via Robo/Slit em ratinhos.

No conjunto estes resultados apontam Dll4 como sendo um essencial regulador negativo da angiogénese, que interacciona a vários níveis com as vias pró-angiogénicas mais importantes para manter uma relação correcta entre remodelamento vascular e estabilização da vasculatura.

Capítulo 6 - Análise da influência da haploinsuficiência em Dll4 no desenvolvimento da vasculatura tumoral

6.1 - Objectivos

É conhecido que *Dll4* tem expressão na vasculatura tumoral e que a sua expressão aumenta como resposta à formação do tumor (Mailhos, *et al.*, 2001). Sabe-se também que a regulação da expressão de *Dll4* é crucial para o correcto desenvolvimento vascular embrionário.

Partindo do princípio que o desenvolvimento vascular tumoral recapitula, pelo menos em parte, o desenvolvimento vascular embrionário, supunha-se que Dll4 fosse igualmente importante na regulação do desenvolvimento vascular tumoral.

Hoje em dia, já existem várias terapêuticas dirigidas a regular a neo-angiogénese tumoral, em especial uma dirigida a VEGF (Dy ; Adjei, 2006, Panares ; Garcia, 2007, Ranieri, *et al.*, 2006), uma via que regula e é regulada por Dll4. Esta terapêutica tem revelado resultados interessantes em alguns tipos de cancro mas vem-se verificando que, mesmo nos casos em que os tumores são sensíveis, acaba por falhar quando se desenvolvem resistências ao tratamento. Este facto tem vindo a realçar a importância de se desenvolverem terapias alternativas e complementares, que possam melhorar a eficácia e alcance das terapias anti-angiogénicas no tratamento do cancro. Deste modo planeou-se esta experiência como um primeiro teste à possibilidade de usar a manipulação dos níveis de Dll4 como terapêutica no tratamento do cancro. Decidiu-se que seria executada através da injeção subcutânea de células tumorais da linha S180 em murganhos *Dll4*^{+/-}, uma técnica de xenotransplante. A vantagem desta escolha prende-se com a rapidez de execução, que para este estudo primário se revelaria um factor que suplanta as desvantagens deste sistema. O facto de se trabalhar com murganhos da linha CD1 condicionou que a nossa escolha da linha tumoral recaísse numa linha tumoral muito agressiva, como a linha S180, pois os xenotransplantes seriam implantados em murganhos imunocompetentes, o que, por si, também torna o resultado mais significativo.

Este trabalho foi realizado em colaboração com o Doutor Parkash S. Gill, do Norris Cancer Center, LA, EUA. O objectivo principal desta colaboração foi estabelecer o uso de proteína Dll4 solúvel como agente terapêutico no tratamento do cancro, fazendo uso da sua actividade como bloqueador de sinalização Dll4-Notch. Este facto condicionou o uso da linha *Dll4*^{+/-} neste trabalho, por ser mais relevante ao trabalho proposto.

6.2 – Materiais e métodos

6.2.1 - Xenotransplante subcutâneo de células S180

As células S180, células malignas de sarcoma murino obtidas da estirpe C57/BL6J (Alfaro, et al., 1992), foram uma gentil oferta do Doutor Adrian Harris, Cancer Research, UK. Estas foram crescidas segundo protocolos habituais de cultura de células, como descrito anteriormente para a cultura de fibroblastos.

Após terem sido tripsinizadas, as células S180 foram quantificadas em hemacitómetro e separadas em alíquotas de 5×10^6 células. Estas alíquotas foram injectadas subcutaneamente na área dorsal cervical de ratinhos, seis Dll4^{+/-} e seis controlo (Duarte, et al., 2004), ambos com fundo genético CD1, com 6-8 semanas de idade.

6.2.1.1 - Recolha e fixação dos tumores

Os tumores foram dissecados dos animais, tendo o cuidado de preservar a ligação à pele que os cobria. Os tecidos foram lavados duas vezes em PBS, durante dez minutos, e fixados. No caso de os tumores serem usados para coloração com X-Gal, a fixação foi feita com 0,2% PFA durante a noite, e no caso de serem usados para imunofluorescência a fixação foi 4% PFA durante uma hora.

Após a fixação os tumores foram lavados duas vezes em PBS, durante dez minutos e em seguida desidratados numa solução contendo 4% de sacarose em PBS. Os tumores permaneceram nesta solução durante três horas e em seguida foram transferidos para uma solução contendo 15% de sacarose em PBS. Os tumores permaneceram nesta solução durante a noite. No dia seguinte os tumores foram processados para inclusão em gelatina e congelamento, seguindo o protocolo indicado anteriormente para embriões.

6.2.1.2 - Medição da densidade vascular

As medições da densidade vascular nos tumores foram efectuadas fazendo recurso ao programa de computador NIH ImageJ 1.37v. Analisaram-se 15 secções de 40µm com imunofluorescência para PECAM, de cada tumor, três retirados de ratinhos controlo e três

retirados de ratinhos $Dll4^{+/-}$. Seleccionaram-se áreas equivalentes das secções, contendo apenas vasculatura tumoral, e usou-se a ferramenta de *threshold* para individualizar as estruturas vasculares. Os valores de *threshold* mantiveram-se constantes para todas as secções analisadas. A área correspondente a estruturas vasculares foi medida em $pixel^2$.

6.3 – Resultados

6.3.1 - Análise da influência da haploinsuficiência em *Dll4* no desenvolvimento da vasculatura tumoral

Foram transplantadas 5×10^6 células tumorais da linha de sarcoma murino S180 (Dunham ; Stewart, 1953, Foley ; Drolet, 1956, Foley, *et al.*, 1960, Goldie, *et al.*, 1952), subcutâneamente para murganhos $Dll4^{+/-}$ e controlo, com fundo genético CD1. Os tumores foram recolhidos ao fim de dez dias, medidos e processados para análise por imunofluorescência e marcação com X-gal.

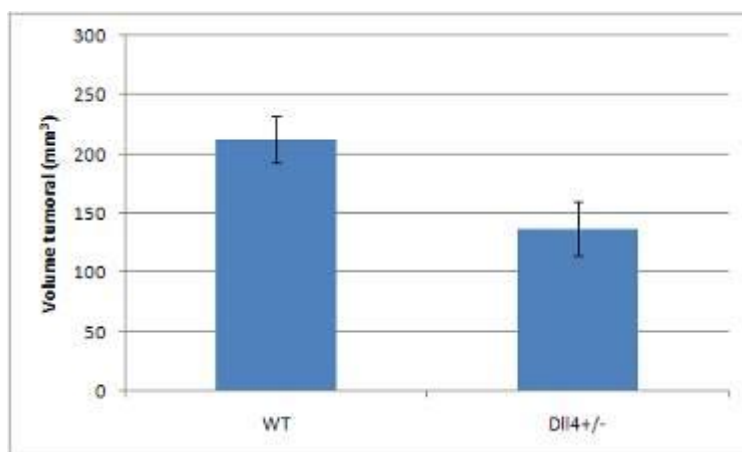


Figura 87 – Gráfico representando o volume tumoral no dia 10 após implantação de tumores em murganhos $Dll4^{+/-}$ e controlo. Nos murganhos $Dll4^{+/-}$ os tumores atingem apenas 64,6% do volume alcançado nos murganhos controlo (WT), no mesmo dia. $p < 0,001$ (Wilcoxon W).

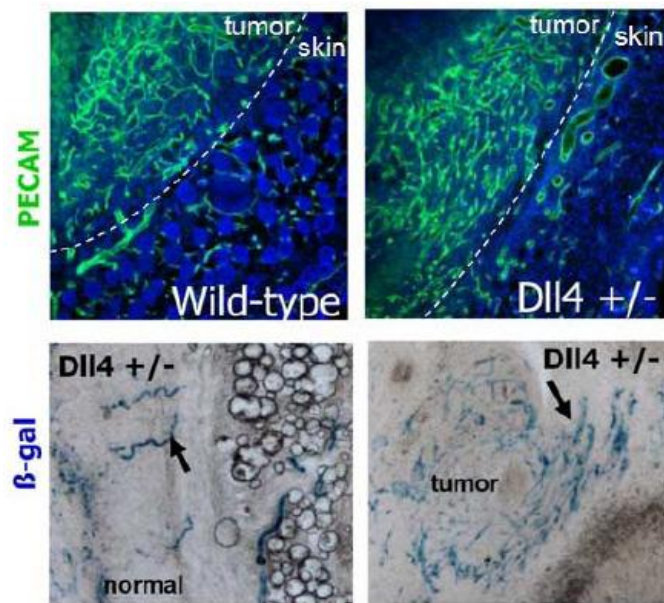


Figura 88 – (cima) Imunofluorescência anti-PECAM em tumores implantados em murganhos controlo e *Dll4*^{+/-} demonstrando o aumento na densidade vascular nos tumores implantados em murganhos *Dll4*^{+/-}. (baixo) Marcação com X-gal em murganhos *Dll4*^{+/-} demonstrando que há expressão de *Dll4* na vasculatura tumoral.

Analisando o padrão da marcação com X-gal concluímos que, como já havia sido descrito, *Dll4* é realmente expresso na vasculatura tumoral, estando presente numa maior proporção da vasculatura tumoral do que endógena (pele).

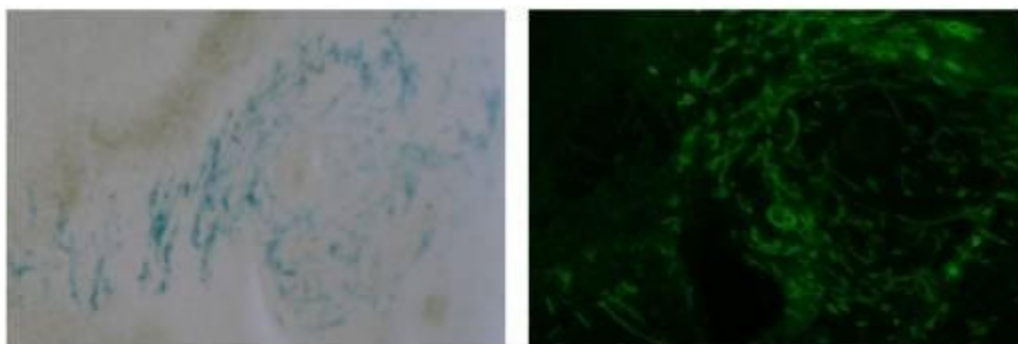


Figura 89 – A maior parte da vasculatura tumoral, formada de novo, expressa *Dll4*. Tumor implantado em murganho *Dll4*^{+/-}. À esquerda, coloração com X-Gal; à direita, imunofluorescência para PECAM; as duas imagens correspondem a crioseções consecutivas.

Comparando a expressão do repórter lacZ com imunofluorescência para PECAM na vasculatura de tumores implantados em murganhos *Dll4*^{+/-} verificou-se que a maior parte da vasculatura tumoral, formada por neo-angiogénese, expressa *dll4*.

A análise da marcação com anticorpos anti-PECAM, revelou que os murganhos heterozigóticos para *dll4* apresentam uma vasculatura tumoral mais tortuosa, com vasos mais finos e ramificados. Fazendo recurso a um programa de computador, IMAGEj, avaliámos, para campos de microscopia semelhantes, a área ocupada por endotélio em tumores colocados em murganhos *Dll4*^{+/-} e controlo. O resultado indicou um aumento de cerca de 55% na área ocupada por endotélio, por área de microscopia.

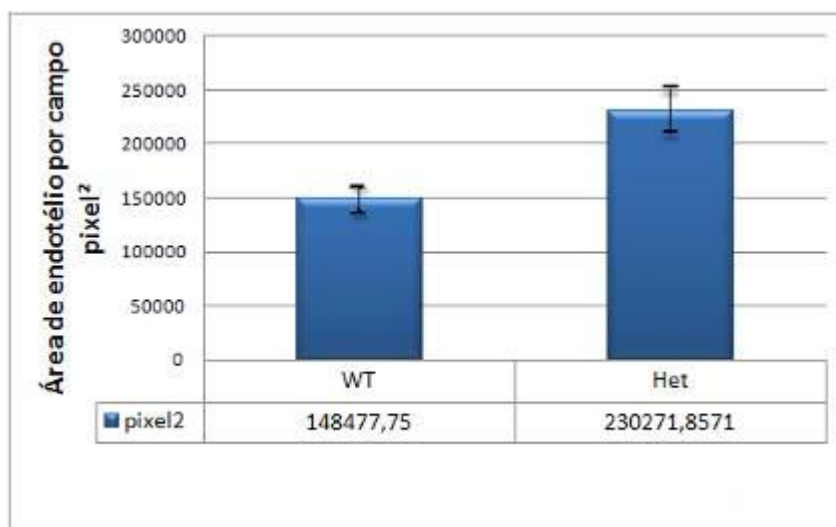


Figura 90 – Gráfico representando a área de campo de microscopia ocupada por endotélio em secções de tumores implantados em murganhos *Dll4*^{+/-} e controlo. Nos tumores implantados em murganhos *Dll4*^{+/-} há um aumento de 55% na densidade vascular, face aos murganhos controlo. $p < 0,001$ (Wilcoxon W).

Resultados obtidos por um grupo de investigação parceiro, com quem em conjunto publicámos este trabalho, revelaram que a este aumento na densidade vascular nos tumores com diminuição na expressão de *Dll4* está associado uma diminuição na perfusão vascular, aumento da hipóxia e necrose tumoral e em geral a um impedimento do crescimento tumoral.

A vasculatura tumoral em murganhos *Dll4*^{+/-} também está associada a um defeito na maturação dos vasos sanguíneos, demonstrada por uma diminuição forte no recrutamento de células de músculo liso para cobrir os novos vasos, ao contrário do observado nos murganhos controlo, revelando um defeito na maturação dos vasos sanguíneos tumorais.

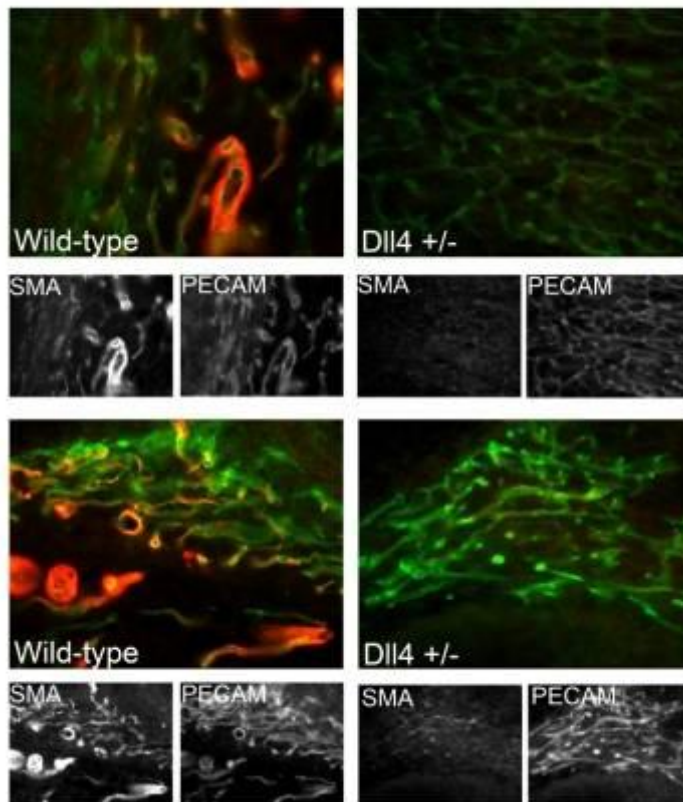


Figura 91 – Imunofluorescência para SMA e PECAM revelaram que na vasculatura tumoral em murganhos $Dll4^{+/-}$ há uma diminuição no recrutamento de células de músculo liso, indicando a existência de um defeito na maturação vascular.

6.4 – Discussão

Este estudo realizou-se através da injeção subcutânea de células tumorais em murganhos $Dll4^{+/-}$ e controlo. Este modelo de trabalho faz com que a vasculatura que se forme para irrigar o novo tumor em crescimento seja resultante do animal hospedeiro e não das células tumorais injectadas. Assim, no caso dos murganhos $Dll4^{+/-}$, a vasculatura tumoral será heterozigótica para a perda de função em *Dll4*, apresentando por isso apenas metade da dose normal de *Dll4*, que se sabe ser haploinsuficiente (Duarte, *et al.*, 2004).

Os resultados desta análise indicaram que a manipulação dos níveis de *Dll4* pode influenciar o desenvolvimento tumoral. Os tumores implantados em murganhos $Dll4^{+/-}$ cresceram mais devagar que os respectivos controlos, tendo ao fim de 10 dias apenas 64,6% do volume tumoral médio nos murganhos controlo. A fim de compreender este resultado, analisámos a expressão de *Dll4* nos tumores e na pele e os resultados indicaram que este é mais expresso na vasculatura tumoral do que na vasculatura dos tecidos circundantes ao tumor, neste caso, a pele. *Dll4* aparenta estar presente na maioria dos vasos que compõem a vasculatura tumoral, justificando assim o aumento de expressão deste gene nos tumores. Em

tumores renais calculou-se que a expressão de *Dll4* estava aumentada nove vezes em relação à expressão em rins sem tumores (Patel, *et al.*, 2005).

A vasculatura tumoral em embriões *Dll4*^{+/-} é mais fina e ramificada do que a observada em murganhos controlo, havendo um aumento de 55% na densidade vascular em relação aos murganhos controlo. Este resultado está em concordância com os resultados obtidos em embriões, em que associado à perda de função em *Dll4* está um aumento da taxa de proliferação endotelial e aumento da capacidade migratória das células endoteliais, por potenciar a resposta a factores de crescimento vasculares e outros atractores endoteliais (Benedito *et al.* 2008 – *submetido*).

Associado a este aumento de densidade vascular encontramos um defeito de maturação vascular nos murganhos *Dll4*^{+/-}, em que a vasculatura destes não apresenta o marcador de células de músculo liso SMA, à volta das células endoteliais.

Estes resultados foram publicados (Scehnet, *et al.*, 2007) em conjunto com resultados da utilização de proteína *Dll4* solúvel, que actua como um inibidor da sinalização *Dll4*-Notch, como forma terapêutica para regulação da angiogénese. Estes resultados revelaram que a este aumento na densidade vascular nos tumores crescidos em murganhos com diminuição na função de *Dll4* está associado uma diminuição na perfusão vascular, aumento da hipoxia e necrose tumoral e em geral a um impedimento do crescimento tumoral.

São resultados muito promissores em relação ao uso de *Dll4* como alvo terapêutico para tratamento de tumores. Enquanto o bloqueio de VEGF leva a uma diminuição da perfusão sanguínea tumoral por formar menos vasos sanguíneos, o bloqueio de *Dll4* leva a uma diminuição da perfusão sanguínea tumoral por formar mais vasos, mas que são desorganizados, com lúmen reduzido e com defeitos ao nível da maturação. Actuando por modos diferentes ambas estratégias conseguem um efeito semelhante ao nível da diminuição do volume tumoral. *Dll4* não parece actuar apenas como um regulador negativo de sinalização VEGF pois consegue ter um efeito negativo no crescimento de tumores que se tornaram insensíveis à terapia contra VEGF.

A expressão de *Dll4* na vasculatura tumoral parece ser dependente de VEGF (Noguera-Troise, *et al.*, 2006, Patel, *et al.*, 2006) e *Dll4* actua como um regulador negativo de sinalização VEGF, no entanto os resultados obtidos com os estudos com embriões mutantes indicam que a função de *Dll4* pode ser mais extensa que simplesmente regular a sinalização VEGF. *Dll4* apresenta-se assim como um excelente candidato a alvo de terapia anti-angiogénica, através da produção de anticorpos neutralizantes para *Dll4* ou péptidos inibidores da ligação *Dll4*-Notch.

Os resultados publicados foram confirmados em dois trabalhos publicados em simultâneo (Noguera-Troise, *et al.*, 2006, Ridgway, *et al.*, 2006).

Capítulo 7 – Discussão geral e conclusões

A angiogénese compreende um conjunto de eventos morfogénéticos que conduzem à remodelação de uma vasculatura primitiva numa vasculatura madura (Noden, 1989). Esta vasculatura tem de ter um grau correcto de ramificação e distribuição pelos tecidos, de forma a cumprir o propósito da existência de um sistema vascular nos organismos complexos, servir, basicamente, como meio de distribuição de oxigénio e nutrientes aos tecidos e meio de remoção de metabolitos e dióxido de carbono dos tecidos. A angiogénese decorre sempre através do balanceamento de sinais de propagação e sinais de amadurecimento/quiescência. A angiogénese ocorre durante o desenvolvimento embrionário e no adulto, onde toma a designação de neo-angiogénese, em situações fisiológicas, como em determinadas fases do ciclo éstrico, e em situações patológicas, como no crescimento tumoral.

À partida para este trabalho sabia-se muito pouco sobre o gene *Dll4*. Sabia-se, por exemplo, que é um ligando da via Notch. Sabia-se que dois dos receptores *Notch* em mamíferos são expressos no endotélio arterial em desenvolvimento, *Notch1* e *4*, e que a sua função é essencial para o correcto desenrolar da angiogénese embrionária. *Dll4* apresentava-se à altura como o único ligando conhecido da via Notch com um padrão de expressão compatível com o facto de ser o ligando responsável pela activação da via Notch no endotélio arterial em desenvolvimento. Estes factos levaram a que se desenvolvessem esforços para estudar a função de *Dll4* no desenvolvimento vascular embrionário e na neo-angiogénese.

Começou-se por criar uma linha de murganhos transgénicos com capacidade de sobre-expressar condicionalmente *Dll4*. Para atingir este fim recorreremos à tecnologia Z/EG, um sistema com dois repórteres (Novak, *et al.*, 2000). Este sistema permite facilidade de rastreio dos animais transgénicos e da qualidade do local de integração, através da actividade beta-galactosidásica do seu repórter primário, *β geo*, e identificação das células em que ocorreu recombinação eficiente por Cre através do seu repórter secundário, EGFP. O sistema Z/EG oferece controlo espacial de expressão através do sistema recombinatório Cre/*loxP*.

Para produzir a linha Z/EG-Dll4 recorreremos a dois métodos de produção de murganhos transgénicos, a agregação diplóide e a microinjecção pronuclear (Wood, *et al.*, 1993). Enquanto a agregação diplóide trás a vantagem de permitir um rastreio fácil da integração do vector de transgénese antes de se obterem os murganhos, a técnica de

microinjecção pronuclear é uma técnica mais simples e que permite obter animais transgénicos mais rapidamente. Obtivemos murganhos fundadores de linhas transgénicas com ambas as técnicas mas com a técnica de microinjecção pronuclear, cerca de 10% dos murganhos nascidos eram transgénicos, enquanto com a técnica de agregação diplóide apenas 5,5% dos murganhos nascidos deram origem a uma linha de animais transgénicos. Tendo em conta que todas as linhas produzidas, cinco ao todo, revelaram padrões de expressão do repórter primário equivalente e deram origem a um fenótipo semelhante quando cruzadas com a linha pCAGGS-Cre, pode-se concluir que, pelo menos neste caso, a vantagem da técnica de microinjecção pronuclear sobrepôs-se à vantagem da técnica de agregações diplóides.

A primeira análise ao efeito da sobre-expressão de *Dll4* foi realizada através do cruzamento da linha Z/EG-Dll4 com a linha CAGGS-Cre, produzindo sobre-expressão ubíqua de *Dll4*. Os animais resultantes demonstram vários defeitos morfológicos visíveis externamente e morrem a meio da gestação, cerca dos 10,5 dpc.

Os defeitos embrionários dos embriões DT podem ser classificados em diversas categorias, ectópicos, vasculares primários e vasculares secundários.

Na categoria de defeitos ectópicos podemos encontrar o defeito de exencefalia e os defeitos ao nível da simetria bilateral, somitogénese e enrolamento corporal e cardíaco. Estes defeitos podem ser categorizados como ectópicos pois são defeitos que ocorrem em tecidos ou estruturas em que não há expressão de *dll4*. No entanto estes defeitos estão associados à função da via Notch, apenas não estão associados a uma função fisiológica de Dll4. É muito provável que estes defeitos reflitam o resultado da sobre-activação da via Notch por um ligando que, apesar de não ser endógeno àquele tecido, consegue activar os receptores Notch, mas não reflectem uma função de Dll4. Por este motivo, estes defeitos não foram muito caracterizados.

Na categoria de defeitos vasculares primários encontramos vários defeitos. Os resultados obtidos a vários níveis concluem que Dll4 regula várias funções ao nível das células endoteliais. A sua função inicial aparenta ser a de bloquear a identidade endotelial venosa e activar a identidade endotelial arterial nas células endoteliais arteriais, permitindo assim o estabelecimento da identidade endotelial arterial. Dll4 consegue isto ao ser expresso especificamente nas células endoteliais arteriais, e não nas células endoteliais venosas. Notch1 está presente, inicialmente, na vasculatura arterial e venosa mas Dll4 só está presente no endotélio arterial e assim apenas aí há activação da via Notch. Assim sendo, é a especificidade de expressão de Dll4 que selecciona se as AD tomam uma identidade arterial ou venosa. O

facto de as VCA dos embriões DT apresentarem expressão de *Hey1*, um indicador de activação da via Notch no endotélio, revela que nos embriões DT as VCA têm activação ectópica da via Notch. O resultado é uma arteriolização funcional das VCA, que passam a expressar marcadores moleculares de células endoteliais arteriais. Isto indica que durante um tempo, até ao início da expressão de Coup-TFII (You, *et al.*, 2005) nas células endoteliais das VCA, existe uma janela de oportunidade em que as células endoteliais venosas podem assumir outra identidade.

Outro defeito vascular primário é a redução da taxa de proliferação das células endoteliais arteriais. Este resultado, confirmado nos resultados dos GeneChip e RT-PCR, indica que Dll4, e a via Notch, regula negativamente a proliferação celular endotelial, bloqueando as células na fase G1 do ciclo mitótico.

Dll4 também regula negativamente a migração celular endotelial, visível ao nível dos vasos intersomáticos dos embriões DT, e a formação de novos brotos vasculares, visível ao nível da vasculatura da região cefálica dos embriões DT. Esta função é responsável, em parte, pelo fenótipo de hipertrofia das AD, pois leva à acumulação de células endoteliais nas AD, que deviam ter saído para a região dorsal, apesar da redução da taxa de proliferação endotelial. Este efeito é resultado de Dll4, e a via Notch, actuarem como reguladores negativos da funcionalidade de vias pró-angiogénicas, como as vias VEGF, Wnt e Robo/Slit. Esta regulação é exercida ao nível dos receptores membranares e ao nível das vias de transdução de sinal. Estas vias pró-angiogénicas têm funcionalidade como atractores moleculares, favorecendo a mobilidade celular na direcção de gradientes crescentes de ligandos solúveis.

A função de Dll4 também é a de regular eventos de adesão celular e de regular a matriz extracelular. Estes eventos podem estar ligados à regulação da migração celular, pois a migração celular tem de ser regulada de maneira oposta à adesão celular e deposição de matriz extracelular para que seja possível que uma célula se movimente. A regulação da adesão celular é efectuada ao nível das adesões aderentes e *gap junctions*. Por sua vez, a regulação da matriz extracelular é efectuada quer ao nível do aumento da produção e deposição de novas proteínas fibrilares, como Fibronectina, Laminina e Colagénios, como também ao nível da redução da expressão de enzimas degradadoras de moléculas da matriz extracelular. A expressão de integrinas também está aumentada, revelando que Dll4 regula positivamente a adesão entre as células endoteliais e a matriz extracelular aumentada.

Na categoria de defeitos vasculares secundários encontramos os defeitos de remodelamento das VCA e os defeitos de remodelamento da vasculatura da membrana vitelina.

O defeito de remodelamento das VCA pode ter várias explicações. É possível que esteja ligado à expressão diferencial de membros da via Ephrin-Eph entre as VCA e as AD. De alguma forma, a comunicação, com efeitos ao nível de repulsão, entre células endoteliais arteriais e venosas pode ser necessária para que ocorra a coalescência do plexo venoso primário nas VCA (Fuller, *et al.*, 2003, Hamada, *et al.*, 2003). Este fenótipo foi observado também nos mutantes de perda de função para *Ephrin-B2* e *EphB4* (Gerety, *et al.*, 1999). No entanto nos mutantes de perda de função para *Ephrin-B2* e *EphB4* também existe formação de fusões entre as AD e as VCA (D. Anderson, comunicação pessoal). Assim torna-se difícil distinguir se o defeito de coalescência das VCA é resultante de um defeito de comunicação entre artérias e veias ou resultante de um defeito circulatório, causado pela ausência de circulação sanguínea nas VCA provocado pela existência de fusões entre as AD e as VCA.

O defeito da remodelação da vasculatura primária das membranas vitelinas é bastante comum em murganhos com mutações que resultem na ocorrência de defeitos vasculares, quer sejam de perda de função ou ganho de função. Isto pode ser interpretado de várias formas. É possível que este facto indique que simplesmente a vasculatura da membrana vitelina seja muito sensível a defeitos regulatórios de várias vias de sinalização. É possível também que este facto indique que existe um ponto de ligação entre todas as linhas de murganhos mutantes que exibem este fenótipo. Este ponto de ligação pode não ser determinado geneticamente, mas sim, pode reflectir um problema circulatório. Esta hipótese é adjuvada pelo facto de murganhos mutantes em que não há início do batimento cardíaco, e que por isso não têm circulação sanguínea, terem o mesmo defeito vascular vitelínico (Wakimoto, *et al.*, 2000). Sabe-se que a circulação sanguínea tem uma função importante na regulação do remodelamento vascular extra-embriónico em galinha (le Noble, *et al.*, 2004). Esta interpretação revelaria assim que em murganhos este sistema de regulação é mantido e que este é importante mais cedo do que o descrito em galinha, para que possa ocorrer a primeira fase de remodelamento vascular extra-embriónico.

Antes do início do estabelecimento da circulação sanguínea, ligada ao início do batimento cardíaco, já existe uma hipertrofia das AD nos embriões DT, consistente ao longo das AD desde as regiões anteriores até às posteriores, consequência do defeito migratório das células endoteliais. A partir do momento em que se inicia o batimento cardíaco o aumento da

hipertrofia das AD torna-se mais rápido, em especial na região entre o tracto de saída e entrada do coração. Sabendo, pelos resultados das microangiografias, que pouco sangue progride para regiões mais posteriores que as fusões entre as AD e VCA, isto indica-nos que podem haver outros factores a regular a hipertrofia das AD. Esses factores podem ser a pressão sanguínea aumentada na região das AD entre os tractos de entrada e saída do coração e/ou o estímulo causado pela quase ausência de circulação sanguínea nas regiões posteriores das AD.

A análise com *GeneChips* do transcriptoma do endotélio de embriões DT permitiu-nos desvendar a base das interacções que a via Notch realiza com outras vias de sinalização, nomeadamente com as vias VEGF, Wnt e TGF-beta. Apesar da interacção negativa da via Notch com a via VEGF em células endoteliais já ser conhecida (Hellstrom, *et al.*, 2007, Leslie, *et al.*, 2007, Lobov, *et al.*, 2007, Patel, *et al.*, 2006, Suchting, *et al.*, 2007, Williams, *et al.*, 2006), estes resultados permitiram elucidar que a interacção ocorre não só ao nível dos receptores membranares como também a vários níveis na via de transdução de sinal, identificando quais os membros da via que são afectados. A interacção sinérgica da via Notch com a via TGF-beta já havia sido descrita noutros sistemas (Blokzijl, *et al.*, 2003, Dahlqvist, *et al.*, 2003, Itoh, *et al.*, 2004), estes resultados revelaram a natureza desta interacção por revelarem que genes da via TGF-beta são afectados pela via Notch. Já era conhecido que vários membros da via Wnt são expressos no endotélio em desenvolvimento e que esta via teria um papel, ainda não bem caracterizado, como via pró-angiogénica através de uma interacção positiva com a via VEGF (Goodwin ; D'Amore, 2002, Ishikawa, *et al.*, 2001, Mao, *et al.*, 2000, Masckauchan, *et al.*, 2006, Wang, *et al.*, 2007, Zhang, *et al.*, 2001). Os nossos resultados são a primeira descrição da existência de uma ligação negativa entre a via Notch e a via Wnt no endotélio. Esta análise permitiu também identificar quais os genes cuja expressão é activada ou desligada para produzir os efeitos fenotípicos analisados, como por exemplo ciclo celular, migração endotelial e regulação de matriz extracelular. Os resultados dos *GeneChip* permitiram criar uma lista de genes regulados pela via Notch e ainda não caracterizados. A análise do padrão de expressão destes genes novos vai ser crucial para determinar quais destes genes são promissores para que se façam mais experiências sobre eles, para determinar a sua função e importância na regulação da angiogénese. Espera-se que algum deles se revele um alvo promissor para o desenvolvimento de terapias para regulação de neo-angiogénese tumoral.

O trabalho realizado sobre o efeito da haploinsuficiência de *Dll4* no desenvolvimento tumoral revelou-se muito importante (Scehnet, *et al.*, 2007). Os resultados obtidos indicam

que terapias que conduzam a um bloqueio da funcionalidade de Dll4 podem revelar-se efectivas para o controlo do desenvolvimento tumoral ao conduzirem à formação de uma vasculatura tumoral mais fina e ramificada, menos estável e não perfundida, que impede o crescimento do tumor. Os resultados obtidos são ainda mais importantes quando se tem em linha de conta que este tipo de tratamentos continuam efectivos em tumores que tenham ganho resistência aos tratamentos para VEGF (Noguera-Troise, *et al.*, 2006, Ridgway, *et al.*, 2006). Este resultado também indica que a função de Dll4 na regulação da angiogénese estende-se além de ser apenas um regulador negativo da sinalização por VEGF-A.

Até ao momento é incerta a razão pela qual não foi possível obter sobre-expressão específica de *Dll4* com os transgénicos Z/EG-Dll4, tendo obtido apenas sobre-expressão ubíqua. Sabemos que o efeito não é posicional, pois obtivemos cinco linhas independentes de murganhos Z/EG-Dll4, e que a tecnologia em si funciona com expressão ubíqua de *cre*. Os resultados obtidos a partir de cruzamentos com três linhas de murganhos com expressão endotelial de *cre* indicam que a eficiência de recombinação é baixa. Tal pode ser resultado de os promotores endoteliais usados terem expressão baixa e que o sistema Z/EG não seja muito sensível a baixas concentrações da recombinase Cre. Para resolver este problema produzimos uma nova linha de murganhos com sobre-expressão condicional indutível de *Dll4* (TetO₇-Dll4) e temos um vector construído para produzir uma linha de sobre-expressão condicional indutível de *Dll4*, com repórter de expressão. A linha TetO₇-Dll4 veio permitir obter os resultados que a linha Z/EG-Dll4 não permitiu. Com a linha TetO₇-Dll4, e a linha Tie2-rtTA-M2, conseguimos obter sobre-expressão condicional indutível de *Dll4*, no endotélio. A análise dos embriões Dll4e revelou os mesmos defeitos vasculares já descritos com a sobre-expressão ubíqua de *Dll4*, conseguida com a linha Z/EG-Dll4. Este resultado confirma que a importância de *Dll4* na regulação do desenvolvimento vascular é autónoma ao endotélio.

A análise da localização da proteína Dll4, através do uso de anticorpos monoclonais específicos, revelou que este se encontra na membrana celular de todas as células das AD. A sua presença não é homogénea, estando mais presente na membrana celular na face das AD que está virada para o tubo neural e regiões dorsais e mais presente em vesículas na face oposta. Este resultado indica que, na vasculatura dos embriões, a sinalização por Dll4 é indutiva, provavelmente não sendo responsável pela diferenciação de um tipo especializado de célula endotelial, como acontece na vasculatura da retina, em que é responsável por inibir a diferenciação de células ponta. Os resultados apontam também que existe regulação endocítica da disponibilidade de Dll4 à membrana celular, actuando assim como mais um forma de regulação da sinalização Notch no endotélio. O facto de haver mais Dll4 membranar

na porção das AD que está virada para o tubo neural faz sentido face à função de Dll4 como um regulador negativo da função de VEGF, Wnts e Slits, moléculas que formam gradientes que partem de regiões dorsais para ventrais e que por isso influenciam mais a região das AD que está virada na direcção desses gradientes.

Os resultados obtidos com os estudos no modelo de ganho-de-função de *Dll4* representam, de facto, um fenótipo oposto ao observado em murganhos de perda-de-função, *Dll4*^{+/-} (Duarte, et al., 2004) e *Dll4*^{-/-} (Benedito, et al, 2008 – *in press*). Esta observação é baseada nos resultados ao nível da organização da vasculatura embrionária, identidade do endotélio das aortas dorsais e veias cardinais anteriores, dos fenótipos de ramificação, migração, e maturação. Encontra-se também um efeito espelho nos resultados de expressão génica no endotélio destas duas vertentes de análise à função de um gene. No fundo, estas duas linhas de investigação complementam-se e ao mesmo tempo confirmam-se, permitindo uma leitura mais fiel e assegurada da função do gene *Dll4*.

No global estes resultados apontam Dll4 como sendo um activador da via Notch no endotélio, regulando negativamente a manutenção da identidade endotelial venosa e activando a identidade endotelial arterial, actuando depois como um indutor de quiescência endotelial. Os resultados indicaram que Dll4, através da activação da via Notch, regula negativamente o funcionamento de várias vias de sinalização pró-angiogénicas, como VEGF, Wnt e Slit. Os resultados da análise transcriciómica endotelial indicaram a existência de vários pontos de regulação entre a via Notch e as vias VEGF, Wnt e Slit, quer ao nível dos receptores membranares como ao nível da tradução de sinal. Face a esta informação é difícil separar as diferentes funções da via Notch, da sua função como regulador negativo da sinalização de outras vias. É impossível afirmar com certeza se o desligar da expressão de um gene nas células endoteliais com sobre-expressão de *Dll4* é resultado directo da funcionalidade de um efector da família *enhancer of split*, que funcionam como repressores transcripcionais, ou do facto de haver menos transdução de sinal de uma das vias afectadas. É muito difícil determinar uma função específica só para uma via quando as várias vias envolvidas regulam os mesmos eventos celulares, como proliferação, migração, adesão ou deposição de matriz extracelular. Os resultados indicam a existência de múltiplas interacções entre as várias vias de sinalização, revelando a existência de uma rede de sinalização complexa, com o objectivo de regular finamente o balanço permanente entre expansão da rede vascular, pelas vias pró-angiogénicas, e o amadurecimento ou quiescência da rede vascular, pelas vias anti-

angiogénicas. Neste contexto, Dll4 revela-se um agente anti-angiogénico, impedindo a resposta das células endoteliais aos estímulos pró-angiogénicos e ao mesmo tempo, promovendo a estabilização dos vasos já existentes, através do recrutamento de células de músculo liso, aumento da adesão celular e aumento da matriz extracelular.

Dll4 assume-se assim como um importante regulador positivo da arteriogénese embrionária e como um agente anti-angiogénico. Este facto indica Dll4 como um alvo importante para a produção de terapias anti-tumorais, quer como adjuvante de terapias para VEGF, como isoladamente em tumores que se revelem resistentes a tratamentos dirigidos a VEGF.

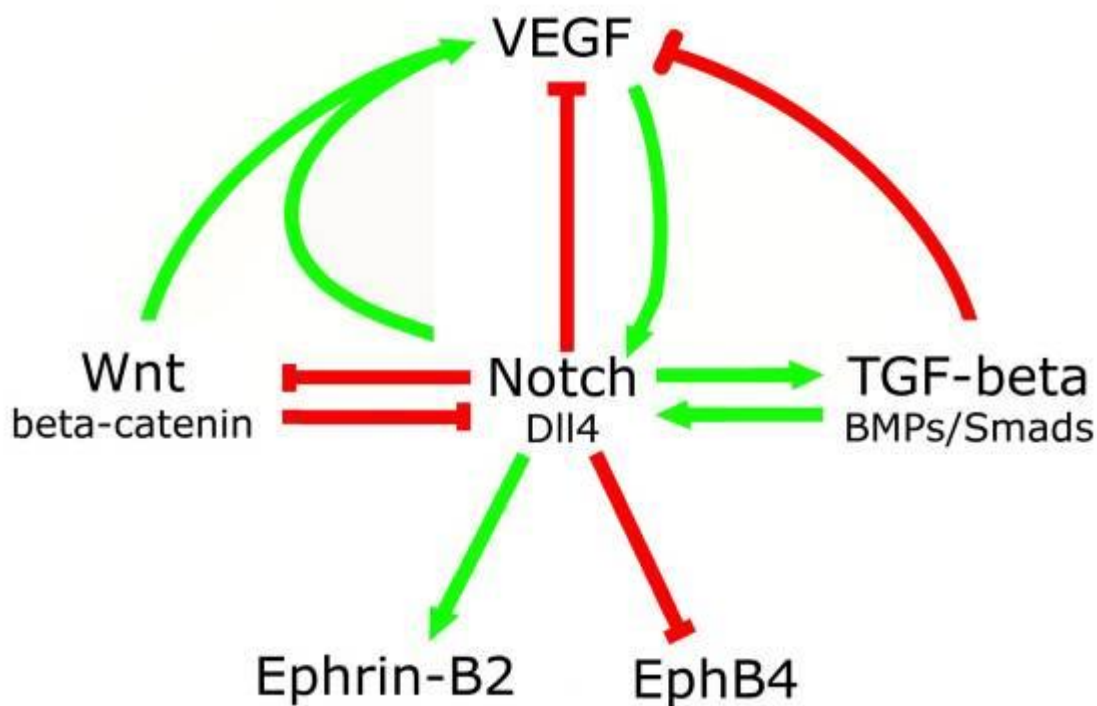


Figura 92 – Esquema de interações entre diferentes vias de sinalização que regulam a angiogénese. A via VEGF activa a expressão de *Dll4* especificamente nas células das AD (Liu, *et al.*, 2003), permitindo assim que apenas aí a via Notch seja activada. Como resultado, as células endoteliais das AD bloqueiam a expressão de genes relativos à identidade venosa (*EphB4*) e activam a expressão de genes que conduzem à activação da identidade arterial (*Hey1*, *Hey2*, *Hes5*, *Ephrin-B2*, *etc.*). Vários membros da via Wnt são expressos no endotélio (Goodwin ; D'Amore, 2002). Sabe-se que esta via regula a expressão de VEGF (Zhang, *et al.*, 2001), actuando assim como um agente pró-angiogénico indirecto e possivelmente directo (Goodwin, *et al.*, 2007, Masckauchan, *et al.*, 2006). A via Notch regula negativamente a função directa/local da via Wnt, ao regular a estabilização de Beta-catenina, a expressão de *Lef-1* e ao conduzir à expressão de inibidores secretados de ligandos Wnt. Por outro lado a via Notch activa a expressão endotelial de dois ligandos da via Wnt, que estando impedidos de actuar sobre as próprias células endoteliais, devido à presença dos bloqueadores transmembranares e secretados, pode possivelmente actuar à distância, activando a expressão de VEGF. Por outro lado a via Notch regula positivamente a via de sinalização TGF-beta, que por sua vez actua sinérgicamente com a via Notch (Kluppel ; Wrana, 2005, Soares, *et al.*, 2005) para induzir um estado de quiescência endotelial e bloquear a capacidade de VEGF sinalizar (Inoki, *et al.*, 2002). Deste modo temos as vias VEGF e Wnt a actuarem como agentes pró-angiogénicos e as vias Notch e TGF-beta a actuarem como indutores de quiescência. Todas as interações positivas e negativas, acima descritas, entre estas vias servem para que exista um balanço instável entre o estado de quiescência e de proliferação endotelial, entre o crescer e o estabilizar de uma rede vascular.

Bibliografia

- Abedi, H. and Zachary, I.** 1997. Vascular Endothelial Growth Factor Stimulates Tyrosine Phosphorylation and Recruitment to New Focal Adhesions of Focal Adhesion Kinase and Paxillin in Endothelial Cells. *J Biol Chem* **272**(24): 15442-15451.
- Abreu, J.G., Ketpura, N.I., Reversade, B., and De Robertis, E.M.** 2002. Connective-Tissue Growth Factor (Ctgf) Modulates Cell Signalling by Bmp and Tgf-Beta. *Nat Cell Biol* **4**(8): 599-604.
- Achen, M.G., Jeltsch, M., Kukk, E., Makinen, T., Vitali, A., Wilks, A.F., Alitalo, K., and Stacker, S.A.** 1998. Vascular Endothelial Growth Factor D (Vegf-D) Is a Ligand for the Tyrosine Kinases Vegf Receptor 2 (Flk1) and Vegf Receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(2): 548-553.
- Adams, N.C., Tomoda, T., Cooper, M., Dietz, G., and Hatten, M.E.** 2002. Mice That Lack Astrotactin Have Slowed Neuronal Migration. *Development* **129**(4): 965-972.
- Adams, R.H.** 2003. Molecular Control of Arterial-Venous Blood Vessel Identity. *J Anat* **202**(1): 105-112.
- Adams, R.H. and Alitalo, K.** 2007. Molecular Regulation of Angiogenesis and Lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(6): 464-478.
- Adams, R.H., Diella, F., Hennig, S., Helmbacher, F., Deutsch, U., and Klein, R.** 2001. The Cytoplasmic Domain of the Ligand Ephrinb2 Is Required for Vascular Morphogenesis but Not Cranial Neural Crest Migration. *Cell* **104**(1): 57-69.
- Adams, R.H., Wilkinson, G.A., Weiss, C., Diella, F., Gale, N.W., Deutsch, U., Risau, W., and Klein, R.** 1999. Roles of Ephrinb Ligands and Ephb Receptors in Cardiovascular Development: Demarcation of Arterial/Venous Domains, Vascular Morphogenesis, and Sprouting Angiogenesis. *Genes Dev* **13**(3): 295-306.
- Adatia, R., Poggi, L., Thompson, E.W., Gallo, R.C., Fassina, G.F., and Albini, A.** 1992. Assessment of Angiogenic Potential--the Use of Aids-Ks Cell Supernatants as an in Vitro Model. *EXS* **61**: 321-326.
- Affymetrix.** 2004. Genechip Expression Analysis - Data Analysis Fundamentals. In . 2004. Genechip Expression Analysis - Technical Manual. In, pp. 701025 Rev. 701025.
- Alahari, S.K., Reddig, P.J., and Juliano, R.L.** 2004. The Integrin-Binding Protein Nischarin Regulates Cell Migration by Inhibiting Pak. *Embo J* **23**(14): 2777-2788.
- Alberts, B.** 1994. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Pub., New York ; [Great Britain].
- Albig, A.R. and Schiemann, W.P.** 2005. Identification and Characterization of Regulator of G Protein Signaling 4 (Rgs4) as a Novel Inhibitor of Tubulogenesis: Rgs4 Inhibits Mitogen-Activated Protein Kinases and Vascular Endothelial Growth Factor Signaling. *Mol Biol Cell* **16**(2): 609-625.
- Alfaro, G., Lomeli, C., Ocadiz, R., Ortega, V., Barrera, R., Ramirez, M., and Nava, G.** 1992. Immunologic and Genetic Characterization of S180, a Cell Line of Murine Origin Capable of Growing in Different Inbred Strains of Mice. *Vet Immunol Immunopathol* **30**(4): 385-398.

- Algire, G.H., Chalkley, H.W., Legallais, F.Y., and Park, H.D.** 1945. Vascular Reactions of Normal and Malignant Tissues in Vivo. I. Vascular Reactions of Mice to Wounds and to Normal and Neoplastic Transplants. *J Natl Cancer Inst* **6**: 73-85.
- Alifragis, P., Liapi, A., and Parnavelas, J.G.** 2004. Lhx6 Regulates the Migration of Cortical Interneurons from the Ventral Telencephalon but Does Not Specify Their Gaba Phenotype. *J Neurosci* **24**(24): 5643-5648.
- Alitalo, K., Tammela, T., and Petrova, T.V.** 2005. Lymphangiogenesis in Development and Human Disease. *Nature* **438**(7070): 946-953.
- Arora, P.D. and McCulloch, C.A.** 1996. Dependence of Fibroblast Migration on Actin Severing Activity of Gelsolin. *J Biol Chem* **271**(34): 20516-20523.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M.E.** 1995. Notch Signaling. *Science* **268**(5208): 225-232.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J.** 1999. Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science* **284**(5415): 770-776.
- Arthur, H.M., Ure, J., Smith, A.J., Renforth, G., Wilson, D.I., Torsney, E., Charlton, R., Parums, D.V., Jowett, T., Marchuk, D.A. et al.** 2000. Endoglin, an Ancillary Tgfbeta Receptor, Is Required for Extraembryonic Angiogenesis and Plays a Key Role in Heart Development. *Dev Biol* **217**(1): 42-53.
- Bailey, A.M. and Posakony, J.W.** 1995. Suppressor of Hairless Directly Activates Transcription of Enhancer of Split Complex Genes in Response to Notch Receptor Activity. *Genes Dev* **9**(21): 2609-2622.
- Banai, S., Shweiki, D., Pinson, A., Chandra, M., Lazarovici, G., and Keshet, E.** 1994. Upregulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression Induced by Myocardial Ischaemia: Implications for Coronary Angiogenesis. *Cardiovasc Res* **28**(8): 1176-1179.
- Becker, J.D. and Feijo, J.A.** 2003. Profiling Genomes with Oligonucleotide Arrays. *Boletim de Biotecnologia*.
- Bedell, V.M., Yeo, S.Y., Park, K.W., Chung, J., Seth, P., Shivalingappa, V., Zhao, J., Obara, T., Sukhatme, V.P., Drummond, I.A. et al.** 2005. Roundabout4 Is Essential for Angiogenesis in Vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(18): 6373-6378.
- Belteki, G., Haigh, J., Kabacs, N., Haigh, K., Sison, K., Costantini, F., Whitsett, J., Quaggin, S.E., and Nagy, A.** 2005. Conditional and Inducible Transgene Expression in Mice through the Combinatorial Use of Cre-Mediated Recombination and Tetracycline Induction. *Nucleic acids research* **33**(5): e51.
- Benedito, R. and Duarte, A.** 2005. Expression of Dll4 During Mouse Embryogenesis Suggests Multiple Developmental Roles. *Gene Expr Patterns* **5**(6): 750-755.
- Benjamin, L.E., Hemo, I., and Keshet, E.** 1998. A Plasticity Window for Blood Vessel Remodelling Is Defined by Pericyte Coverage of the Preformed Endothelial Network and Is Regulated by Pdgf-B and Vegf. *Development* **125**(9): 1591-1598.
- Benjamin, L.E. and Keshet, E.** 1997. Conditional Switching of Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) Expression in Tumors: Induction of Endothelial Cell Shedding and Regression of Hemangioblastoma-Like Vessels by Vegf Withdrawal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(16): 8761-8766.
- Bergers, G. and Benjamin, L.E.** 2003. Tumorigenesis and the Angiogenic Switch. *Nature reviews* **3**(6): 401-410.
- Bland, C.E., Kimberly, P., and Rand, M.D.** 2003. Notch-Induced Proteolysis and Nuclear Localization of the Delta Ligand. *J Biol Chem* **278**(16): 13607-13610.

- Blaumueller, C.M., Qi, H., Zagouras, P., and Artavanis-Tsakonas, S.** 1997. Intracellular Cleavage of Notch Leads to a Heterodimeric Receptor on the Plasma Membrane. *Cell* **90**(2): 281-291.
- Blokzijl, A., Dahlqvist, C., Reissmann, E., Falk, A., Moliner, A., Lendahl, U., and Ibanez, C.F.** 2003. Cross-Talk between the Notch and Tgf-Beta Signaling Pathways Mediated by Interaction of the Notch Intracellular Domain with Smad3. *J Cell Biol* **163**(4): 723-728.
- Bray, S. and Furriols, M.** 2001. Notch Pathway: Making Sense of Suppressor of Hairless. *Curr Biol* **11**(6): R217-221.
- Bray, S.J.** 2006. Notch Signalling: A Simple Pathway Becomes Complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(9): 678-689.
- Brazil, D.P. and Hemmings, B.A.** 2001. Ten Years of Protein Kinase B Signalling: A Hard Akt to Follow. *Trends Biochem Sci* **26**(11): 657-664.
- Briegel, K.J., Baldwin, H.S., Epstein, J.A., and Joyner, A.L.** 2005. Congenital Heart Disease Reminiscent of Partial Trisomy 2p Syndrome in Mice Transgenic for the Transcription Factor Lbh. *Development* **132**(14): 3305-3316.
- Brinster, R.L.** 1974. The Effect of Cells Transferred into the Mouse Blastocyst on Subsequent Development. *J Exp Med* **140**(4): 1049-1056.
- Brinster, R.L., Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., and Avarbock, M.R.** 1980. Translation of Globin Messenger Rna by the Mouse Ovum. *Nature* **283**(5746): 499-501.
- Brooke, B.S., Karnik, S.K., and Li, D.Y.** 2003. Extracellular Matrix in Vascular Morphogenesis and Disease: Structure Versus Signal. *Trends Cell Biol* **13**(1): 51-56.
- Brooks, P.C., Clark, R.A., and Cheresh, D.A.** 1994. Requirement of Vascular Integrin Alpha V Beta 3 for Angiogenesis. *Science* **264**(5158): 569-571.
- Brooks, P.C., Montgomery, A.M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R.A., Hu, T., Klier, G., and Cheresh, D.A.** 1994. Integrin Alpha V Beta 3 Antagonists Promote Tumor Regression by Inducing Apoptosis of Angiogenic Blood Vessels. *Cell* **79**(7): 1157-1164.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A., and Israel, A.** 2000. A Novel Proteolytic Cleavage Involved in Notch Signaling: The Role of the Disintegrin-Metalloprotease Tace. *Mol Cell* **5**(2): 207-216.
- Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B., and Goldstein, J.L.** 2000. Regulated Intramembrane Proteolysis: A Control Mechanism Conserved from Bacteria to Humans. *Cell* **100**(4): 391-398.
- Bruckner, K., Perez, L., Clausen, H., and Cohen, S.** 2000. Glycosyltransferase Activity of Fringe Modulates Notch-Delta Interactions. *Nature* **406**(6794): 411-415.
- Byrd, N., Becker, S., Maye, P., Narasimhaiah, R., St-Jacques, B., Zhang, X., McMahon, J., McMahon, A., and Gabel, L.** 2002. Hedgehog Is Required for Murine Yolk Sac Angiogenesis. *Development* **129**(2): 361-372.
- Byrne, A.M., Bouchier-Hayes, D.J., and Harmey, J.H.** 2005. Angiogenic and Cell Survival Functions of Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf). *J Cell Mol Med* **9**(4): 777-794.
- Capecchi, M.R.** 1989. The New Mouse Genetics: Altering the Genome by Gene Targeting. *Trends Genet* **5**(3): 70-76.
- Carlson, T.R., Yan, Y., Wu, X., Lam, M.T., Tang, G.L., Beverly, L.J., Messina, L.M., Capobianco, A.J., Werb, Z., and Wang, R.** 2005. Endothelial Expression of Constitutively Active Notch4 Elicits Reversible Arteriovenous Malformations in Adult Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(28): 9884-9889.
- Carmeliet, P.** 2000. Mechanisms of Angiogenesis and Arteriogenesis. *Nat Med* **6**(4): 389-395.

- . 2002. Integrin Indecision. *Nat Med* **8**(1): 14-16.
- . 2005. Angiogenesis in Life, Disease and Medicine. *Nature* **438**(7070): 932-936.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C. et al.** 1996. Abnormal Blood Vessel Development and Lethality in Embryos Lacking a Single Vegf Allele. *Nature* **380**(6573): 435-439.
- Carmeliet, P. and Jain, R.K.** 2000. Angiogenesis in Cancer and Other Diseases. *Nature* **407**(6801): 249-257.
- Carmeliet, P., Lampugnani, M.G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oostuyse, B., Dewerchin, M. et al.** 1999. Targeted Deficiency or Cytosolic Truncation of the Ve-Cadherin Gene in Mice Impairs Vegf-Mediated Endothelial Survival and Angiogenesis. *Cell* **98**(2): 147-157.
- Cebe-Suarez, S., Zehnder-Fjallman, A., and Ballmer-Hofer, K.** 2006. The Role of Vegf Receptors in Angiogenesis; Complex Partnerships. *Cell Mol Life Sci* **63**(5): 601-615.
- Chang, H., Lee, J., Poo, H., Noda, M., Diaz, T., Wei, B., Stetler-Stevenson, W.G., and Oh, J.** 2006. Timp-2 Promotes Cell Spreading and Adhesion Via Upregulation of Rap1 Signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **345**(3): 1201-1206.
- Chen, G., Cizeau, J., Vande Velde, C., Park, J.H., Bozek, G., Bolton, J., Shi, L., Dubik, D., and Greenberg, A.** 1999. Nix and Nip3 Form a Subfamily of Pro-Apoptotic Mitochondrial Proteins. *J Biol Chem* **274**(1): 7-10.
- Chevalier, J., Yi, J., Michel, O., and Tang, X.M.** 1997. Biotin and Digoxigenin as Labels for Light and Electron Microscopy in Situ Hybridization Probes: Where Do We Stand? *J Histochem Cytochem* **45**(4): 481-491.
- Chitnis, A.** 2006. Why Is Delta Endocytosis Required for Effective Activation of Notch? *Dev Dyn* **235**(4): 886-894.
- Claxton, S. and Fruttiger, M.** 2004. Periodic Delta-Like 4 Expression in Developing Retinal Arteries. *Gene Expr Patterns* **5**(1): 123-127.
- Clevers, H.** 2006. Wnt/Beta-Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* **127**(3): 469-480.
- Conlon, R.A., Reaume, A.G., and Rossant, J.** 1995. Notch1 Is Required for the Coordinate Segmentation of Somites. *Development* **121**(5): 1533-1545.
- Conway, E.M., Collen, D., and Carmeliet, P.** 2001. Molecular Mechanisms of Blood Vessel Growth. *Cardiovasc Res* **49**(3): 507-521.
- Corradetti, M.N., Inoki, K., and Guan, K.L.** 2005. The Stress-Inducted Proteins Rtp801 and Rtp801l Are Negative Regulators of the Mammalian Target of Rapamycin Pathway. *J Biol Chem* **280**(11): 9769-9772.
- Coultas, L., Chawengsaksophak, K., and Rossant, J.** 2005. Endothelial Cells and Vegf in Vascular Development. *Nature* **438**(7070): 937-945.
- Creazzo, T.L., Godt, R.E., Leatherbury, L., Conway, S.J., and Kirby, M.L.** 1998. Role of Cardiac Neural Crest Cells in Cardiovascular Development. *Annu Rev Physiol* **60**: 267-286.
- Dahlqvist, C., Blokzijl, A., Chapman, G., Falk, A., Dannaeus, K., Ibanez, C.F., and Lendahl, U.** 2003. Functional Notch Signaling Is Required for Bmp4-Induced Inhibition of Myogenic Differentiation. *Development* **130**(24): 6089-6099.
- Dass, C.R.** 2004. Tumour Angiogenesis, Vascular Biology and Enhanced Drug Delivery. *J Drug Target* **12**(5): 245-255.

- Davis, R.L. and Turner, D.L.** 2001. Vertebrate Hairy and Enhancer of Split Related Proteins: Transcriptional Repressors Regulating Cellular Differentiation and Embryonic Patterning. *Oncogene* **20**(58): 8342-8357.
- Davis, S., Gale, N.W., Aldrich, T.H., Maisonpierre, P.C., Lhotak, V., Pawson, T., Goldfarb, M., and Yancopoulos, G.D.** 1994. Ligands for Eph-Related Receptor Tyrosine Kinases That Require Membrane Attachment or Clustering for Activity. *Science* **266**(5186): 816-819.
- d'Azzo, A., Bongiovanni, A., and Nastasi, T.** 2005. E3 Ubiquitin Ligases as Regulators of Membrane Protein Trafficking and Degradation. *Traffic* **6**(6): 429-441.
- De Jossineau, C., Soule, J., Martin, M., Anguille, C., Montcourrier, P., and Alexandre, D.** 2003. Delta-Promoted Filopodia Mediate Long-Range Lateral Inhibition in Drosophila. *Nature* **426**(6966): 555-559.
- Dettman, R.W., Denetclaw, W., Jr., Ordahl, C.P., and Bristow, J.** 1998. Common Epicardial Origin of Coronary Vascular Smooth Muscle, Perivascular Fibroblasts, and Intermycocardial Fibroblasts in the Avian Heart. *Dev Biol* **193**(2): 169-181.
- Dickson, M.C., Martin, J.S., Cousins, F.M., Kulkarni, A.B., Karlsson, S., and Akhurst, R.J.** 1995. Defective Haematopoiesis and Vasculogenesis in Transforming Growth Factor-Beta 1 Knock out Mice. *Development* **121**(6): 1845-1854.
- Dietrich, U. and Campos-Ortega, J.A.** 1984. The Expression of Neurogenic Loci in Imaginal Epidermal Cells of Drosophila Melanogaster. *J Neurogenet* **1**(4): 315-332.
- Diez, H., Fischer, A., Winkler, A., Hu, C.J., Hatzopoulos, A.K., Breier, G., and Gessler, M.** 2006. Hypoxia-Mediated Activation of Dll4-Notch-Hey2 Signaling in Endothelial Progenitor Cells and Adoption of Arterial Cell Fate. *Exp Cell Res.*
- Doetschman, T., Gregg, R.G., Maeda, N., Hooper, M.L., Melton, D.W., Thompson, S., and Smithies, O.** 1987. Targetted Correction of a Mutant Hprt Gene in Mouse Embryonic Stem Cells. *Nature* **330**(6148): 576-578.
- Domenga, V., Fardoux, P., Lacombe, P., Monet, M., Maciazek, J., Krebs, L.T., Klonjowski, B., Berrou, E., Mericskay, M., Li, Z. et al.** 2004. Notch3 Is Required for Arterial Identity and Maturation of Vascular Smooth Muscle Cells. *Genes Dev* **18**(22): 2730-2735.
- Donovan, J., Kordylewska, A., Jan, Y.N., and Utset, M.F.** 2002. Tetralogy of Fallot and Other Congenital Heart Defects in Hey2 Mutant Mice. *Curr Biol* **12**(18): 1605-1610.
- Dorsch, M., Zheng, G., Yowe, D., Rao, P., Wang, Y., Shen, Q., Murphy, C., Xiong, X., Shi, Q., Gutierrez-Ramos, J.C. et al.** 2002. Ectopic Expression of Delta4 Impairs Hematopoietic Development and Leads to Lymphoproliferative Disease. *Blood* **100**(6): 2046-2055.
- Drake, C.J.** 2003. Embryonic and Adult Vasculogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* **69**(1): 73-82.
- Drake, C.J. and Fleming, P.A.** 2000. Vasculogenesis in the Day 6.5 to 9.5 Mouse Embryo. *Blood* **95**(5): 1671-1679.
- Duan, L., Yao, J., Wu, X., and Fan, M.** 2006. Growth Suppression Induced by Notch1 Activation Involves Wnt-Beta-Catenin Down-Regulation in Human Tongue Carcinoma Cells. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **98**(8): 479-490.

- Duarte, A., Hirashima, M., Benedito, R., Trindade, A., Diniz, P., Bekman, E., Costa, L., Henrique, D., and Rossant, J.** 2004. Dosage-Sensitive Requirement for Mouse Dll4 in Artery Development. *Genes Dev* **18**(20): 2474-2478.
- Duesberg, P., Rasnick, D., Li, R., Winters, L., Rausch, C., and Hehlmann, R.** 1999. How Aneuploidy May Cause Cancer and Genetic Instability. *Anticancer research* **19**(6A): 4887-4906.
- Duggan, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P., and Trent, J.M.** 1999. Expression Profiling Using Cdna Microarrays. *Nat Genet* **21**(1 Suppl): 10-14.
- Dumont, D.J., Fong, G.H., Puri, M.C., Gradwohl, G., Alitalo, K., and Breitman, M.L.** 1995. Vascularization of the Mouse Embryo: A Study of Flk-1, Tek, Tie, and Vascular Endothelial Growth Factor Expression During Development. *Dev Dyn* **203**(1): 80-92.
- Dumont, D.J., Gradwohl, G., Fong, G.H., Puri, M.C., Gertsenstein, M., Auerbach, A., and Breitman, M.L.** 1994. Dominant-Negative and Targeted Null Mutations in the Endothelial Receptor Tyrosine Kinase, Tek, Reveal a Critical Role in Vasculogenesis of the Embryo. *Genes Dev* **8**(16): 1897-1909.
- Dumont, D.J., Jussila, L., Taipale, J., Lymboussaki, A., Mustonen, T., Pajusola, K., Breitman, M., and Alitalo, K.** 1998. Cardiovascular Failure in Mouse Embryos Deficient in Vegf Receptor-3. *Science* **282**(5390): 946-949.
- Dunham, L.J. and Stewart, H.L.** 1953. A Survey of Transplantable and Transmissible Animal Tumors. *Journal of the National Cancer Institute* **13**(5): 1299-1377.
- Dvorak, A.M. and Feng, D.** 2001. The Vesiculo-Vacuolar Organelle (Vvo). A New Endothelial Cell Permeability Organelle. *J Histochem Cytochem* **49**(4): 419-432.
- Dy, G.K. and Adjei, A.A.** 2006. Angiogenesis Inhibitors in Lung Cancer: A Promise Fulfilled. *Clin Lung Cancer* **7 Suppl 4**: S145-149.
- Dymecki, S.M.** 2000. Site-Specific Recombination in Cells and Mice. in *Gene Targeting a Practical Approach* (ed. A.L. Joyner), pp. 37-96. Oxford University Press, New York.
- Eberhart, C.G. and Argani, P.** 2001. Wnt Signaling in Human Development: Beta-Catenin Nuclear Translocation in Fetal Lung, Kidney, Placenta, Capillaries, Adrenal, and Cartilage. *Pediatr Dev Pathol* **4**(4): 351-357.
- Eichmann, A., Yuan, L., Moyon, D., Lenoble, F., Pardanaud, L., and Breant, C.** 2005. Vascular Development: From Precursor Cells to Branched Arterial and Venous Networks. *Int J Dev Biol* **49**(2-3): 259-267.
- Eklund, L. and Olsen, B.R.** 2006. Tie Receptors and Their Angiopoietin Ligands Are Context-Dependent Regulators of Vascular Remodeling. *Exp Cell Res* **312**(5): 630-641.
- Eliceiri, B.P., Paul, R., Schwartzberg, P.L., Hood, J.D., Leng, J., and Cheresch, D.A.** 1999. Selective Requirement for Src Kinases During Vegf-Induced Angiogenesis and Vascular Permeability. *Mol Cell* **4**(6): 915-924.
- Emery, G., Hutterer, A., Berdnik, D., Mayer, B., Wirtz-Peitz, F., Gaitan, M.G., and Knoblich, J.A.** 2005. Asymmetric Rab11 Endosomes Regulate Delta Recycling and Specify Cell Fate in the Drosophila Nervous System. *Cell* **122**(5): 763-773.
- Esser, S., Wolburg, K., Wolburg, H., Breier, G., Kurzchalia, T., and Risau, W.** 1998. Vascular Endothelial Growth Factor Induces Endothelial Fenestrations in Vitro. *J Cell Biol* **140**(4): 947-959.
- Evans, M.J. and Kaufman, M.H.** 1981. Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos. *Nature* **292**(5819): 154-156.

- Ferguson, J.W., Mikesh, M.F., Wheeler, E.F., and LeBaron, R.G.** 2003. Developmental Expression Patterns of Beta-Ig (Betaig-H3) and Its Function as a Cell Adhesion Protein. *Mech Dev* **120**(8): 851-864.
- Ferrara, N.** 2002. Vegf and the Quest for Tumour Angiogenesis Factors. *Nature reviews* **2**(10): 795-803.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., and Moore, M.W.** 1996. Heterozygous Embryonic Lethality Induced by Targeted Inactivation of the Vegf Gene. *Nature* **380**(6573): 439-442.
- Ferrara, N. and Davis-Smyth, T.** 1997. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocr Rev* **18**(1): 4-25.
- Ferrara, N. and Kerbel, R.S.** 2005. Angiogenesis as a Therapeutic Target. *Nature* **438**(7070): 967-974.
- Fidler, I.J.** 2001. Angiogenic Heterogeneity: Regulation of Neoplastic Angiogenesis by the Organ Microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute* **93**(14): 1040-1041.
- Fischer, A., Schumacher, N., Maier, M., Sendtner, M., and Gessler, M.** 2004. The Notch Target Genes Hey1 and Hey2 Are Required for Embryonic Vascular Development. *Genes Dev* **18**(8): 901-911.
- Fitzgerald, K. and Greenwald, I.** 1995. Interchangeability of Caenorhabditis Elegans Dsl Proteins and Intrinsic Signalling Activity of Their Extracellular Domains in Vivo. *Development* **121**(12): 4275-4282.
- Flanagan, J.G. and Vanderhaeghen, P.** 1998. The Ephrins and Eph Receptors in Neural Development. *Annual review of neuroscience* **21**: 309-345.
- Fleming, R.J., Gu, Y., and Hukriede, N.A.** 1997. Serrate-Mediated Activation of Notch Is Specifically Blocked by the Product of the Gene Fringe in the Dorsal Compartment of the Drosophila Wing Imaginal Disc. *Development* **124**(15): 2973-2981.
- Foley, G.E. and Drolet, B.P.** 1956. Sustained Propagation of Sarcoma of 180 in Tissue Culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* **92**(2): 347-352.
- Foley, G.E., Drolet, B.P., Mc, C.R., Goulet, K.A., Dokos, J.M., and Filler, D.A.** 1960. Isolation and Serial Propagation of Malignant and Normal Cells in Semi-Defined Media. Origins of Crf Cell Lines. *Cancer Res* **20**: 930-939.
- Folkman, J.** 1971. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *The New England journal of medicine* **285**(21): 1182-1186.
- . 1986. How Is Blood Vessel Growth Regulated in Normal and Neoplastic Tissue? G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* **46**(2): 467-473.
- Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M., and Breitman, M.L.** 1995. Role of the Flt-1 Receptor Tyrosine Kinase in Regulating the Assembly of Vascular Endothelium. *Nature* **376**(6535): 66-70.
- Fong, G.H., Zhang, L., Bryce, D.M., and Peng, J.** 1999. Increased Hemangioblast Commitment, Not Vascular Disorganization, Is the Primary Defect in Flt-1 Knock-out Mice. *Development* **126**(13): 3015-3025.
- Fortini, M.E.** 2002. Gamma-Secretase-Mediated Proteolysis in Cell-Surface-Receptor Signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(9): 673-684.
- Fox, S.B., Gatter, K.C., and Harris, A.L.** 1996. Tumour Angiogenesis. *J Pathol* **179**(3): 232-237.

- Fuh, G., Garcia, K.C., and de Vos, A.M.** 2000. The Interaction of Neuropilin-1 with Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor Flt-1. *J Biol Chem* **275**(35): 26690-26695.
- Fuller, T., Korff, T., Kilian, A., Dandekar, G., and Augustin, H.G.** 2003. Forward Ephb4 Signaling in Endothelial Cells Controls Cellular Repulsion and Segregation from Ephrinb2 Positive Cells. *J Cell Sci* **116**(Pt 12): 2461-2470.
- Gale, N.W., Dominguez, M.G., Noguera, I., Pan, L., Hughes, V., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Adams, N.C., Lin, H.C., Holash, J. et al.** 2004. Haploinsufficiency of Delta-Like 4 Ligand Results in Embryonic Lethality Due to Major Defects in Arterial and Vascular Development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(45): 15949-15954.
- Gale, N.W., Holland, S.J., Valenzuela, D.M., Flenniken, A., Pan, L., Ryan, T.E., Henkemeyer, M., Strebhardt, K., Hirai, H., Wilkinson, D.G. et al.** 1996. Eph Receptors and Ligands Comprise Two Major Specificity Subclasses and Are Reciprocally Compartmentalized During Embryogenesis. *Neuron* **17**(1): 9-19.
- Gale, N.W. and Yancopoulos, G.D.** 1999. Growth Factors Acting Via Endothelial Cell-Specific Receptor Tyrosine Kinases: Vegfs, Angiopoietins, and Ephrins in Vascular Development. *Genes Dev* **13**(9): 1055-1066.
- Gerber, H.P., Dixit, V., and Ferrara, N.** 1998. Vascular Endothelial Growth Factor Induces Expression of the Antiapoptotic Proteins Bcl-2 and A1 in Vascular Endothelial Cells. *J Biol Chem* **273**(21): 13313-13316.
- Gerety, S.S. and Anderson, D.J.** 2002. Cardiovascular Ephrinb2 Function Is Essential for Embryonic Angiogenesis. *Development* **129**(6): 1397-1410.
- Gerety, S.S., Wang, H.U., Chen, Z.F., and Anderson, D.J.** 1999. Symmetrical Mutant Phenotypes of the Receptor Ephb4 and Its Specific Transmembrane Ligand Ephrin-B2 in Cardiovascular Development. *Mol Cell* **4**(3): 403-414.
- Gessler, M., Knobloch, K.P., Helisch, A., Amann, K., Schumacher, N., Rohde, E., Fischer, A., and Leimeister, C.** 2002. Mouse Gridlock: No Aortic Coarctation or Deficiency, but Fatal Cardiac Defects in Hey2 ^{-/-} Mice. *Curr Biol* **12**(18): 1601-1604.
- Gille, H., Kowalski, J., Yu, L., Chen, H., Pisabarro, M.T., Davis-Smyth, T., and Ferrara, N.** 2000. A Repressor Sequence in the Juxtamembrane Domain of Flt-1 (Vegfr-1) Constitutively Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor-Dependent Phosphatidylinositol 3'-Kinase Activation and Endothelial Cell Migration. *Embo J* **19**(15): 4064-4073.
- Gimbrone, M.A., Jr., Cotran, R.S., Leapman, S.B., and Folkman, J.** 1974. Tumor Growth and Neovascularization: An Experimental Model Using the Rabbit Cornea. *Journal of the National Cancer Institute* **52**(2): 413-427.
- Gluck, U. and Ben-Ze'ev, A.** 1994. Modulation of Alpha-Actinin Levels Affects Cell Motility and Confers Tumorigenicity on 3t3 Cells. *J Cell Sci* **107** (Pt 7): 1773-1782.
- Goldie, H., Jeffries, B.R., Maxwell, M.C., and Hahn, P.F.** 1952. Growth of Free Tumor Cells in the Pleural Exudate and Their Implantation into the Pleura of the Mouse. *Cancer Res* **12**(6): 422-425.
- Goodwin, A.M. and D'Amore, P.A.** 2002. Wnt Signaling in the Vasculature. *Angiogenesis* **5**(1-2): 1-9.
- Goodwin, A.M., Kitajewski, J., and D'Amore, P.A.** 2007. Wnt1 and Wnt5a Affect Endothelial Proliferation and Capillary Length; Wnt2 Does Not. *Growth factors (Chur, Switzerland)* **25**(1): 25-32.

- Goumans, M.J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P., and ten Dijke, P.** 2002. Balancing the Activation State of the Endothelium Via Two Distinct Tgf-Beta Type I Receptors. *Embo J* **21**(7): 1743-1753.
- Grazia Lampugnani, M., Zanetti, A., Corada, M., Takahashi, T., Balconi, G., Breviario, F., Orsenigo, F., Cattelino, A., Kemler, R., Daniel, T.O. et al.** 2003. Contact Inhibition of Vegf-Induced Proliferation Requires Vascular Endothelial Cadherin, Beta-Catenin, and the Phosphatase Dep-1/Cd148. *J Cell Biol* **161**(4): 793-804.
- Greenberg, N.M., DeMayo, F., Finegold, M.J., Medina, D., Tilley, W.D., Aspinall, J.O., Cunha, G.R., Donjacour, A.A., Matusik, R.J., and Rosen, J.M.** 1995. Prostate Cancer in a Transgenic Mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(8): 3439-3443.
- Gridley, T.** 1997. Notch Signaling in Vertebrate Development and Disease. *Mol Cell Neurosci* **9**(2): 103-108.
- Gupta-Rossi, N., Six, E., LeBail, O., Logeat, F., Chastagner, P., Olry, A., Israel, A., and Brou, C.** 2004. Monoubiquitination and Endocytosis Direct Gamma-Secretase Cleavage of Activated Notch Receptor. *J Cell Biol* **166**(1): 73-83.
- Gustafsson, E., Brakebusch, C., Hietanen, K., and Fassler, R.** 2001. Tie-1-Directed Expression of Cre Recombinase in Endothelial Cells of Embryoid Bodies and Transgenic Mice. *J Cell Sci* **114**(Pt 4): 671-676.
- Hahn, W.C. and Weinberg, R.A.** 2002. Rules for Making Human Tumor Cells. *The New England journal of medicine* **347**(20): 1593-1603.
- Haigh, J.J., Morelli, P.I., Gerhardt, H., Haigh, K., Tsien, J., Damert, A., Miquerol, L., Muhlner, U., Klein, R., Ferrara, N. et al.** 2003. Cortical and Retinal Defects Caused by Dosage-Dependent Reductions in Vegf-a Paracrine Signaling. *Dev Biol* **262**(2): 225-241.
- Halloran, M.C. and Wolman, M.A.** 2006. Repulsion or Adhesion: Receptors Make the Call. *Curr Opin Cell Biol* **18**(5): 533-540.
- Hamada, K., Oike, Y., Ito, Y., Maekawa, H., Miyata, K., Shimomura, T., and Suda, T.** 2003. Distinct Roles of Ephrin-B2 Forward and Ephb4 Reverse Signaling in Endothelial Cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **23**(2): 190-197.
- Hamada, K., Oike, Y., Takakura, N., Ito, Y., Jussila, L., Dumont, D.J., Alitalo, K., and Suda, T.** 2000. Vegf-C Signaling Pathways through Vegfr-2 and Vegfr-3 in Vasculoangiogenesis and Hematopoiesis. *Blood* **96**(12): 3793-3800.
- Hamaguchi, I., Huang, X.L., Takakura, N., Tada, J., Yamaguchi, Y., Kodama, H., and Suda, T.** 1999. In Vitro Hematopoietic and Endothelial Cell Development from Cells Expressing Tek Receptor in Murine Aorta-Gonad-Mesonephros Region. *Blood* **93**(5): 1549-1556.
- Han, Z.C. and Liu, Y.** 1999. Angiogenesis: State of the Art. *Int J Hematol* **70**(2): 68-82.
- Hanahan, D.** 1985. Heritable Formation of Pancreatic Beta-Cell Tumours in Transgenic Mice Expressing Recombinant Insulin/Simian Virus 40 Oncogenes. *Nature* **315**(6015): 115-122.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A.** 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hann, B. and Balmain, A.** 2001. Building 'Validated' Mouse Models of Human Cancer. *Curr Opin Cell Biol* **13**(6): 778-784.
- Hashizume, H., Baluk, P., Morikawa, S., McLean, J.W., Thurston, G., Roberge, S., Jain, R.K., and McDonald, D.M.** 2000. Openings between Defective Endothelial Cells Explain Tumor Vessel Leakiness. *Am J Pathol* **156**(4): 1363-1380.

- Hattori, K., Dias, S., Heissig, B., Hackett, N.R., Lyden, D., Tateno, M., Hicklin, D.J., Zhu, Z., Witte, L., Crystal, R.G. et al.** 2001. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiopoietin-1 Stimulate Postnatal Hematopoiesis by Recruitment of Vasculogenic and Hematopoietic Stem Cells. *J Exp Med* **193**(9): 1005-1014.
- Hattori, K., Heissig, B., Wu, Y., Dias, S., Tejada, R., Ferris, B., Hicklin, D.J., Zhu, Z., Bohlen, P., Witte, L. et al.** 2002. Placental Growth Factor Reconstitutes Hematopoiesis by Recruiting Vegfr1(+) Stem Cells from Bone-Marrow Microenvironment. *Nat Med* **8**(8): 841-849.
- Heitzler, P. and Simpson, P.** 1991. The Choice of Cell Fate in the Epidermis of Drosophila. *Cell* **64**(6): 1083-1092.
- . 1993. Altered Epidermal Growth Factor-Like Sequences Provide Evidence for a Role of Notch as a Receptor in Cell Fate Decisions. *Development* **117**(3): 1113-1123.
- Hellstrom, M., Phng, L.K., Hofmann, J.J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., Alva, J., Nilsson, A.K., Karlsson, L., Gaiano, N. et al.** 2007. Dll4 Signalling through Notch1 Regulates Formation of Tip Cells During Angiogenesis. *Nature*.
- Henderson, A.M., Wang, S.J., Taylor, A.C., Aitkenhead, M., and Hughes, C.C.** 2001. The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Hes1 Regulates Endothelial Cell Tube Formation. *J Biol Chem* **276**(9): 6169-6176.
- Henderson, B.R., Galea, M., Schuechner, S., and Leung, L.** 2002. Lymphoid Enhancer Factor-1 Blocks Adenomatous Polyposis Coli-Mediated Nuclear Export and Degradation of Beta-Catenin. Regulation by Histone Deacetylase 1. *J Biol Chem* **277**(27): 24258-24264.
- Henkemeyer, M., Orioli, D., Henderson, J.T., Saxton, T.M., Roder, J., Pawson, T., and Klein, R.** 1996. Nuk Controls Pathfinding of Commissural Axons in the Mammalian Central Nervous System. *Cell* **86**(1): 35-46.
- Hicks, C., Ladi, E., Lindsell, C., Hsieh, J.J., Hayward, S.D., Collazo, A., and Weinmaster, G.** 2002. A Secreted Delta1-Fc Fusion Protein Functions Both as an Activator and Inhibitor of Notch1 Signaling. *J Neurosci Res* **68**(6): 655-667.
- Hirashima, M. and Suda, T.** 2006. Differentiation of Arterial and Venous Endothelial Cells and Vascular Morphogenesis. *Endothelium* **13**(2): 137-145.
- Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T., and Shibuya, M.** 1998. Flt-1 Lacking the Tyrosine Kinase Domain Is Sufficient for Normal Development and Angiogenesis in Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(16): 9349-9354.
- Hiratsuka, S., Nakao, K., Nakamura, K., Katsuki, M., Maru, Y., and Shibuya, M.** 2005. Membrane Fixation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 Ligand-Binding Domain Is Important for Vasculogenesis and Angiogenesis in Mice. *Mol Cell Biol* **25**(1): 346-354.
- Hoffmann, I., Draetta, G., and Karsenti, E.** 1994. Activation of the Phosphatase Activity of Human Cdc25a by a Cdk2-Cyclin E Dependent Phosphorylation at the G1/S Transition. *Embo J* **13**(18): 4302-4310.
- Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F., and Lacy, E. 1994. *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hogan, K.A., Ambler, C.A., Chapman, D.L., and Bautch, V.L.** 2004. The Neural Tube Patterns Vessels Developmentally Using the Vegf Signaling Pathway. *Development* **131**(7): 1503-1513.

- Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D., and Wiegand, S.J.** 1999. Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and Vegf. *Science* **284**(5422): 1994-1998.
- Holland, S.J., Gale, N.W., Mbamalu, G., Yancopoulos, G.D., Henkemeyer, M., and Pawson, T.** 1996. Bidirectional Signalling through the Eph-Family Receptor Nuk and Its Transmembrane Ligands. *Nature* **383**(6602): 722-725.
- Hori, K., Fostier, M., Ito, M., Fuwa, T.J., Go, M.J., Okano, H., Baron, M., and Matsuno, K.** 2004. Drosophila Deltex Mediates Suppressor of Hairless-Independent and Late-Endosomal Activation of Notch Signaling. *Development* **131**(22): 5527-5537.
- Hrabe de Angelis, M., McIntyre, J., 2nd, and Gossler, A.** 1997. Maintenance of Somite Borders in Mice Requires the Delta Homologue Dii1. *Nature* **386**(6626): 717-721.
- Hukriede, N.A. and Fleming, R.J.** 1997. Beaded of Goldschmidt, an Antimorphic Allele of Serrate, Encodes a Protein Lacking Transmembrane and Intracellular Domains. *Genetics* **145**(2): 359-374.
- Hukriede, N.A., Gu, Y., and Fleming, R.J.** 1997. A Dominant-Negative Form of Serrate Acts as a General Antagonist of Notch Activation. *Development* **124**(17): 3427-3437.
- Hungerford, J.E., Owens, G.K., Argraves, W.S., and Little, C.D.** 1996. Development of the Aortic Vessel Wall as Defined by Vascular Smooth Muscle and Extracellular Matrix Markers. *Dev Biol* **178**(2): 375-392.
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E. et al.** 2004. Bevacizumab Plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *The New England journal of medicine* **350**(23): 2335-2342.
- Hutterer, A. and Knoblich, J.A.** 2005. Numb and Alpha-Adaptin Regulate Sanpodo Endocytosis to Specify Cell Fate in Drosophila External Sensory Organs. *EMBO Rep* **6**(9): 836-842.
- Hynes, R.O. and Zhao, Q.** 2000. The Evolution of Cell Adhesion. *J Cell Biol* **150**(2): F89-96.
- Ide, A.G., Baker, N.H., and Warren, S.L.** 1939. Vascularization of the Brown Pearce Rabbit Epithelioma Transplant as Seen in the Transparent Ear Chamber. *Am J Roentgenol* **42**: 891-899.
- Ikeuchi, T. and Sisodia, S.S.** 2003. The Notch Ligands, Delta1 and Jagged2, Are Substrates for Presenilin-Dependent "Gamma-Secretase" Cleavage. *J Biol Chem* **278**(10): 7751-7754.
- Ilic, D., Kovacic, B., McDonagh, S., Jin, F., Baumbusch, C., Gardner, D.G., and Damsky, C.H.** 2003. Focal Adhesion Kinase Is Required for Blood Vessel Morphogenesis. *Circ Res* **92**(3): 300-307.
- Inoki, I., Shiomi, T., Hashimoto, G., Enomoto, H., Nakamura, H., Makino, K., Ikeda, E., Takata, S., Kobayashi, K., and Okada, Y.** 2002. Connective Tissue Growth Factor Binds Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) and Inhibits Vegf-Induced Angiogenesis. *Faseb J* **16**(2): 219-221.
- Ishikawa, T., Tamai, Y., Zorn, A.M., Yoshida, H., Seldin, M.F., Nishikawa, S., and Taketo, M.M.** 2001. Mouse Wnt Receptor Gene Fzd5 Is Essential for Yolk Sac and Placental Angiogenesis. *Development* **128**(1): 25-33.
- Iso, T., Hamamori, Y., and Kedes, L.** 2003. Notch Signaling in Vascular Development. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **23**(4): 543-553.
- Iso, T., Kedes, L., and Hamamori, Y.** 2003. Hes and Herp Families: Multiple Effectors of the Notch Signaling Pathway. *J Cell Physiol* **194**(3): 237-255.

- Iso, T., Maeno, T., Oike, Y., Yamazaki, M., Doi, H., Arai, M., and Kurabayashi, M.** 2006. Dll4-Selective Notch Signaling Induces Ephrinb2 Gene Expression in Endothelial Cells. *Biochem Biophys Res Commun* **341**(3): 708-714.
- Itoh, F., Itoh, S., Goumans, M.J., Valdimarsdottir, G., Iso, T., Dotto, G.P., Hamamori, Y., Kedes, L., Kato, M., and ten Dijke Pt, P.** 2004. Synergy and Antagonism between Notch and Bmp Receptor Signaling Pathways in Endothelial Cells. *Embo J* **23**(3): 541-551.
- Ivkovic, S., Yoon, B.S., Popoff, S.N., Safadi, F.F., Libuda, D.E., Stephenson, R.C., Daluiski, A., and Lyons, K.M.** 2003. Connective Tissue Growth Factor Coordinates Chondrogenesis and Angiogenesis During Skeletal Development. *Development* **130**(12): 2779-2791.
- Jackson, D.E.** 2003. The Unfolding Tale of Pecam-1. *FEBS Lett* **540**(1-3): 7-14.
- Jacob, F.** 1983. Concluding Remarks. *Cold Spring Harbor Conf Cell Proliferation* **10**: 683-687.
- Jacobsen, T.L., Brennan, K., Arias, A.M., and Muskavitch, M.A.** 1998. Cis-Interactions between Delta and Notch Modulate Neurogenic Signalling in Drosophila. *Development* **125**(22): 4531-4540.
- Jafar-Nejad, H., Norga, K., and Bellen, H.** 2002. Numb: "Adapting" Notch for Endocytosis. *Dev Cell* **3**(2): 155-156.
- Jain, R.K.** 2003. Molecular Regulation of Vessel Maturation. *Nat Med* **9**(6): 685-693.
- Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E.H., Kopan, R., and Israel, A.** 1995. Signalling Downstream of Activated Mammalian Notch. *Nature* **377**(6547): 355-358.
- Jehn, B.M., Dittert, I., Beyer, S., von der Mark, K., and Bielke, W.** 2002. C-Cbl Binding and Ubiquitin-Dependent Lysosomal Degradation of Membrane-Associated Notch1. *J Biol Chem* **277**(10): 8033-8040.
- Jones, E.A., Clement-Jones, M., and Wilson, D.I.** 2000. Jagged1 Expression in Human Embryos: Correlation with the Alagille Syndrome Phenotype. *Journal of medical genetics* **37**(9): 658-662.
- Jones, N., Iljin, K., Dumont, D.J., and Alitalo, K.** 2001. Tie Receptors: New Modulators of Angiogenic and Lymphangiogenic Responses. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(4): 257-267.
- Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N., and Alitalo, K.** 1996. A Novel Vascular Endothelial Growth Factor, Vegf-C, Is a Ligand for the Flt4 (Vegfr-3) and Kdr (Vegfr-2) Receptor Tyrosine Kinases. *Embo J* **15**(7): 1751.
- Joutel, A., Corpechot, C., Ducros, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Mouton, P., Alamowitch, S., Domenga, V., Cecillion, M., Marechal, E. et al.** 1996. Notch3 Mutations in Cadasil, a Hereditary Adult-Onset Condition Causing Stroke and Dementia. *Nature* **383**(6602): 707-710.
- Ju, B.G., Jeong, S., Bae, E., Hyun, S., Carroll, S.B., Yim, J., and Kim, J.** 2000. Fringe Forms a Complex with Notch. *Nature* **405**(6783): 191-195.
- Juriloff, D.M. and Harris, M.J.** 2000. Mouse Models for Neural Tube Closure Defects. *Hum Mol Genet* **9**(6): 993-1000.
- Kaipainen, A., Korhonen, J., Mustonen, T., van Hinsbergh, V.W., Fang, G.H., Dumont, D., Breitman, M., and Alitalo, K.** 1995. Expression of the Fms-Like Tyrosine Kinase 4 Gene Becomes Restricted to Lymphatic Endothelium During Development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(8): 3566-3570.

- Kanno, S., Oda, N., Abe, M., Terai, Y., Ito, M., Shitara, K., Tabayashi, K., Shibuya, M., and Sato, Y.** 2000. Roles of Two Vegf Receptors, Flt-1 and Kdr, in the Signal Transduction of Vegf Effects in Human Vascular Endothelial Cells. *Oncogene* **19**(17): 2138-2146.
- Kao, Y.R., Shih, J.Y., Wen, W.C., Ko, Y.P., Chen, B.M., Chan, Y.L., Chu, Y.W., Yang, P.C., Wu, C.W., and Roffler, S.R.** 2003. Tumor-Associated Antigen L6 and the Invasion of Human Lung Cancer Cells. *Clin Cancer Res* **9**(7): 2807-2816.
- Katsube, K. and Sakamoto, K.** 2005. Notch in Vertebrates--Molecular Aspects of the Signal. *Int J Dev Biol* **49**(2-3): 369-374.
- Kaur, S., Castellone, M.D., Bedell, V.M., Konar, M., Gutkind, J.S., and Ramchandran, R.** 2006. Robo4 Signaling in Endothelial Cells Implies Attraction Guidance Mechanisms. *J Biol Chem* **281**(16): 11347-11356.
- Kawakami, A., Kitsukawa, T., Takagi, S., and Fujisawa, H.** 1996. Developmentally Regulated Expression of a Cell Surface Protein, Neuropilin, in the Mouse Nervous System. *J Neurobiol* **29**(1): 1-17.
- Kawasaki, T., Kitsukawa, T., Bekku, Y., Matsuda, Y., Sanbo, M., Yagi, T., and Fujisawa, H.** 1999. A Requirement for Neuropilin-1 in Embryonic Vessel Formation. *Development* **126**(21): 4895-4902.
- Kendall, R.L. and Thomas, K.A.** 1993. Inhibition of Vascular Endothelial Cell Growth Factor Activity by an Endogenously Encoded Soluble Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(22): 10705-10709.
- Kerbel, R.S.** 2006. Antiangiogenic Therapy: A Universal Chemosensitization Strategy for Cancer? *Science* **312**(5777): 1171-1175.
- Kimble, J. and Simpson, P.** 1997. The Lin-12/Notch Signaling Pathway and Its Regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 333-361.
- King, R.J.B. 1996. *Cancer Biology*. Longman, Harlow.
- Kisanuki, Y.Y., Hammer, R.E., Miyazaki, J., Williams, S.C., Richardson, J.A., and Yanagisawa, M.** 2001. Tie2-Cre Transgenic Mice: A New Model for Endothelial Cell-Lineage Analysis in Vivo. *Dev Biol* **230**(2): 230-242.
- Klausner, R.D.** 1999. Studying Cancer in the Mouse. *Oncogene* **18**(38): 5249-5252.
- Klug, K.M., Parody, T.R., and Muskavitch, M.A.** 1998. Complex Proteolytic Processing Acts on Delta, a Transmembrane Ligand for Notch, During Drosophila Development. *Mol Biol Cell* **9**(7): 1709-1723.
- Kluppel, M. and Wrana, J.L.** 2005. Turning It up a Notch: Cross-Talk between Tgfbeta and Notch Signaling. *Bioessays* **27**(2): 115-118.
- Knudsen, S. 2002. *A Biologist's Guide to Analysis of DNA Microarray Data*. Wiley-Interscience.
- Ko, J.A., Gondo, T., Inagaki, S., and Inui, M.** 2005. Requirement of the Transmembrane Semaphorin Sema4c for Myogenic Differentiation. *FEBS Lett* **579**(10): 2236-2242.
- Kokubo, H., Miyagawa-Tomita, S., Nakazawa, M., Saga, Y., and Johnson, R.L.** 2005. Mouse Hesr1 and Hesr2 Genes Are Redundantly Required to Mediate Notch Signaling in the Developing Cardiovascular System. *Dev Biol* **278**(2): 301-309.
- Koo, B.K., Lim, H.S., Song, R., Yoon, M.J., Yoon, K.J., Moon, J.S., Kim, Y.W., Kwon, M.C., Yoo, K.W., Kong, M.P. et al.** 2005. Mind Bomb 1 Is Essential for Generating Functional Notch Ligands to Activate Notch. *Development* **132**(15): 3459-3470.
- Korhonen, J., Lahtinen, I., Halmekyto, M., Alhonen, L., Janne, J., Dumont, D., and Alitalo, K.** 1995. Endothelial-Specific Gene Expression Directed by the Tie Gene Promoter in Vivo. *Blood* **86**(5): 1828-1835.

- Kramer, H.** 2001. Neuralized: Regulating Notch by Putting Away Delta. *Dev Cell* **1**(6): 725-726.
- Krebs, L.T., Shutter, J.R., Tanigaki, K., Honjo, T., Stark, K.L., and Gridley, T.** 2004. Haploinsufficient Lethality and Formation of Arteriovenous Malformations in Notch Pathway Mutants. *Genes Dev* **18**(20): 2469-2473.
- Krebs, L.T., Xue, Y., Norton, C.R., Shutter, J.R., Maguire, M., Sundberg, J.P., Gallahan, D., Closson, V., Kitajewski, J., Callahan, R. et al.** 2000. Notch Signaling Is Essential for Vascular Morphogenesis in Mice. *Genes Dev* **14**(11): 1343-1352.
- Krebs, L.T., Xue, Y., Norton, C.R., Sundberg, J.P., Beatus, P., Lendahl, U., Joutel, A., and Gridley, T.** 2003. Characterization of Notch3-Deficient Mice: Normal Embryonic Development and Absence of Genetic Interactions with a Notch1 Mutation. *Genesis* **37**(3): 139-143.
- Kruger, O., Plum, A., Kim, J.S., Winterhager, E., Maxeiner, S., Hallas, G., Kirchhoff, S., Traub, O., Lamers, W.H., and Willecke, K.** 2000. Defective Vascular Development in Connexin 45-Deficient Mice. *Development* **127**(19): 4179-4193.
- Kukk, E., Lymboussaki, A., Taira, S., Kaipainen, A., Jeltsch, M., Joukov, V., and Alitalo, K.** 1996. Vegf-C Receptor Binding and Pattern of Expression with Vegfr-3 Suggests a Role in Lymphatic Vascular Development. *Development* **122**(12): 3829-3837.
- Kumar, R., Kuniyasu, H., Bucana, C.D., Wilson, M.R., and Fidler, I.J.** 1998. Spatial and Temporal Expression of Angiogenic Molecules During Tumor Growth and Progression. *Oncol Res* **10**(6): 301-311.
- Kume, T., Jiang, H., Topczewska, J.M., and Hogan, B.L.** 2001. The Murine Winged Helix Transcription Factors, Foxc1 and Foxc2, Are Both Required for Cardiovascular Development and Somitogenesis. *Genes Dev* **15**(18): 2470-2482.
- Labbe, E., Silvestri, C., Hoodless, P.A., Wrana, J.L., and Attisano, L.** 1998. Smad2 and Smad3 Positively and Negatively Regulate Tgf Beta-Dependent Transcription through the Forkhead DNA-Binding Protein Fast2. *Mol Cell* **2**(1): 109-120.
- Ladi, E., Nichols, J.T., Ge, W., Miyamoto, A., Yao, C., Yang, L.T., Boulter, J., Sun, Y.E., Kintner, C., and Weinmaster, G.** 2005. The Divergent Dsl Ligand Dll3 Does Not Activate Notch Signaling but Cell Autonomously Attenuates Signaling Induced by Other Dsl Ligands. *J Cell Biol.*
- Lai, E.C.** 2004. Notch Signaling: Control of Cell Communication and Cell Fate. *Development* **131**(5): 965-973.
- Lai, E.C., Roegiers, F., Qin, X., Jan, Y.N., and Rubin, G.M.** 2005. The Ubiquitin Ligase Drosophila Mind Bomb Promotes Notch Signaling by Regulating the Localization and Activity of Serrate and Delta. *Development* **132**(10): 2319-2332.
- Lardelli, M., Williams, R., Mitsiadis, T., and Lendahl, U.** 1996. Expression of the Notch 3 Intracellular Domain in Mouse Central Nervous System Progenitor Cells Is Lethal and Leads to Disturbed Neural Tube Development. *Mech Dev* **59**(2): 177-190.
- Larsson, J., Goumans, M.J., Sjostrand, L.J., van Rooijen, M.A., Ward, D., Leveen, P., Xu, X., ten Dijke, P., Mummery, C.L., and Karlsson, S.** 2001. Abnormal Angiogenesis but Intact Hematopoietic Potential in Tgf-Beta Type I Receptor-Deficient Mice. *Embo J* **20**(7): 1663-1673.
- LaVoie, M.J. and Selkoe, D.J.** 2003. The Notch Ligands, Jagged and Delta, Are Sequentially Processed by Alpha-Secretase and Presenilin/Gamma-Secretase and Release Signaling Fragments. *J Biol Chem* **278**(36): 34427-34437.

- Lawrence, J.B. and Singer, R.H.** 1985. Quantitative Analysis of in Situ Hybridization Methods for the Detection of Actin Gene Expression. *Nucleic acids research* **13**(5): 1777-1799.
- Lawson, N.D., Scheer, N., Pham, V.N., Kim, C.H., Chitnis, A.B., Campos-Ortega, J.A., and Weinstein, B.M.** 2001. Notch Signaling Is Required for Arterial-Venous Differentiation During Embryonic Vascular Development. *Development* **128**(19): 3675-3683.
- Lawson, N.D., Vogel, A.M., and Weinstein, B.M.** 2002. Sonic Hedgehog and Vascular Endothelial Growth Factor Act Upstream of the Notch Pathway During Arterial Endothelial Differentiation. *Dev Cell* **3**(1): 127-136.
- Le Borgne, R.** 2006. Regulation of Notch Signalling by Endocytosis and Endosomal Sorting. *Curr Opin Cell Biol.*
- Le Borgne, R., Bardin, A., and Schweisguth, F.** 2005. The Roles of Receptor and Ligand Endocytosis in Regulating Notch Signaling. *Development* **132**(8): 1751-1762.
- le Noble, F., Moyon, D., Pardanaud, L., Yuan, L., Djonov, V., Matthijsen, R., Breant, C., Fleury, V., and Eichmann, A.** 2004. Flow Regulates Arterial-Venous Differentiation in the Chick Embryo Yolk Sac. *Development* **131**(2): 361-375.
- Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P., and Ten Dijke, P.** 2005. Tgf-Beta Receptor Function in the Endothelium. *Cardiovasc Res* **65**(3): 599-608.
- Lebrin, F., Goumans, M.J., Jonker, L., Carvalho, R.L., Valdimarsdottir, G., Thorikay, M., Mummery, C., Arthur, H.M., and ten Dijke, P.** 2004. Endoglin Promotes Endothelial Cell Proliferation and Tgf-Beta/Alk1 Signal Transduction. *Embo J* **23**(20): 4018-4028.
- Lee, N.V., Rodriguez-Manzanique, J.C., Thai, S.N., Twal, W.O., Luque, A., Lyons, K.M., Argraves, W.S., and Iruela-Arispe, M.L.** 2005. Fibulin-1 Acts as a Cofactor for the Matrix Metalloprotease Adamts-1. *J Biol Chem* **280**(41): 34796-34804.
- Lei, L., Xu, A., Panin, V.M., and Irvine, K.D.** 2003. An O-Fucose Site in the Ligand Binding Domain Inhibits Notch Activation. *Development* **130**(26): 6411-6421.
- Leimeister, C., Externbrink, A., Klamt, B., and Gessler, M.** 1999. Hey Genes: A Novel Subfamily of Hairy- and Enhancer of Split Related Genes Specifically Expressed During Mouse Embryogenesis. *Mech Dev* **85**(1-2): 173-177.
- LePage, D.F., Church, D.M., Millie, E., Hassold, T.J., and Conlon, R.A.** 2000. Rapid Generation of Nested Chromosomal Deletions on Mouse Chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(19): 10471-10476.
- Leslie, J.D., Ariza-McNaughton, L., Bermange, A.L., McAdow, R., Johnson, S.L., and Lewis, J.** 2007. Endothelial Signalling by the Notch Ligand Delta-Like 4 Restricts Angiogenesis. *Development.*
- Less, J.R., Posner, M.C., Skalak, T.C., Wolmark, N., and Jain, R.K.** 1997. Geometric Resistance and Microvascular Network Architecture of Human Colorectal Carcinoma. *Microcirculation* **4**(1): 25-33.
- Lewandoski, M.** 2001. Conditional Control of Gene Expression in the Mouse. *Nat Rev Genet* **2**(10): 743-755.
- Li, D.Y., Sorensen, L.K., Brooke, B.S., Urness, L.D., Davis, E.C., Taylor, D.G., Boak, B.B., and Wendel, D.P.** 1999. Defective Angiogenesis in Mice Lacking Endoglin. *Science* **284**(5419): 1534-1537.
- Li, L., Milner, L.A., Deng, Y., Iwata, M., Banta, A., Graf, L., Marcovina, S., Friedman, C., Trask, B.J., Hood, L. et al.** 1998. The Human Homolog of Rat Jagged1 Expressed by Marrow Stroma Inhibits Differentiation of 32d Cells through Interaction with Notch1. *Immunity* **8**(1): 43-55.

- Limbourg, F.P., Takeshita, K., Radtke, F., Bronson, R.T., Chin, M.T., and Liao, J.K.** 2005. Essential Role of Endothelial Notch1 in Angiogenesis. *Circulation* **111**(14): 1826-1832.
- Lindahl, P., Bostrom, H., Karlsson, L., Hellstrom, M., Kalen, M., and Betsholtz, C.** 1999. Role of Platelet-Derived Growth Factors in Angiogenesis and Alveogenesis. *Curr Top Pathol* **93**: 27-33.
- Lindahl, P., Hellstrom, M., Kalen, M., and Betsholtz, C.** 1998. Endothelial-Perivascular Cell Signaling in Vascular Development: Lessons from Knockout Mice. *Curr Opin Lipidol* **9**(5): 407-411.
- Liotta, L.A., Saidel, M.G., and Kleinerman, J.** 1976. The Significance of Hematogenous Tumor Cell Clumps in the Metastatic Process. *Cancer Res* **36**(3): 889-894.
- Lip, G.Y. and Blann, A.D.** 1995. Von Willebrand Factor and Its Relevance to Cardiovascular Disorders. *British heart journal* **74**(6): 580-583.
- Liu, Y., Cox, S.R., Morita, T., and Kourembanas, S.** 1995. Hypoxia Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression in Endothelial Cells. Identification of a 5' Enhancer. *Circ Res* **77**(3): 638-643.
- Liu, Z.J., Shirakawa, T., Li, Y., Soma, A., Oka, M., Dotto, G.P., Fairman, R.M., Velazquez, O.C., and Herlyn, M.** 2003. Regulation of Notch1 and Dll4 by Vascular Endothelial Growth Factor in Arterial Endothelial Cells: Implications for Modulating Arteriogenesis and Angiogenesis. *Mol Cell Biol* **23**(1): 14-25.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative Pcr and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**(4): 402-408.
- Lobe, C.G., Koop, K.E., Kreppner, W., Lomeli, H., Gertsenstein, M., and Nagy, A.** 1999. Z/AP, a Double Reporter for Cre-Mediated Recombination. *Dev Biol* **208**(2): 281-292.
- Lobov, I.B., Renard, R.A., Papadopoulos, N., Gale, N.W., Thurston, G., Yancopoulos, G.D., and Wiegand, S.J.** 2007. Delta-Like Ligand 4 (Dll4) Is Induced by Vegf as a Negative Regulator of Angiogenic Sprouting. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N.G., and Israel, A.** 1998. The Notch1 Receptor Is Cleaved Constitutively by a Furin-Like Convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(14): 8108-8112.
- Luque, A., Carpizo, D.R., and Iruela-Arispe, M.L.** 2003. Adamts1/Meth1 Inhibits Endothelial Cell Proliferation by Direct Binding and Sequestration of Vegf165. *J Biol Chem* **278**(26): 23656-23665.
- Mailhos, C., Modlich, U., Lewis, J., Harris, A., Bicknell, R., and Ish-Horowicz, D.** 2001. Delta4, an Endothelial Specific Notch Ligand Expressed at Sites of Physiological and Tumor Angiogenesis. *Differentiation* **69**(2-3): 135-144.
- Makarenkova, H., Sugiura, H., Yamagata, K., and Owens, G.** 2005. Alternatively Spliced Variants of Protocadherin 8 Exhibit Distinct Patterns of Expression During Mouse Development. *Biochimica et biophysica acta* **1681**(2-3): 150-156.
- Makinen, T., Veikkola, T., Mustjoki, S., Karpanen, T., Catimel, B., Nice, E.C., Wise, L., Mercer, A., Kowalski, H., Kerjaschki, D. et al.** 2001. Isolated Lymphatic Endothelial Cells Transduce Growth, Survival and Migratory Signals Via the Vegf-C/D Receptor Vegfr-3. *Embo J* **20**(17): 4762-4773.
- Mallo, M.** 2006. Controlled Gene Activation and Inactivation in the Mouse. *Front Biosci* **11**: 313-327.

- Mallo, M., Kanzler, B., and Ohnemus, S.** 2003. Reversible Gene Inactivation in the Mouse. *Genomics* **81**(4): 356-360.
- Maltepe, E., Schmidt, J.V., Baunoch, D., Bradfield, C.A., and Simon, M.C.** 1997. Abnormal Angiogenesis and Responses to Glucose and Oxygen Deprivation in Mice Lacking the Protein Arnt. *Nature* **386**(6623): 403-407.
- Mandai, K., Nakanishi, H., Satoh, A., Takahashi, K., Satoh, K., Nishioka, H., Mizoguchi, A., and Takai, Y.** 1999. Ponsin/Sh3p12: An L-Afadin- and Vinculin-Binding Protein Localized at Cell-Cell and Cell-Matrix Adherens Junctions. *J Cell Biol* **144**(5): 1001-1017.
- Mao, C., Malek, O.T., Pueyo, M.E., Steg, P.G., and Soubrier, F.** 2000. Differential Expression of Rat Frizzled-Related Frzb-1 and Frizzled Receptor Fz1 and Fz2 Genes in the Rat Aorta after Balloon Injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **20**(1): 43-51.
- Marambaud, P., Wen, P.H., Dutt, A., Shioi, J., Takashima, A., Siman, R., and Robakis, N.K.** 2003. A Cbp Binding Transcriptional Repressor Produced by the Ps1/Epsilon-Cleavage of N-Cadherin Is Inhibited by Ps1 Fad Mutations. *Cell* **114**(5): 635-645.
- Marshall, C.J., Moore, R.L., Thorogood, P., Brickell, P.M., Kinnon, C., and Thrasher, A.J.** 1999. Detailed Characterization of the Human Aorta-Gonad-Mesonephros Region Reveals Morphological Polarity Resembling a Hematopoietic Stromal Layer. *Dev Dyn* **215**(2): 139-147.
- Martin, G.R.** 1981. Isolation of a Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(12): 7634-7638.
- Martin, G.R. and Evans, M.J.** 1974. The Morphology and Growth of a Pluripotent Teratocarcinoma Cell Line and Its Derivatives in Tissue Culture. *Cell* **2**(3): 163-172.
- Martinez-Lopez, M.J., Alcantara, S., Mascaro, C., Perez-Branguli, F., Ruiz-Lozano, P., Maes, T., Soriano, E., and Buesa, C.** 2005. Mouse Neuron Navigator 1, a Novel Microtubule-Associated Protein Involved in Neuronal Migration. *Mol Cell Neurosci* **28**(4): 599-612.
- Masckauchan, T.N., Agalliu, D., Vorontchikhina, M., Ahn, A., Parmalee, N.L., Li, C.M., Khoo, A., Tycko, B., Brown, A.M., and Kitajewski, J.** 2006. Wnt5a Signaling Induces Proliferation and Survival of Endothelial Cells in Vitro and Expression of Mmp-1 and Tie-2. *Mol Biol Cell* **17**(12): 5163-5172.
- Matusaka, T., Kon, V., Takaya, J., Katori, H., Chen, X., Miyazaki, J., Homma, T., Fogo, A., and Ichikawa, I.** 2000. Dual Renin Gene Targeting by Cre-Mediated Interchromosomal Recombination. *Genomics* **64**(2): 127-131.
- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., and Ratcliffe, P.J.** 1999. The Tumour Suppressor Protein Vhl Targets Hypoxia-Inducible Factors for Oxygen-Dependent Proteolysis. *Nature* **399**(6733): 271-275.
- McCright, B., Gao, X., Shen, L., Lozier, J., Lan, Y., Maguire, M., Herzlinger, D., Weinmaster, G., Jiang, R., and Gridley, T.** 2001. Defects in Development of the Kidney, Heart and Eye Vasculature in Mice Homozygous for a Hypomorphic Notch2 Mutation. *Development* **128**(4): 491-502.
- McLaren, A. and Biggers, J.D.** 1958. Successful Development and Birth of Mice Cultivated in Vitro as Early as Early Embryos. *Nature* **182**(4639): 877-878.

- McMullen, M., Keller, R., Sussman, M., and Pumiglia, K.** 2004. Vascular Endothelial Growth Factor-Mediated Activation of P38 Is Dependent Upon Src and Raftk/Pyk2. *Oncogene* **23**(6): 1275-1282.
- Meirer, R., Gurunluoglu, R., and Siemionow, M.** 2001. Neurogenic Perspective on Vascular Endothelial Growth Factor: Review of the Literature. *J Reconstr Microsurg* **17**(8): 625-630.
- Miller, J.R.** 2002. The Wnts. *Genome biology* **3**(1): REVIEWS3001.
- Millot, G.A., Vainchenker, W., Dumenil, D., and Svinarchuk, F.** 2002. Distinct Effects of Thrombopoietin Depending on a Threshold Level of Activated Mpl in Baf-3 Cells. *J Cell Sci* **115**(Pt 11): 2329-2337.
- Mintz, B. and Illmensee, K.** 1975. Normal Genetically Mosaic Mice Produced from Malignant Teratocarcinoma Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(9): 3585-3589.
- Mishra-Gorur, K., Rand, M.D., Perez-Villamil, B., and Artavanis-Tsakonas, S.** 2002. Down-Regulation of Delta by Proteolytic Processing. *J Cell Biol* **159**(2): 313-324.
- Monaghan, A.P., Kioschis, P., Wu, W., Zuniga, A., Bock, D., Poustka, A., Delius, H., and Niehrs, C.** 1999. Dickkopf Genes Are Co-Ordinately Expressed in Mesodermal Lineages. *Mech Dev* **87**(1-2): 45-56.
- Monkley, S.J., Delaney, S.J., Pennisi, D.J., Christiansen, J.H., and Wainwright, B.J.** 1996. Targeted Disruption of the Wnt2 Gene Results in Placentation Defects. *Development* **122**(11): 3343-3353.
- Moohr, O.L.** 1919. *Genetics* **4**: 252.
- Morgan, T.H.** 1917. The Theory of the Gene. *Am Nat* **51**: 513-544.
- Morrison, S.J., Perez, S.E., Qiao, Z., Verdi, J.M., Hicks, C., Weinmaster, G., and Anderson, D.J.** 2000. Transient Notch Activation Initiates an Irreversible Switch from Neurogenesis to Gliogenesis by Neural Crest Stem Cells. *Cell* **101**(5): 499-510.
- Morrison, T.B., Weis, J.J., and Wittwer, C.T.** 1998. Quantification of Low-Copy Transcripts by Continuous Sybr Green I Monitoring During Amplification. *Biotechniques* **24**(6): 954-958, 960, 962.
- Mosavi, L.K., Cammett, T.J., Desrosiers, D.C., and Peng, Z.Y.** 2004. The Ankyrin Repeat as Molecular Architecture for Protein Recognition. *Protein Sci* **13**(6): 1435-1448.
- Motoike, T., Markham, D.W., Rossant, J., and Sato, T.N.** 2003. Evidence for Novel Fate of Flk1+ Progenitor: Contribution to Muscle Lineage. *Genesis* **35**(3): 153-159.
- Mukhopadhyay, M., Gorivodsky, M., Shtrom, S., Grinberg, A., Niehrs, C., Morasso, M.I., and Westphal, H.** 2006. Dkk2 Plays an Essential Role in the Corneal Fate of the Ocular Surface Epithelium. *Development* **133**(11): 2149-2154.
- Mukouyama, Y.S., Gerber, H.P., Ferrara, N., Gu, C., and Anderson, D.J.** 2005. Peripheral Nerve-Derived Vegf Promotes Arterial Differentiation Via Neuropilin 1-Mediated Positive Feedback. *Development* **132**(5): 941-952.
- Mukouyama, Y.S., Shin, D., Britsch, S., Taniguchi, M., and Anderson, D.J.** 2002. Sensory Nerves Determine the Pattern of Arterial Differentiation and Blood Vessel Branching in the Skin. *Cell* **109**(6): 693-705.
- Murone, M., Rosenthal, A., and de Sauvage, F.J.** 1999. Hedgehog Signal Transduction: From Flies to Vertebrates. *Exp Cell Res* **253**(1): 25-33.
- Muskhelishvili, L., Latendresse, J.R., Kodell, R.L., and Henderson, E.B.** 2003. Evaluation of Cell Proliferation in Rat Tissues with Brdu, Pcna, Ki-67(Mib-5) Immunohistochemistry and in Situ Hybridization for Histone Mrna. *J Histochem Cytochem* **51**(12): 1681-1688.

- Nagy, A., Gocza, E., Diaz, E.M., Prideaux, V.R., Ivanyi, E., Markkula, M., and Rossant, J.** 1990. Embryonic Stem Cells Alone Are Able to Support Fetal Development in the Mouse. *Development* **110**(3): 815-821.
- Nagy, A. and Rossant, J.** 2000. Production and Analysis of Es Cell Aggregation Chimeras. in *Gene Targeting a Practical Approach* (ed. A.L. Joyner), pp. 177-206. Oxford University Press, New York.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., and Roder, J.C.** 1993. Derivation of Completely Cell Culture-Derived Mice from Early-Passage Embryonic Stem Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18): 8424-8428.
- Nakagawa, O., McFadden, D.G., Nakagawa, M., Yanagisawa, H., Hu, T., Srivastava, D., and Olson, E.N.** 2000. Members of the Hrt Family of Basic Helix-Loop-Helix Proteins Act as Transcriptional Repressors Downstream of Notch Signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25): 13655-13660.
- Nakagawa, O., Nakagawa, M., Richardson, J.A., Olson, E.N., and Srivastava, D.** 1999. Hrt1, Hrt2, and Hrt3: A New Subclass of Bhlh Transcription Factors Marking Specific Cardiac, Somitic, and Pharyngeal Arch Segments. *Dev Biol* **216**(1): 72-84.
- Nal, B., Mohr, E., Silva, M.I., Tagett, R., Navarro, C., Carroll, P., Depetris, D., Verthuy, C., Jordan, B.R., and Ferrier, P.** 2002. Wdr12, a Mouse Gene Encoding a Novel Wd-Repeat Protein with a Notchless-Like Amino-Terminal Domain. *Genomics* **79**(1): 77-86.
- Nam, J.O., Kim, J.E., Jeong, H.W., Lee, S.J., Lee, B.H., Choi, J.Y., Park, R.W., Park, J.Y., and Kim, I.S.** 2003. Identification of the Alpha_vbeta₃ Integrin-Interacting Motif of Beta₁g-H3 and Its Anti-Angiogenic Effect. *J Biol Chem* **278**(28): 25902-25909.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., and Poltorak, Z.** 1999. Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) and Its Receptors. *Faseb J* **13**(1): 9-22.
- Neufeld, G., Cohen, T., Shraga, N., Lange, T., Kessler, O., and Herzog, Y.** 2002. The Neuropilins: Multifunctional Semaphorin and Vegf Receptors That Modulate Axon Guidance and Angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* **12**(1): 13-19.
- Newman, P.J., Berndt, M.C., Gorski, J., White, G.C., 2nd, Lyman, S., Paddock, C., and Muller, W.A.** 1990. Pecam-1 (Cd31) Cloning and Relation to Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Gene Superfamily. *Science* **247**(4947): 1219-1222.
- Nguyen, D.X., Westbrook, T.F., and McCance, D.J.** 2002. Human Papillomavirus Type 16 E7 Maintains Elevated Levels of the Cdc25a Tyrosine Phosphatase During Dereglulation of Cell Cycle Arrest. *Journal of virology* **76**(2): 619-632.
- Nichols, J.T., Miyamoto, A., Olsen, S.L., D'Souza, B., Yao, C., and Weinmaster, G.** 2007. Dsl Ligand Endocytosis Physically Dissociates Notch1 Heterodimers before Activating Proteolysis Can Occur. *J Cell Biol* **176**(4): 445-458.
- Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J.** 1991. Efficient Selection for High-Expression Transfectants with a Novel Eukaryotic Vector. *Gene* **108**(2): 193-199.
- Noden, D.M.** 1989. Embryonic Origins and Assembly of Blood Vessels. *Am Rev Respir Dis* **140**(4): 1097-1103.
- Noguera-Troise, I., Daly, C., Papadopoulos, N.J., Coetsee, S., Boland, P., Gale, N.W., Lin, H.C., Yancopoulos, G.D., and Thurston, G.** 2006. Blockade of Dll4 Inhibits Tumour Growth by Promoting Non-Productive Angiogenesis. *Nature* **444**(7122): 1032-1037.
- Novak, A., Guo, C., Yang, W., Nagy, A., and Lobe, C.G.** 2000. Z/Eg, a Double Reporter Mouse Line That Expresses Enhanced Green Fluorescent Protein Upon Cre-Mediated Excision. *Genesis* **28**(3-4): 147-155.

- O'Connor-Giles, K.M. and Skeath, J.B.** 2003. Numb Inhibits Membrane Localization of Sanpodo, a Four-Pass Transmembrane Protein, to Promote Asymmetric Divisions in *Drosophila*. *Dev Cell* **5**(2): 231-243.
- Oellers, N., Dehio, M., and Knust, E.** 1994. Bhlh Proteins Encoded by the Enhancer of Split Complex of *Drosophila* Negatively Interfere with Transcriptional Activation Mediated by Proneural Genes. *Mol Gen Genet* **244**(5): 465-473.
- O'Gorman, S., Fox, D.T., and Wahl, G.M.** 1991. Recombinase-Mediated Gene Activation and Site-Specific Integration in Mammalian Cells. *Science* **251**(4999): 1351-1355.
- Ogunshola, O.O., Antic, A., Donoghue, M.J., Fan, S.Y., Kim, H., Stewart, W.B., Madri, J.A., and Ment, L.R.** 2002. Paracrine and Autocrine Functions of Neuronal Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) in the Central Nervous System. *J Biol Chem* **277**(13): 11410-11415.
- Oh, S.P., Seki, T., Goss, K.A., Imamura, T., Yi, Y., Donahoe, P.K., Li, L., Miyazono, K., ten Dijke, P., Kim, S. et al.** 2000. Activin Receptor-Like Kinase 1 Modulates Transforming Growth Factor-Beta 1 Signaling in the Regulation of Angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(6): 2626-2631.
- Ohishi, K., Varnum-Finney, B., Flowers, D., Anasetti, C., Myerson, D., and Bernstein, I.D.** 2000. Monocytes Express High Amounts of Notch and Undergo Cytokine Specific Apoptosis Following Interaction with the Notch Ligand, Delta-1. *Blood* **95**(9): 2847-2854.
- Oliveira, S.S. and Morgado-Diaz, J.A.** 2007. Claudins: Multifunctional Players in Epithelial Tight Junctions and Their Role in Cancer. *Cell Mol Life Sci* **64**(1): 17-28.
- Oppenheimer, J.M. 1967. *Essays on the History of Embryology and Biology*. The MIT Press, Cambridge, Massachusetts.
- Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi-Rosso, G., and Lobb, R.** 1989. Direct Expression Cloning of Vascular Cell Adhesion Molecule 1, a Cytokine-Induced Endothelial Protein That Binds to Lymphocytes. *Cell* **59**(6): 1203-1211.
- Oshima, M., Oshima, H., and Taketo, M.M.** 1996. Tgf-Beta Receptor Type Ii Deficiency Results in Defects of Yolk Sac Hematopoiesis and Vasculogenesis. *Dev Biol* **179**(1): 297-302.
- Ozaki, K., Miyazaki, S., Tanimura, S., and Kohno, M.** 2005. Efficient Suppression of Fgf-2-Induced Erk Activation by the Cooperative Interaction among Mammalian Sprouty Isoforms. *J Cell Sci* **118**(Pt 24): 5861-5871.
- Palmiter, R.D. and Brinster, R.L.** 1985. Transgenic Mice. *Cell* **41**(2): 343-345.
- Palmiter, R.D., Chen, H.Y., and Brinster, R.L.** 1982. Differential Regulation of Metallothionein-Thymidine Kinase Fusion Genes in Transgenic Mice and Their Offspring. *Cell* **29**(2): 701-710.
- Panares, R.L. and Garcia, A.A.** 2007. Bevacizumab in the Management of Solid Tumors. *Expert review of anticancer therapy* **7**(4): 433-445.
- Panin, V.M., Papayannopoulos, V., Wilson, R., and Irvine, K.D.** 1997. Fringe Modulates Notch-Ligand Interactions. *Nature* **387**(6636): 908-912.
- Papaioannou, R.J. and V.E. 1977. The Biology of Embryogenesis. in *Concepts in Mammalian Embryogenesis* (ed. E.M.I. Sherman), pp. 1-36. The MIT Press, Cambridge, Massachusetts.

- Papaioannou, V. and Johnson, R. 2000. Production of Chimeras by Blastocyst and Morula Injection of Targeted Es Cells. in *Gene Targeting a Practical Approach* (ed. E.A.L. Joyner), pp. 133-174. Oxford University Press, New York.
- Papetti, M. and Herman, I.M.** 2002. Mechanisms of Normal and Tumor-Derived Angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**(5): C947-970.
- Park, K.W., Morrison, C.M., Sorensen, L.K., Jones, C.A., Rao, Y., Chien, C.B., Wu, J.Y., Urness, L.D., and Li, D.Y.** 2003. Robo4 Is a Vascular-Specific Receptor That Inhibits Endothelial Migration. *Dev Biol* **261**(1): 251-267.
- Parks, A.L., Klueg, K.M., Stout, J.R., and Muskavitch, M.A.** 2000. Ligand Endocytosis Drives Receptor Dissociation and Activation in the Notch Pathway. *Development* **127**(7): 1373-1385.
- Patan, S.** 1998. Tie1 and Tie2 Receptor Tyrosine Kinases Inversely Regulate Embryonic Angiogenesis by the Mechanism of Intussusceptive Microvascular Growth. *Microvascular research* **56**(1): 1-21.
- . 2000. Vasculogenesis and Angiogenesis as Mechanisms of Vascular Network Formation, Growth and Remodeling. *J Neurooncol* **50**(1-2): 1-15.
- Patel, N.S., Dobbie, M.S., Rochester, M., Steers, G., Poulson, R., Le Monnier, K., Cranston, D.W., Li, J.L., and Harris, A.L.** 2006. Up-Regulation of Endothelial Delta-Like 4 Expression Correlates with Vessel Maturation in Bladder Cancer. *Clin Cancer Res* **12**(16): 4836-4844.
- Patel, N.S., Li, J.L., Generali, D., Poulson, R., Cranston, D.W., and Harris, A.L.** 2005. Up-Regulation of Delta-Like 4 Ligand in Human Tumor Vasculature and the Role of Basal Expression in Endothelial Cell Function. *Cancer Res* **65**(19): 8690-8697.
- Pelengaris, S., Khan, M., and Evan, G.** 2002. C-Myc: More Than Just a Matter of Life and Death. *Nature reviews* **2**(10): 764-776.
- Pepicelli, C.V., Lewis, P.M., and McMahon, A.P.** 1998. Sonic Hedgehog Regulates Branching Morphogenesis in the Mammalian Lung. *Curr Biol* **8**(19): 1083-1086.
- Pepper, M.S.** 1997. Transforming Growth Factor-Beta: Vasculogenesis, Angiogenesis, and Vessel Wall Integrity. *Cytokine & growth factor reviews* **8**(1): 21-43.
- Petcherski, A.G. and Kimble, J.** 2000. Lag-3 Is a Putative Transcriptional Activator in the C. Elegans Notch Pathway. *Nature* **405**(6784): 364-368.
- . 2000. Mastermind Is a Putative Activator for Notch. *Curr Biol* **10**(13): R471-473.
- Pettersson, A., Nagy, J.A., Brown, L.F., Sundberg, C., Morgan, E., Jungles, S., Carter, R., Krieger, J.E., Manseau, E.J., Harvey, V.S. 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.
- Pintar, A., De Biasio, A., Popovic, M., Ivanova, N., and Pongor, S.** 2007. The Intracellular Region of Notch Ligands: Does the Tail Make the Difference? *Biol Direct* **2**(1): 19.
- Pirot, P., van Grunsven, L.A., Marine, J.C., Huylebroeck, D., and Bellefroid, E.J.** 2004. Direct Regulation of the Nrarp Gene Promoter by the Notch Signaling Pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **322**(2): 526-534.
- Pitsouli, C. and Delidakis, C.** 2005. The Interplay between Dsl Proteins and Ubiquitin Ligases in Notch Signaling. *Development* **132**(18): 4041-4050.
- Plank, M.J. and Sleeman, B.D.** 2003. Tumour-Induced Angiogenesis: A Review. *Journal of Theoretical Medicine* **5**(3-4): 137-153.

- Pola, R., Ling, L.E., Silver, M., Corbley, M.J., Kearney, M., Blake Pepinsky, R., Shapiro, R., Taylor, F.R., Baker, D.P., Asahara, T. et al.** 2001. The Morphogen Sonic Hedgehog Is an Indirect Angiogenic Agent Upregulating Two Families of Angiogenic Growth Factors. *Nat Med* **7**(6): 706-711.
- Poulson, D.F.** 1937. *Proc Natl Acad Sci USA* **4**: 252.
- Procopio, W.N., Pelavin, P.I., Lee, W.M., and Yeilding, N.M.** 1999. Angiopoietin-1 and -2 Coiled Coil Domains Mediate Distinct Homo-Oligomerization Patterns, but Fibrinogen-Like Domains Mediate Ligand Activity. *J Biol Chem* **274**(42): 30196-30201.
- Przemeck, G.K., Heinzmann, U., Beckers, J., and Hrabe de Angelis, M.** 2003. Node and Midline Defects Are Associated with Left-Right Development in Delta1 Mutant Embryos. *Development* **130**(1): 3-13.
- Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J.** 2003. Regulation of Angiogenesis by Hypoxia: Role of the Hif System. *Nat Med* **9**(6): 677-684.
- Puri, M.C., Rossant, J., Alitalo, K., Bernstein, A., and Partanen, J.** 1995. The Receptor Tyrosine Kinase Tie Is Required for Integrity and Survival of Vascular Endothelial Cells. *Embo J* **14**(23): 5884-5891.
- Qi, H., Rand, M.D., Wu, X., Sestan, N., Wang, W., Rakic, P., Xu, T., and Artavanis-Tsakonas, S.** 1999. Processing of the Notch Ligand Delta by the Metalloprotease Kuzbanian. *Science* **283**(5398): 91-94.
- Quelle, D.E., Ashmun, R.A., Shurtleff, S.A., Kato, J.Y., Bar-Sagi, D., Roussel, M.F., and Sherr, C.J.** 1993. Overexpression of Mouse D-Type Cyclins Accelerates G1 Phase in Rodent Fibroblasts. *Genes Dev* **7**(8): 1559-1571.
- Rafii, S., Heissig, B., and Hattori, K.** 2002. Efficient Mobilization and Recruitment of Marrow-Derived Endothelial and Hematopoietic Stem Cells by Adenoviral Vectors Expressing Angiogenic Factors. *Gene therapy* **9**(10): 631-641.
- Ramirez-Bergeron, D.L., Runge, A., Dahl, K.D., Fehling, H.J., Keller, G., and Simon, M.C.** 2004. Hypoxia Affects Mesoderm and Enhances Hemangioblast Specification During Early Development. *Development* **131**(18): 4623-4634.
- Ramirez-Solis, R., Liu, P., and Bradley, A.** 1995. Chromosome Engineering in Mice. *Nature* **378**(6558): 720-724.
- Rand, M.D., Grimm, L.M., Artavanis-Tsakonas, S., Patriub, V., Blacklow, S.C., Sklar, J., and Aster, J.C.** 2000. Calcium Depletion Dissociates and Activates Heterodimeric Notch Receptors. *Mol Cell Biol* **20**(5): 1825-1835.
- Ranieri, G., Patruno, R., Ruggieri, E., Montemurro, S., Valerio, P., and Ribatti, D.** 2006. Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) as a Target of Bevacizumab in Cancer: From the Biology to the Clinic. *Curr Med Chem* **13**(16): 1845-1857.
- Rao, P.K., Dorsch, M., Chickering, T., Zheng, G., Jiang, C., Goodearl, A., Kadesch, T., and McCarthy, S.** 2000. Isolation and Characterization of the Notch Ligand Delta4. *Exp Cell Res* **260**(2): 379-386.
- Ray, W.J., Yao, M., Mumm, J., Schroeter, E.H., Saftig, P., Wolfe, M., Selkoe, D.J., Kopan, R., and Goate, A.M.** 1999. Cell Surface Presenilin-1 Participates in the Gamma-Secretase-Like Proteolysis of Notch. *J Biol Chem* **274**(51): 36801-36807.
- Rebhun, J.F., Castro, A.F., and Quilliam, L.A.** 2000. Identification of Guanine Nucleotide Exchange Factors (Gefs) for the Rap1 Gtpase. Regulation of Mr-Gef by M-Ras-Gtp Interaction. *J Biol Chem* **275**(45): 34901-34908.

- Ridgway, J., Zhang, G., Wu, Y., Stawicki, S., Liang, W.C., Chanthery, Y., Kowalski, J., Watts, R.J., Callahan, C., Kasman, I. et al.** 2006. Inhibition of Dll4 Signalling Inhibits Tumour Growth by Deregulating Angiogenesis. *Nature* **444**(7122): 1083-1087.
- Risau, W.** 1998. Development and Differentiation of Endothelium. *Kidney Int Suppl* **67**: S3-6.
- Roberts, W.G. and Palade, G.E.** 1995. Increased Microvascular Permeability and Endothelial Fenestration Induced by Vascular Endothelial Growth Factor. *J Cell Sci* **108** (Pt 6): 2369-2379.
- .** 1997. Neovasculature Induced by Vascular Endothelial Growth Factor Is Fenestrated. *Cancer Res* **57**(4): 765-772.
- Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M., and Evans, M.** 1986. Germ-Line Transmission of Genes Introduced into Cultured Pluripotential Cells by Retroviral Vector. *Nature* **323**(6087): 445-448.
- Robitaille, J., MacDonald, M.L., Kaykas, A., Sheldahl, L.C., Zeisler, J., Dube, M.P., Zhang, L.H., Singaraja, R.R., Guernsey, D.L., Zheng, B. et al.** 2002. Mutant Frizzled-4 Disrupts Retinal Angiogenesis in Familial Exudative Vitreoretinopathy. *Nat Genet* **32**(2): 326-330.
- Roll, R.L., Bauman, E.M., Bennett, J.S., and Abrams, C.S.** 2000. Phosphorylated Pleckstrin Induces Cell Spreading Via an Integrin-Dependent Pathway. *J Cell Biol* **150**(6): 1461-1466.
- Roman, B.L. and Weinstein, B.M.** 2000. Building the Vertebrate Vasculature: Research Is Going Swimmingly. *Bioessays* **22**(10): 882-893.
- Rossant, J. and Hirashima, M.** 2003. Vascular Development and Patterning: Making the Right Choices. *Curr Opin Genet Dev* **13**(4): 408-412.
- Rossant, J. and Howard, L.** 2002. Signaling Pathways in Vascular Development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 541-573.
- Rousseau, S., Houle, F., and Huot, J.** 2000. Integrating the Vegf Signals Leading to Actin-Based Motility in Vascular Endothelial Cells. *Trends Cardiovasc Med* **10**(8): 321-327.
- Rousseau, S., Houle, F., Kotanides, H., Witte, L., Waltenberger, J., Landry, J., and Huot, J.** 2000. Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf)-Driven Actin-Based Motility Is Mediated by Vegfr2 and Requires Concerted Activation of Stress-Activated Protein Kinase 2 (Sapk2/P38) and Geldanamycin-Sensitive Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase. *J Biol Chem* **275**(14): 10661-10672.
- Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., and Huot, J.** 1997. P38 Map Kinase Activation by Vascular Endothelial Growth Factor Mediates Actin Reorganization and Cell Migration in Human Endothelial Cells. *Oncogene* **15**(18): 2169-2177.
- Ruehl, M., Erben, U., Schuppan, D., Wagner, C., Zeller, A., Freise, C., Al-Hasani, H., Loesekann, M., Notter, M., Wittig, B.M. et al.** 2005. The Elongated First Fibronectin Type Iii Domain of Collagen Xiv Is an Inducer of Quiescence and Differentiation in Fibroblasts and Preadipocytes. *J Biol Chem* **280**(46): 38537-38543.
- Rulicke, T. and Hubscher, U.** 2000. Germ Line Transformation of Mammals by Pronuclear Microinjection. *Experimental physiology* **85**(6): 589-601.
- Rusnati, M. and Presta, M.** 2006. Extracellular Angiogenic Growth Factor Interactions: An Angiogenesis Interactome Survey. *Endothelium* **13**(2): 93-111.
- Ryan, H.E., Lo, J., and Johnson, R.S.** 1998. Hif-1 Alpha Is Required for Solid Tumor Formation and Embryonic Vascularization. *Embo J* **17**(11): 3005-3015.

- Saaristo, A., Karpanen, T., and Alitalo, K.** 2000. Mechanisms of Angiogenesis and Their Use in the Inhibition of Tumor Growth and Metastasis. *Oncogene* **19**(53): 6122-6129.
- Saharinen, P., Kerkela, K., Ekman, N., Marron, M., Brindle, N., Lee, G.M., Augustin, H., Koh, G.Y., and Alitalo, K.** 2005. Multiple Angiopoietin Recombinant Proteins Activate the Tie1 Receptor Tyrosine Kinase and Promote Its Interaction with Tie2. *J Cell Biol* **169**(2): 239-243.
- Sancho, E., Batlle, E., and Clevers, H.** 2004. Signaling Pathways in Intestinal Development and Cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 695-723.
- Sankar, S., Mahooti-Brooks, N., Centrella, M., McCarthy, T.L., and Madri, J.A.** 1995. Expression of Transforming Growth Factor Type Iii Receptor in Vascular Endothelial Cells Increases Their Responsiveness to Transforming Growth Factor Beta 2. *J Biol Chem* **270**(22): 13567-13572.
- Sapir, A., Assa-Kunik, E., Tsruya, R., Schejter, E., and Shilo, B.Z.** 2005. Unidirectional Notch Signaling Depends on Continuous Cleavage of Delta. *Development* **132**(1): 123-132.
- Satoh, W., Gotoh, T., Tsunematsu, Y., Aizawa, S., and Shimono, A.** 2006. Sfrp1 and Sfrp2 Regulate Anteroposterior Axis Elongation and Somite Segmentation During Mouse Embryogenesis. *Development* **133**(6): 989-999.
- Sauer, B.** 1993. Manipulation of Transgenes by Site-Specific Recombination: Use of Cre Recombinase. *Methods Enzymol* **225**: 890-900.
- .** 1998. Inducible Gene Targeting in Mice Using the Cre/Lox System. *Methods* **14**(4): 381-392.
- Sauer, B. and Henderson, N.** 1988. Site-Specific DNA Recombination in Mammalian Cells by the Cre Recombinase of Bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(14): 5166-5170.
- Sehnet, J.S., Jiang, W., Kumar, S.R., Krasnoperov, V., Trindade, A., Benedito, R., Djokovic, D., Borges, C., Ley, E.J., Duarte, A. et al.** 2007. Inhibition of Dll4 Mediated Signaling Induces Proliferation of Immature Vessels and Results in Poor Tissue Perfusion. *Blood*.
- Schirmacher, V.** 1985. Cancer Metastasis: Experimental Approaches, Theoretical Concepts, and Impacts for Treatment Strategies. *Adv Cancer Res* **43**: 1-73.
- Schnurch, H. and Risau, W.** 1993. Expression of Tie-2, a Member of a Novel Family of Receptor Tyrosine Kinases, in the Endothelial Cell Lineage. *Development* **119**(3): 957-968.
- Schweisguth, F.** 2004. Notch Signaling Activity. *Curr Biol* **14**(3): R129-138.
- Seetharam, L., Gotoh, N., Maru, Y., Neufeld, G., Yamaguchi, S., and Shibuya, M.** 1995. A Unique Signal Transduction from Flt Tyrosine Kinase, a Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor Vegf. *Oncogene* **10**(1): 135-147.
- Semenza, G.L.** 2000. Hif-1 and Human Disease: One Highly Involved Factor. *Genes Dev* **14**(16): 1983-1991.
- Seo, S., Fujita, H., Nakano, A., Kang, M., Duarte, A., and Kume, T.** 2006. The Forkhead Transcription Factors, Foxc1 and Foxc2, Are Required for Arterial Specification and Lymphatic Sprouting During Vascular Development. *Dev Biol*.
- Serini, G., Valdembrì, D., and Bussolino, F.** 2006. Integrins and Angiogenesis: A Sticky Business. *Exp Cell Res* **312**(5): 651-658.
- Sestan, N., Artavanis-Tsakonas, S., and Rakic, P.** 1999. Contact-Dependent Inhibition of Cortical Neurite Growth Mediated by Notch Signaling. *Science* **286**(5440): 741-746.

- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., and Schuh, A.C.** 1995. Failure of Blood-Island Formation and Vasculogenesis in Flk-1-Deficient Mice. *Nature* **376**(6535): 62-66.
- Shao, L., Moloney, D.J., and Haltiwanger, R.** 2003. Fringe Modifies O-Fucose on Mouse Notch1 at Epidermal Growth Factor-Like Repeats within the Ligand-Binding Site and the Abruption Region. *J Biol Chem* **278**(10): 7775-7782.
- Shen, T.L., Park, A.Y., Alcaraz, A., Peng, X., Jang, I., Koni, P., Flavell, R.A., Gu, H., and Guan, J.L.** 2005. Conditional Knockout of Focal Adhesion Kinase in Endothelial Cells Reveals Its Role in Angiogenesis and Vascular Development in Late Embryogenesis. *J Cell Biol* **169**(6): 941-952.
- Shi, C.S., Huang, N.N., Harrison, K., Han, S.B., and Kehrl, J.H.** 2006. The Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Kinase Gckr Positively Regulates Canonical and Noncanonical Wnt Signaling in B Lymphocytes. *Mol Cell Biol* **26**(17): 6511-6521.
- Shibuya, M.** 2006. Differential Roles of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 and Receptor-2 in Angiogenesis. *Journal of biochemistry and molecular biology* **39**(5): 469-478.
- Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsushime, H., and Sato, M.** 1990. Nucleotide Sequence and Expression of a Novel Human Receptor-Type Tyrosine Kinase Gene (Flt) Closely Related to the Fms Family. *Oncogene* **5**(4): 519-524.
- Shih, S.C., Robinson, G.S., Perruzzi, C.A., Calvo, A., Desai, K., Green, J.E., Ali, I.U., Smith, L.E., and Senger, D.R.** 2002. Molecular Profiling of Angiogenesis Markers. *Am J Pathol* **161**(1): 35-41.
- Shima, D.T., Kuroki, M., Deutsch, U., Ng, Y.S., Adamis, A.P., and D'Amore, P.A.** 1996. The Mouse Gene for Vascular Endothelial Growth Factor. Genomic Structure, Definition of the Transcriptional Unit, and Characterization of Transcriptional and Post-Transcriptional Regulatory Sequences. *J Biol Chem* **271**(7): 3877-3883.
- Shima, D.T. and Mailhos, C.** 2000. Vascular Developmental Biology: Getting Nervous. *Curr Opin Genet Dev* **10**(5): 536-542.
- Shirayoshi, Y., Yuasa, Y., Suzuki, T., Sugaya, K., Kawase, E., Ikemura, T., and Nakatsuji, N.** 1997. Proto-Oncogene of Int-3, a Mouse Notch Homologue, Is Expressed in Endothelial Cells During Early Embryogenesis. *Genes Cells* **2**(3): 213-224.
- Shutter, J.R., Scully, S., Fan, W., Richards, W.G., Kitajewski, J., Deblandre, G.A., Kintner, C.R., and Stark, K.L.** 2000. Dll4, a Novel Notch Ligand Expressed in Arterial Endothelium. *Genes Dev* **14**(11): 1313-1318.
- Siekman, A.F. and Lawson, N.D.** 2007. Notch Signalling Limits Angiogenic Cell Behaviour in Developing Zebrafish Arteries. *Nature*.
- Six, E., Ndiaye, D., Laabi, Y., Brou, C., Gupta-Rossi, N., Israel, A., and Logeat, F.** 2003. The Notch Ligand Delta1 Is Sequentially Cleaved by an Adam Protease and Gamma-Secretase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13): 7638-7643.
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D.** 1988. Inhibition of Pluripotential Embryonic Stem Cell Differentiation by Purified Polypeptides. *Nature* **336**(6200): 688-690.
- Smith, J.W., Vestal, D.J., Irwin, S.V., Burke, T.A., and Chersesh, D.A.** 1990. Purification and Functional Characterization of Integrin Alpha V Beta 5. An Adhesion Receptor for Vitronectin. *J Biol Chem* **265**(19): 11008-11013.

- Soares, R., Alcada, M.N., and Azevedo, I.** 2005. Triggering Tgfbeta and Notch Signalling Cross-Talk. *Bioessays* **27**(7): 763.
- Soker, S., Fidler, H., Neufeld, G., and Klagsbrun, M.** 1996. Characterization of Novel Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) Receptors on Tumor Cells That Bind Vegf165 Via Its Exon 7-Encoded Domain. *J Biol Chem* **271**(10): 5761-5767.
- Soker, S., Miao, H.Q., Nomi, M., Takashima, S., and Klagsbrun, M.** 2002. Vegf165 Mediates Formation of Complexes Containing Vegfr-2 and Neuropilin-1 That Enhance Vegf165-Receptor Binding. *J Cell Biochem* **85**(2): 357-368.
- Somerville, R.P., Longpre, J.M., Apel, E.D., Lewis, R.M., Wang, L.W., Sanes, J.R., Leduc, R., and Apte, S.S.** 2004. Adamts7b, the Full-Length Product of the Adamts7 Gene, Is a Chondroitin Sulfate Proteoglycan Containing a Mucin Domain. *J Biol Chem* **279**(34): 35159-35175.
- Sorensen, L.K., Brooke, B.S., Li, D.Y., and Urness, L.D.** 2003. Loss of Distinct Arterial and Venous Boundaries in Mice Lacking Endoglin, a Vascular-Specific Tgfbeta Coreceptor. *Dev Biol* **261**(1): 235-250.
- Soriano, P.** 1999. Generalized Lacz Expression with the Rosa26 Cre Reporter Strain. *Nat Genet* **21**(1): 70-71.
- Spagnuolo, R., Corada, M., Orsenigo, F., Zanetta, L., Deuschle, U., Sandy, P., Schneider, C., Drake, C.J., Breviario, F., and Dejana, E.** 2004. Gas1 Is Induced by Ve-Cadherin and Vascular Endothelial Growth Factor and Inhibits Endothelial Cell Apoptosis. *Blood* **103**(8): 3005-3012.
- Stenvers, K.L., Tursky, M.L., Harder, K.W., Kountouri, N., Amatayakul-Chantler, S., Grail, D., Small, C., Weinberg, R.A., Sizeland, A.M., and Zhu, H.J.** 2003. Heart and Liver Defects and Reduced Transforming Growth Factor Beta2 Sensitivity in Transforming Growth Factor Beta Type Iii Receptor-Deficient Embryos. *Mol Cell Biol* **23**(12): 4371-4385.
- Strickland, L.A., Jubb, A.M., Hongo, J.A., Zhong, F., Burwick, J., Fu, L., Frantz, G.D., and Koeppen, H.** 2005. Plasmalemmal Vesicle-Associated Protein (Plvap) Is Expressed by Tumour Endothelium and Is Upregulated by Vascular Endothelial Growth Factor- α (Vegf). *J Pathol* **206**(4): 466-475.
- Suchting, S., Bicknell, R., and Eichmann, A.** 2006. Neuronal Clues to Vascular Guidance. *Exp Cell Res* **312**(5): 668-675.
- Suchting, S., Freitas, C., le Noble, F., Benedito, R., Breant, C., Duarte, A., and Eichmann, A.** 2007. The Notch Ligand Delta-Like 4 Negatively Regulates Endothelial Tip Cell Formation and Vessel Branching. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Sugimoto, A., Yamamoto, M., Suzuki, M., Inoue, T., Nakamura, S., Motoda, R., Yamasaki, F., and Orita, K.** 2006. Delta-4 Notch Ligand Promotes Erythroid Differentiation of Human Umbilical Cord Blood Cd34+ Cells. *Exp Hematol* **34**(4): 424-432.
- Sullivan, D.C. and Bicknell, R.** 2003. New Molecular Pathways in Angiogenesis. *Br J Cancer* **89**(2): 228-231.
- Sun, X. and Artavanis-Tsakonas, S.** 1997. Secreted Forms of Delta and Serrate Define Antagonists of Notch Signaling in Drosophila. *Development* **124**(17): 3439-3448.
- Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Sato, T.N., and Yancopoulos, G.D.** 1996. Requisite Role of Angiopoietin-1, a Ligand for the Tie2 Receptor, During Embryonic Angiogenesis. *Cell* **87**(7): 1171-1180.

- Takashima, S., Kitakaze, M., Asakura, M., Asanuma, H., Sanada, S., Tashiro, F., Niwa, H., Miyazaki Ji, J., Hirota, S., Kitamura, Y. et al.** 2002. Targeting of Both Mouse Neuropilin-1 and Neuropilin-2 Genes Severely Impairs Developmental Yolk Sac and Embryonic Angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6): 3657-3662.
- Takeyama, K., Aguiar, R.C., Gu, L., He, C., Freeman, G.J., Kutok, J.L., Aster, J.C., and Shipp, M.A.** 2003. The Bal-Binding Protein Bbap and Related Deltex Family Members Exhibit Ubiquitin-Protein Isopeptide Ligase Activity. *J Biol Chem* **278**(24): 21930-21937.
- Talmadge, J.E., Singh, R.K., Fidler, I.J., and Raz, A.** 2007. Murine Models to Evaluate Novel and Conventional Therapeutic Strategies for Cancer. *Am J Pathol* **170**(3): 793-804.
- Tammela, T., Zarkada, G., Wallgard, E., Murtomaki, A., Suchting, S., Wirzenius, M., Waltari, M., Hellstrom, M., Schomber, T., Peltonen, R. et al.** 2008. Blocking Vegfr-3 Suppresses Angiogenic Sprouting and Vascular Network Formation. *Nature*.
- Teicher, B.A.** 2006. Tumor Models for Efficacy Determination. *Mol Cancer Ther* **5**(10): 2435-2443.
- Tran, J., Rak, J., Sheehan, C., Saibil, S.D., LaCasse, E., Korneluk, R.G., and Kerbel, R.S.** 1999. Marked Induction of the Iap Family Antiapoptotic Proteins Survivin and Xiap by Vegf in Vascular Endothelial Cells. *Biochem Biophys Res Commun* **264**(3): 781-788.
- Tsiamis, A.C., Morris, P.N., Marron, M.B., and Brindle, N.P.** 2002. Vascular Endothelial Growth Factor Modulates the Tie-2:Tie-1 Receptor Complex. *Microvascular research* **63**(2): 149-158.
- Tsunematsu, R., Nakayama, K., Oike, Y., Nishiyama, M., Ishida, N., Hatakeyama, S., Bessho, Y., Kageyama, R., Suda, T., and Nakayama, K.I.** 2003. Mouse Fbw7/Sel-10/Cdc4 Is Required for Notch Degradation During Vascular Development. *J Biol Chem*.
- Tyers, M., Haslam, R.J., Rachubinski, R.A., and Harley, C.B.** 1989. Molecular Analysis of Pleckstrin: The Major Protein Kinase C Substrate of Platelets. *J Cell Biochem* **40**(2): 133-145.
- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M.T., Bujard, H., and Hillen, W.** 2000. Exploring the Sequence Space for Tetracycline-Dependent Transcriptional Activators: Novel Mutations Yield Expanded Range and Sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14): 7963-7968.
- Urness, L.D., Sorensen, L.K., and Li, D.Y.** 2000. Arteriovenous Malformations in Mice Lacking Activin Receptor-Like Kinase-1. *Nat Genet* **26**(3): 328-331.
- Uyttendaele, H., Ho, J., Rossant, J., and Kitajewski, J.** 2001. Vascular Patterning Defects Associated with Expression of Activated Notch4 in Embryonic Endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(10): 5643-5648.
- Uyttendaele, H., Marazzi, G., Wu, G., Yan, Q., Sassoon, D., and Kitajewski, J.** 1996. Notch4/Int-3, a Mammary Proto-Oncogene, Is an Endothelial Cell-Specific Mammalian Notch Gene. *Development* **122**(7): 2251-2259.
- van Gijn, M.E., Blankesteyn, W.M., Smits, J.F., Hierck, B., and Gittenberger-de Groot, A.C.** 2001. Frizzled 2 Is Transiently Expressed in Neural Crest-Containing Areas During Development of the Heart and Great Arteries in the Mouse. *Anatomy and embryology* **203**(3): 185-192.
- van Kempen, M.J. and Jongsma, H.J.** 1999. Distribution of Connexin37, Connexin40 and Connexin43 in the Aorta and Coronary Artery of Several Mammals. *Histochem Cell Biol* **112**(6): 479-486.

- Varnum-Finney, B., Purton, L.E., Yu, M., Brashem-Stein, C., Flowers, D., Staats, S., Moore, K.A., Le Roux, I., Mann, R., Gray, G. et al.** 1998. The Notch Ligand, Jagged-1, Influences the Development of Primitive Hematopoietic Precursor Cells. *Blood* **91**(11): 4084-4091.
- Vassen, L., Fiolka, K., and Moroy, T.** 2006. Gfi1b Alters Histone Methylation at Target Gene Promoters and Sites of Gamma-Satellite Containing Heterochromatin. *Embo J* **25**(11): 2409-2419.
- Veikkola, T., Karkkainen, M., Claesson-Welsh, L., and Alitalo, K.** 2000. Regulation of Angiogenesis Via Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Cancer Res* **60**(2): 203-212.
- Villa, N., Walker, L., Lindsell, C.E., Gasson, J., Iruela-Arispe, M.L., and Weinmaster, G.** 2001. Vascular Expression of Notch Pathway Receptors and Ligands Is Restricted to Arterial Vessels. *Mech Dev* **108**(1-2): 161-164.
- Vogel, W.F., Aszodi, A., Alves, F., and Pawson, T.** 2001. Discoidin Domain Receptor 1 Tyrosine Kinase Has an Essential Role in Mammary Gland Development. *Mol Cell Biol* **21**(8): 2906-2917.
- von Tell, D., Armulik, A., and Betsholtz, C.** 2006. Pericytes and Vascular Stability. *Exp Cell Res* **312**(5): 623-629.
- Vooijs, M., Schroeter, E.H., Pan, Y., Blandford, M., and Kopan, R.** 2004. Ectodomain Shedding and Intramembrane Cleavage of Mammalian Notch Proteins Is Not Regulated through Oligomerization. *J Biol Chem* **279**(49): 50864-50873.
- Wagner, D.D., Urban-Pickering, M., and Marder, V.J.** 1984. Von Willebrand Protein Binds to Extracellular Matrices Independently of Collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(2): 471-475.
- Wakimoto, K., Kobayashi, K., Kuro, O.M., Yao, A., Iwamoto, T., Yanaka, N., Kita, S., Nishida, A., Azuma, S., Toyoda, Y. et al.** 2000. Targeted Disruption of Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Gene Leads to Cardiomyocyte Apoptosis and Defects in Heartbeat. *J Biol Chem* **275**(47): 36991-36998.
- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., and Heldin, C.H.** 1994. Different Signal Transduction Properties of Kdr and Flt1, Two Receptors for Vascular Endothelial Growth Factor. *J Biol Chem* **269**(43): 26988-26995.
- Wang, H., Gilner, J.B., Bautch, V.L., Wang, D.Z., Wainwright, B.J., Kirby, S.L., and Patterson, C.** 2007. Wnt2 Coordinates the Commitment of Mesoderm to Hematopoietic, Endothelial, and Cardiac Lineages in Embryoid Bodies. *J Biol Chem* **282**(1): 782-791.
- Wang, H.U., Chen, Z.F., and Anderson, D.J.** 1998. Molecular Distinction and Angiogenic Interaction between Embryonic Arteries and Veins Revealed by Ephrin-B2 and Its Receptor Eph-B4. *Cell* **93**(5): 741-753.
- Wang, J.F., Zhang, X., and Groopman, J.E.** 2004. Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 and Its Downstream Signaling Promote Cell Survival under Oxidative Stress. *J Biol Chem* **279**(26): 27088-27097.
- Wang, S., Sdrulla, A.D., diSibio, G., Bush, G., Nofziger, D., Hicks, C., Weinmaster, G., and Barres, B.A.** 1998. Notch Receptor Activation Inhibits Oligodendrocyte Differentiation. *Neuron* **21**(1): 63-75.
- Wang, W. and Struhl, G.** 2005. Distinct Roles for Mind Bomb, Neuralized and Epsin in Mediating Dsl Endocytosis and Signaling in Drosophila. *Development* **132**(12): 2883-2894.

- Ward, N.L. and Dumont, D.J.** 2002. The Angiopoietins and Tie2/Tek: Adding to the Complexity of Cardiovascular Development. *Semin Cell Dev Biol* **13**(1): 19-27.
- Waterston, R.H. Lindblad-Toh, K. Birney, E. Rogers, J. Abril, J.F. Agarwal, P. Agarwala, R. Ainscough, R. Alexandersson, M. An, P. et al.** 2002. Initial Sequencing and Comparative Analysis of the Mouse Genome. *Nature* **420**(6915): 520-562.
- Weinmaster, G.** 2000. Notch Signal Transduction: A Real Rip and More. *Curr Opin Genet Dev* **10**(4): 363-369.
- Wendland, B.** 2002. Epsins: Adaptors in Endocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(12): 971-977.
- Whitaker, G.B., Limberg, B.J., and Rosenbaum, J.S.** 2001. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 and Neuropilin-1 Form a Receptor Complex That Is Responsible for the Differential Signaling Potency of Vegf(165) and Vegf(121). *J Biol Chem* **276**(27): 25520-25531.
- Whitten, W.K.** 1957. Culture of Tubal Ova. *Nature* **179**(4569): 1081-1082.
- Wieser, R., Wrana, J.L., and Massague, J.** 1995. Gs Domain Mutations That Constitutively Activate T Beta R-I, the Downstream Signaling Component in the Tgf-Beta Receptor Complex. *Embo J* **14**(10): 2199-2208.
- Wilkin, M.B. and Baron, M.** 2005. Endocytic Regulation of Notch Activation and Down-Regulation (Review). *Mol Membr Biol* **22**(4): 279-289.
- Willert, K. and Jones, K.A.** 2006. Wnt Signaling: Is the Party in the Nucleus? *Genes Dev* **20**(11): 1394-1404.
- Williams, C.K., Li, J.L., Murga, M., Harris, A.L., and Tosato, G.** 2006. Up-Regulation of the Notch Ligand Delta-Like 4 Inhibits Vegf-Induced Endothelial Cell Function. *Blood* **107**(3): 931-939.
- Williams, M.J., Lowrie, M.B., Bennett, J.P., Firth, J.A., and Clark, P.** 2005. Cadherin-10 Is a Novel Blood-Brain Barrier Adhesion Molecule in Human and Mouse. *Brain research* **1058**(1-2): 62-72.
- Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., and Gough, N.M.** 1988. Myeloid Leukaemia Inhibitory Factor Maintains the Developmental Potential of Embryonic Stem Cells. *Nature* **336**(6200): 684-687.
- Wood, S.A., Allen, N.D., Rossant, J., Auerbach, A., and Nagy, A.** 1993. Non-Injection Methods for the Production of Embryonic Stem Cell-Embryo Chimaeras. *Nature* **365**(6441): 87-89.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massague, J.** 1994. Mechanism of Activation of the Tgf-Beta Receptor. *Nature* **370**(6488): 341-347.
- Wright, M.D., Ni, J., and Rudy, G.B.** 2000. The L6 Membrane Proteins--a New Four-Transmembrane Superfamily. *Protein Sci* **9**(8): 1594-1600.
- Xu, A., Lei, L., and Irvine, K.D.** 2005. Regions of Drosophila Notch That Contribute to Ligand Binding and the Modulatory Influence of Fringe. *J Biol Chem* **280**(34): 30158-30165.
- Xue, Y., Gao, X., Lindsell, C.E., Norton, C.R., Chang, B., Hicks, C., Gendron-Maguire, M., Rand, E.B., Weinmaster, G., and Gridley, T.** 1999. Embryonic Lethality and Vascular Defects in Mice Lacking the Notch Ligand Jagged1. *Hum Mol Genet* **8**(5): 723-730.
- Yamagishi, H., Olson, E.N., and Srivastava, D.** 2000. The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor, Dhand, Is Required for Vascular Development. *J Clin Invest* **105**(3): 261-270.

- Yamashiro, S., Yamakita, Y., Ono, S., and Matsumura, F.** 1998. Fascin, an Actin-Bundling Protein, Induces Membrane Protrusions and Increases Cell Motility of Epithelial Cells. *Mol Biol Cell* **9**(5): 993-1006.
- Yamashita, J., Itoh, H., Hirashima, M., Ogawa, M., Nishikawa, S., Yurugi, T., Naito, M., and Nakao, K.** 2000. Flk1-Positive Cells Derived from Embryonic Stem Cells Serve as Vascular Progenitors. *Nature* **408**(6808): 92-96.
- Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., and Holash, J.** 2000. Vascular-Specific Growth Factors and Blood Vessel Formation. *Nature* **407**(6801): 242-248.
- Yang, J.T., Rayburn, H., and Hynes, R.O.** 1995. Cell Adhesion Events Mediated by Alpha 4 Integrins Are Essential in Placental and Cardiac Development. *Development* **121**(2): 549-560.
- Yang, L.T., Nichols, J.T., Yao, C., Manilay, J.O., Robey, E.A., and Weinmaster, G.** 2005. Fringe Glycosyltransferases Differentially Modulate Notch1 Proteolysis Induced by Delta1 and Jagged1. *Mol Biol Cell* **16**(2): 927-942.
- Yoneya, T., Tahara, T., Nagao, K., Yamada, Y., Yamamoto, T., Osawa, M., Miyatani, S., and Nishikawa, M.** 2001. Molecular Cloning of Delta-4, a New Mouse and Human Notch Ligand. *J Biochem (Tokyo)* **129**(1): 27-34.
- You, L.R., Lin, F.J., Lee, C.T., DeMayo, F.J., Tsai, M.J., and Tsai, S.Y.** 2005. Suppression of Notch Signalling by the Coup-Tfii Transcription Factor Regulates Vein Identity. *Nature* **435**(7038): 98-104.
- Yuan, L., Moyon, D., Pardanaud, L., Breant, C., Karkkainen, M.J., Alitalo, K., and Eichmann, A.** 2002. Abnormal Lymphatic Vessel Development in Neuropilin 2 Mutant Mice. *Development* **129**(20): 4797-4806.
- Yuan, W., Zhou, L., Chen, J.H., Wu, J.Y., Rao, Y., and Ornitz, D.M.** 1999. The Mouse Slit Family: Secreted Ligands for Robo Expressed in Patterns That Suggest a Role in Morphogenesis and Axon Guidance. *Dev Biol* **212**(2): 290-306.
- Yun, T.J. and Bevan, M.J.** 2003. Notch-Regulated Ankyrin-Repeat Protein Inhibits Notch1 Signaling: Multiple Notch1 Signaling Pathways Involved in T Cell Development. *J Immunol* **170**(12): 5834-5841.
- Zachary, I.** 2003. Vegf Signalling: Integration and Multi-Tasking in Endothelial Cell Biology. *Biochem Soc Trans* **31**(Pt 6): 1171-1177.
- Zeng, H., Zhao, D., and Mukhopadhyay, D.** 2002. Kdr Stimulates Endothelial Cell Migration through Heterotrimeric G Protein Gq/11-Mediated Activation of a Small Gtpase RhoA. *J Biol Chem* **277**(48): 46791-46798.
- Zhang, X., Gaspard, J.P., and Chung, D.C.** 2001. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by the Wnt and K-Ras Pathways in Colonic Neoplasia. *Cancer Res* **61**(16): 6050-6054.
- Zheng, B., Sage, M., Sheppard, E.A., Jurecic, V., and Bradley, A.** 2000. Engineering Mouse Chromosomes with Cre-Loxp: Range, Efficiency, and Somatic Applications. *Mol Cell Biol* **20**(2): 648-655.
- Zheng, C., Heintz, N., and Hatten, M.E.** 1996. Cns Gene Encoding Astrotactin, Which Supports Neuronal Migration Along Glial Fibers. *Science* **272**(5260): 417-419.
- Zhong, T.P., Childs, S., Leu, J.P., and Fishman, M.C.** 2001. Gridlock Signalling Pathway Fashions the First Embryonic Artery. *Nature* **414**(6860): 216-220.

- Zilian, O., Saner, C., Hagedorn, L., Lee, H.Y., Sauberli, E., Suter, U., Sommer, L., and Aguet, M.** 2001. Multiple Roles of Mouse Numb in Tuning Developmental Cell Fates. *Curr Biol* **11**(7): 494-501.
- Zimmer, M., Palmer, A., Kohler, J., and Klein, R.** 2003. Ephb-Ephrinb Bi-Directional Endocytosis Terminates Adhesion Allowing Contact Mediated Repulsion. *Nat Cell Biol* **5**(10): 869-878.

Anexo I – Meios e soluções

I.1 - Meios de Cultura

I.1.1 - Meios de cultura líquidos para microbiologia

- **LB: Luria Bertani broth.** Adicionar 10g de bactotripton (Biokar Diagnostics A1401HA) (1% p/v), 5g de extracto de levedura (Biokar Diagnostics A1202HA) (0,5% p/v) e 5g de NaCl (85mM) a água destilada para um volume final de 1L. Acertar o pH a 7.0 com NaOH 5N (Sigma S5881) e esterilizar autoclavando 20min a 121°C.

Preparação comercial = LB broth base, usada a 20g/L; (Sigma # L-3022)

- **TB: Terrific broth.** Adicionar 12g de bactotripton (1,2% p/v), 24g de extracto de levedura (2,4% p/v), 4 ml de glicerol (Sigma G9012) (0,4% v/v) a água destilada para um volume final de 900mL. Em seguida deve-se esterilizar por autoclavagem, deixar arrefecer até à temperatura ambiente e depois adicionar 100mL de tampão de fosfatos autoclavado e arrefecido, composto por KH₂PO₄ 17mM e K₂HPO₄ 72mM; o pH final deve ser entre 6,8 e 7,2.

Preparação comercial = EzmixTM Terrific Broth (Sigma T9179), usado a 47,6g/L com glicerol a 0,8% (v/v), (Sigma # T-9179).

- **SOB.** Adicionar 20g de bactotripton (2% p/v), 50g de extracto de levedura (5% p/v), 10mL de NaCl 1M (10mM), 2,5mL de KCl 1M (2,5mM), 10mL de MgCl₂ 1M (10mM) e 10mL de MgSO₄ 0,5M (5mM) a água destilada para um volume final de 1L. O pH final deve se situar entre 6,8 e 7,2. Esterilizar por autoclavagem.

- **SOC.** O meio SOC é idêntico ao SOB, com a excepção de conter 20mM de glucose (Sigma G8270).

Após o meio SOB ter sido autoclavado deixa-se arrefecer até aos 60°C e adiciona-se 20mL de uma solução estéril de glucose 1M (18g de glucose em 90mL de água destilada – desionizada MQ. Após a dissolução do açúcar ajusta-se o volume para 10mL com água destilada e esteriliza-se por filtração através de um filtro 0,22µm)

I.1.2 - Meios de cultura sólidos para microbiologia

- **LB-agar:** Adicionar 15g de bacto-agar a 1L de meio LB líquido. Esterilizar por autoclavagem.

Preparação comercial = LB-agar, usado a 35g/L (Sigma # L-2897).

-**LB-agar com ampicilina:** Adicionar ampicilina (Sigma #A-9518) a LB-agar, após este ter arrefecido a 55°C, para uma concentração final de 100µg/mL.

I.1.3 – Meios de cultura para células eucariotas

I.1.3.1 - Meio de cultura para culturas primárias de fibroblastos embrionários.

A tabela seguinte descreve os vários constituintes que são misturados para fazer o meio para culturas primárias de fibroblastos embrionários (PEF):

	Referência	% do volume final
DMEM *	Gibco BRL #41965-039	
L-glutamina 100x	Gibco BRL #25030-024	1%
Penicilina/streptomicina 100x	Gibco BRL #15140-122	1%
Piruvato de sódio 100mM	Gibco BRL #11360-039	1mM
β-mercaptoetanol	Gibco BRL #31350-02	0.2%

*DMEM = Dulbecco's Modified Eagle medium

O DMEM é um meio de cultura com tampão bicarbonato concebido para ter um pH 7,2-7,4 numa atmosfera com 5% de CO₂ e 95% de ar.

Antes de ser usado é adicionado de **Soro Fetal Bovino** (Gibco BRL #16060-044) para uma concentração final de cerca de 15-17% (v/v). Antes de se adicionar o Soro fetal bovino, este tem de ser inativado pelo calor, bastando para tal colocá-lo num banho-maria a 57°C durante 30 minutos.

1.1.3.2 - Meio de cultura para células estaminais embrionárias

A base do meio é a mesma que o usado para cultura de PEFs, com as seguintes alterações:

-usou-se **soro fetal bovino** da empresa **HyClone** (SH30070.02 Lote nº ALK14879) na maioria das actividades (excepção notada nos resultados e discussão). Nas outras experiências usou-se o soro fetal bovino (Gibco), referido acima. A proporção de soro usada na produção do meio é a mesma que para o meio de PEFs.

-adiciona-se 7,5µL de **LIF** (*leukemia inhibitory factor*, 120µg/mL) a cada 50 ml de meio. A LIF é produzida no laboratório, extraída de uma estirpe de BL21 transformada com o plasmídeo pGEXmLIF. A LIF é uma citoquina polipeptídica secretada que inibe a diferenciação das CEE (Smith, *et al.*, 1988, Williams, *et al.*, 1988). Esta é produzida pelas linhas primárias de fibroblastos mitoticamente inactivados (células *feeder*) sobre as quais crescem as culturas de CEE. No entanto é regra comum suplementar o meio com LIF mesmo na presença de células *feeder*.

-adiciona-se 6mL de **Aminoácidos não essenciais** (100x) (Gibco BRL #11140-050), ficando a 1% do volume final.

1.1.3.3 - Meio de congelamento de células estaminais embrionárias.

Meio de congelamento de CEE é normalmente preparado 2x concentrado. Adiciona-se 38% do volume final em Soro fetal bovino e 20% do volume final em DMSO a Meio de cultura de CEE.

1.1.3.4 - Meio KSOM, para cultura de embriões em fase de pré-implantação

Este é um meio de cultura de embriões, é usado em vez de meios comerciais equivalentes como o M16 e o Brintster's Medium (também existe KSOM como preparação comercial). Segundo testes efectuados no laboratório do Doutor Andras Nagy, Mount Sinai Hospital, Toronto, o uso deste meio aumenta a viabilidade das quimeras de agregação, em relação ao uso do meio M16.

Os embriões de fase de pré-implantação até oito células não utilizam a glucose eficientemente e necessitam de piruvato e lactato com fontes de energia (Iyengar *et al.*, 1983).

Por outro lado estes não necessitam de aminoácidos, vitaminas ou soro fetal bovino. Normalmente adiciona-se albumina de soro bovino (BSA) para reduzir a capacidade de aderência a superfícies dos embriões.

Este meio não pode ser armazenado no frigorífico por mais do que 2 semanas. Este é produzido a partir de 6 soluções *stock*:

I.1.3.4.1 - Stock A (10x) (100mL)

É composto por:

	Concentração	Peso molecular	Massa
NaCl	950mM	58.44g/mol	5.55g
KCl	25 mM	74.55g/mol	0.186g
KH₂PO₄	3.5 mM	136.09g/mol	0.047g
MgSO₄.7H₂O	2.0 mM	246.47g/mol	0.0493g
Lactato de Sódio	100 mM	112.10g/mol	1.87g de um stock a 60%
D (+) glucose	2.0 mM	180.20g/mol	0.036g
Penicilina-G	600µg/mL	-	0.06g
Sulfato de streptomicina	500µg/mL	-	0.05g

Congela-se em alíquotas de 10mL.

I.1.3.4.2 - Stock B (10x) (100mL)

É composto por:

	Concentração	Peso molecular	Massa
NaHCO₃	250mM	84.01g/mol	2.10g
Vermelho de Fenol			0.001g ou 1mL de solução a 1%

Congela-se em alíquotas de 10mL.

1.1.3.4.3 - Stock C (100x) (10mL)

É composto por:

	Concentração	Peso molecular	Massa
Piruvato de Sódio	20mM	110.0g/mol	0.022g

Congela-se em alíquotas de 1mL.

1.1.3.4.4 - Stock D (100x) (10mL)

É composto por:

	Concentração	Peso molecular	Massa
CaCl₂.2H₂O	17.1mM	147.02g/mol	0.25g

Congela-se em alíquotas de 1mL.

1.1.3.4.5 - Stock F (100x) (100mL)

É composto por:

	Concentração	Peso molecular	Massa
Na₂EDTA.2H₂O	100mM	372.24g/mol	0.0372g

Congela-se em alíquotas de 1mL.

1.1.3.4.6 - Stock G (200x)

É composto por:

	Concentração	Peso molecular	Massa
Glutamina (Gibco #320-1140AG)	200mM		

Congela-se em alíquotas de 0,5mL.

I.1.3.4.7 - Produção do meio KSOM

Misturam-se os seguintes volumes das respectivas soluções stock, para produzir 100mL de meio KSOM:

Solução Stock	Volume
10x Stock A	10mL
10x Stock B	10mL
100x Stock C	1mL
100x Stock D	1mL
100x Stock F	1mL
200x Stock G	0,5mL
BSA sólido (Sigma A4378)	0,10g
SDW	Adiciona-se água até perfazer 100mL.

O meio é agitado suavemente para não criar espuma e em seguida é colocado na incubadora a 37°C, 5%CO₂ para equilibrar o pH a 7,4. Para tal basta deixá-lo na incubadora durante 1 noite, numa garrafa com tampa semi-aberta. A esterilização é feita por passagem em filtro de 0,22µm, alíquota-se em tubos de polipropileno e guarda-se no frigorífico por não mais de 2 semanas.

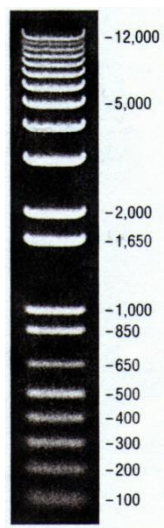
I.4 - Armazenamento de clones bacterianos

Os clones bacterianos contendo os plasmídeos de interesse foram armazenados a curto prazo (até três semanas) em placas de LB-amp a 4°C e a longo prazo em *stocks* de glicerol 15% a -80°C.

I.5 - Marcadores de pesos moleculares para ADNds

- **1kb+ ADN LadderTM** (Gibco # 10787-026): Consiste de 19 bandas, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.65, 0.85, 1.0, 1.65, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 e 12.0kb. Este marcador de pesos moleculares é ideal para a determinação da concentração de fragmentos lineares de ADN em dupla cadeia pois sabe-se que a banda de 1.65kb contém 50ng de ADN quando se aplicam 5µL deste marcador de pesos moleculares.

Figura 93 - Resultado de uma electroforese do marcador de pesos moleculares “1kb+ ADN Ladder”. Ao lado estão referidos os pesos moleculares de cada banda em pb.



- **Kilobase ADN Marker** (Pharmacia #27-4004-01): Consiste de 11 bandas, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 8,0 e 10,0kb num gel de agarose a 0,8%. A banda de 1Kb é três vezes mais intensa que as outras.

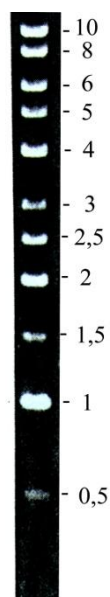


Figura 94 - Resultado de uma electroforese do marcador de pesos moleculares “Kilobase ADN Marker”. Ao lado estão referidos os pesos moleculares de cada banda em kb.

A partir das soluções *stock* foram feitas solução de trabalho. Estas consistiam de uma solução de uma diluição 1:5 da solução *stock* de *ADN Ladder* (0,2µg/µl final) em água desionizada, com 1/10 do volume final em tampão de amostra.

I.6 - Enzimas de restrição

Designação	Local de clivagem
<i>AscI</i>	<pre> 5'.. G G C G C G C C 3'.. 3'.. C C G C G C G G 5'.. ↓ ↑ </pre>
<i>BamHI</i>	<pre> 5'.. G G A T C C 3'.. 3'.. C C T A G G 5'.. ↓ ↑ </pre>
<i>BsaI</i>	<pre> 5'.. G G T C T C N N N N N 3'.. 3'.. C C A G A G N N N N N 5'.. ↓ ↑ </pre>
<i>EcoRI</i>	<pre> 5'.. G A A T T C 3'.. 3'.. C T T A A G 5'.. ↓ ↑ </pre>
<i>EcoRV</i>	<pre> 5'.. G A T A T C 3'.. 3'.. C T A T A G 5'.. ↓ ↑ </pre>
<i>SalI</i>	<pre> 5'.. G T C G A C 3'.. 3'.. C A G C T G 5'.. ↓ ↑ </pre>
<i>SfiI</i>	<pre> 5'.. G G C C N N N N N G G C C 3'.. 3'.. C C G G N N N N N C C G G 5'.. ↓ ↑ </pre>
<i>XbaI</i>	<pre> 5'.. T C T A G A 3'.. 3'.. A G A T C T 5'.. ↓ ↑ </pre>
<i>XhoI</i>	<pre> 5'.. C T C G A G 3'.. 3'.. G A G C T C 5'.. ↓ ↑ </pre>

Nota: N = A, C, G ou T

I.7 - Soluções

I.7.1 - Tampão de Electroforese

-**TAE**: Este foi usado como solução base à qual se adiciona a agarose em pó para fazer o gel e como tampão de electroforese usado na tina de electroforese. A solução de trabalho é feita a partir de uma solução *stock* concentrada a 50x. A solução *stock* 50x é feita adicionando 242g de Tris-base (Sigma T-6066), 57,1mL de ácido acético glacial e 100mL de EDTA 0,5M pH8.0 a água desionizada para um volume final de 1L.

I.7.2 - Tampão TE

Adiciona-se 1mL de uma solução com 1M de Tampão Tris, pH 8,0 e 20 μ L de uma solução 0,5M de EDTA, pH 8,0 a água desionizada, para um volume final de 100mL. A solução final de 10mM de Tampão Tris e 1mM de EDTA, e pH 8,0.

I.7.3 - PBS (“phosphate-buffered saline”)

Adiciona-se 8g de NaCl, 0,2g de KCl, 1,44g de NaHPO₄ e 0,24g de KH₂PO₄ a 800mL de água desionizada. Ajusta-se o pH a 7,4 com HCl e adiciona-se água desionizada até ao volume final de 1L. Esteriliza-se autoclavando a 121°C durante 20 minutos.

I.7.4 - Soluções para coloração com X-Gal

I.7.4.1 - Tampão NaPO₄ 0,1M (500mL)

Adiciona-se 11,5mL de uma solução 1M de Na₂HPO₄ e 38,5mL de uma solução 1M de NaH₂PO₄ a 450ml de água desionizada.

I.7.4.2 - Solução de fixação (50mL)

Adiciona-se 0,4mL de glutaraldeído 25% (Merck #S28319-929), 1mL de uma solução a 0,25M de EGTA com pH7.3 e 5mL de uma solução 1M de MgCl₂ a 43,5mL de Tampão NaPO₄ 0,1M.

1.7.4.3 - Tampão de lavagem (500mL)

Adiciona-se 1mL de uma solução 1M de MgCl₂, 5mL de uma solução a 1%(v/v) de Deoxicolato de Sódio (Sigma #D-4297) e 5mL de uma solução a 2%(v/v) de Nonidet-P40 (Sigma #I-3021) a 489mL de Tampão NaPO₄ 0,1M.

1.7.4.4 - Solução de coloração com X-Gal(75mL)

Adiciona-se 0,159g de ferrocianida de potássio, 0,123g de ferricianida de potássio e 3mL de uma solução com 25mg/mL de X-Gal (Bioline #Bio-37035) em DMF (dimetil formamida) a 72mL de Tampão de Lavagem.

1.7.4.5 - Solução com 25mg/mL de X-Gal

5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido; é um substrato da β-galactosidase que quando clivado por esta forma um precipitado azul.

1.7.5 - Avertina

Para anestésiar as fêmeas pseudo-gestantes, durante a implantação de embriões, usámos o anestésico tribomoetanol, também conhecido por avertina. Este anestésico actua rapidamente, entre dois a cinco minutos depois da injeção intraperitoneal, e produz uma boa analgesia cirúrgica durante 40 a 90 minutos com bom relaxamento da musculatura esquelética e apenas um grau moderado de depressão respiratória.

1.7.5.1 - Stock 100% de avertina

A solução de tribomoetanol é preparada dissolvendo 10g de 2,2,2 Tribomoetanol (Aldrich T4,840-2) em 10ml de 2-metil-2-butanol (Aldrich 24,048-6), a 40°C, com agitação. Depois de o tribomoetanol estar dissolvido, a solução é filtrada em filtro Millipore de 0,5μm. Esta solução é armazenada a 4°C, em recipiente protegido da luz. O tribomoetanol é estável durante duas semanas, sendo que a partir desse momento se proporciona a degradação do

tribomoetanol em dibromoacetaldeído e ácido hidrobromico, que são associados a efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos.

1.7.5.2 - Solução de trabalho de Avertina (2,5%)

Dilui-se a solução stock a 100% em volume apropriado de PBS para uma concentração final de 2,5%. Agita-se vigorosamente até este se dissolver. Normalmente injecta-se 0,5ml de solução de tribomoetanol por animal de 25g, que corresponde a uma dose de 250mg/Kg.

1.7.6 - FSB

Esta solução é usada no protocolo de indução de competência. É uma solução que contém catiões di- e multi-valentes, especialmente à base de Ca^{2+} .

Adiciona-se 10mL de uma solução com 1M de Acetato de Potássio, pH 7,5, 8,91g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,47g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 7,46g de KCl, 0,80g de cloreto de hexaminocobalto e 100mL de glicerol a 800mL de água desionizada. Depois dos componentes estarem dissolvidos ajusta-se o pH a 6,4 com 0,1N de HCl. Em seguida ajusta-se o volume final a 1L com água desionizada. Esteriliza-se a solução passando-a por um filtro de 0,45 μm . Aliquota-se a solução em frascos estéreis de 40mL e guarda-se a solução a 4°C.

1.7.7 - Soluções de in situ em criosecções

Solução de sais concentrada 10x:

11.4 g NaCl (Sigma S3014)
1.404 g Tris HCl pH 7.5 (Sigma T5941)
13.4 g Tris base (Sigma T6066)
7.8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Fluka 71507)
7.1 g Na_2HPO_4 (Fluka 71643)
10 ml .5 M EDTA

Adicionar água destilada até perfazer 100ml e filtrar com poro de 0,2 μm (Pall Acrodisc 25mm filtre 0,2 μm Supor membrane).

Solução de hibridação:

(Concentração final)	1 mL	10 mL	20 mL
10x sais (1x)	100uL	1mL	2mL
Formamida desionizada (50%)	500uL	5mL	10mL
50% sulfato de dextrano (Sigma D8906) (10%)	200uL	2mL	4 mL
ARN de levedura (Sigma R6625) (1mg/mL)	100uL	1mL	2 mL
100x Denhardt's (Sigma D2532) (1x)	10uL	100uL	200 uL
ddH ₂ O	90uL	900uL	1.8mL

TBST:

150mM NaCl

10mM KCl (Merck 1.04936.0250)

50mM Tris pH 7,5

0.1% Tween-20 (Sigma P9416)

NTMT :

5M NaCl	1mL
2M TrisHCl pH9,5	2,5mL
2M MgCl ₂ (Fluka 63068)	1,25mL
10% Tween-20	5mL
H ₂ O	40,25mL
Total =	50mL

1.7.8 - Soluções de imunohistoquímica e imunofluorescência**DAPI:**

Adiciona-se 5mg DAPI dilactato (Sigma D-9564) a 50ml água bidestilada e agita-se a solução, com agitador magnético, durante 60 minutos. Filtra-se a solução com filtro de poro 0,22µm e guarda-se a -20°C em alíquotas de 500µl.

Mowiol

Misturam-se 6g de glicerol, 2,4g de Mowiol 4-88 (Calbiochem 475904), 6ml de água bidestilada e 12ml de 0,2M Tris-HCl pH8,5 e coloca-se esta mistura a agitar durante seis horas. Em seguida deixa-se a mistura repousar durante duas horas. Depois coloca-se a mistura

a 50°C durante dez minutos e centrifuga-se a mistura a 5000g durante 15 minutos. Após a centrifugação aliquota-se o sobrenadante e guarda-se a -20°C até ser usado.

1.7.9 - Soluções de BrdU

Solução de BrdU:

Dilui-se 100mg de BrdU em 8ml de PBS e 56µl de 1M NaOH e mistura-se até o BrdU entrar em solução. Congela-se a solução a -20°C, em alíquotas, até ser usado.

1.7.10 - Soluções de hibridação in situ de embriões in toto

Mistura de hibridação:

	Concentração Final	Para 50mL
Formamida	50%	25mL
SSC (20x, pH5, c/ ác. cítrico)	1,3xSSC	3,25mL
EDTA (0,5M, pH8)	5mM	0,5mL
ARN de levedura (20mg/mL)	50µg/mL	125µL
Tween-20 (10%)	0,2%	1mL
CHAPS (Sigma C5070) (10%)	0,5%	2,5mL
Heparina (Sigma H9399) (50mg/mL)	100µg/mL	100µL
H ₂ O		17,5mL

TBST (pode fazer-se solução concentrada 10x):

150mM NaCl
 10mM KCl
 50mM Tris pH 7,5
 1% Twen-20

NTMT:

5M NaCl	1mL
2M TrisHCl pH9,5	2,5mL
2M MgCl ₂	1,25mL
10% Tween-20	5mL
H ₂ O	40,25mL
Total =	50mL

Anexo II - Sequências de oligonucleótidos iniciadores

II.1 - Sequências de oligonucleótidos iniciadores usados em reacções de PCR:

Nome	Sequência oligonucleotídica	Programa	Amplicação	Linhas transgênicas
tet_Dll4_L	5' - ATCCACGCTGTTTTGACCTC - 3'	1	500pb	TetO7-Dll4
tet_Dll4_R	5' - GTGGAGACATTGCCAAAGGT - 3'			
Cre313U	5' - CCAGCTAAACATGCTTCATC - 3'	2	400pb	Cre
Cre6831	5' - CGCTCGACCAGTTTAGTTAC - 3'			
HH FW1	5' CACTGGCGTGGTCTGGACACCA 3'	3	200pb	Tie2-rtTA
M2 REV2	5' CCACCTGGTCCTGTCCAGGTAC 3'			
ROSA26R 1	5'-AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT-3'	4	550pb - WT	ROSA26R
ROSA26R 2	5'-GCGAAGAGTTTGTCTCAACC-3'		300pb – ROSA26R	
ROSA26R 3	5'-GGAGCGGGAGAAATGGATATG-3'			
iZEG L	5' - ACGTAAACGGCCACAAGTTC - 3'	2	300pb	Z/EG-Dll4
iZEG R	5' - AAGTCGTGCTGCTTCATGTG - 3'			

II.2 - Sequências de oligonucleótidos iniciadores usados em reacções de PCR em tempo real:

Nome	Sequência oligonucleotídica	Programa	Gene
Dll4 – F	5' GGAACCTTCTCACTCAACATCC 3'	5	<i>dll4</i>
Dll4 – R	5' CTCGTCTGTTTCGCCAAATCT 3'		
VEGFR-2 – F	5' GGCGGTGGTGGACAGTATCTT 3'	5	<i>vegfr-2</i>
VEGFR-2 – R	5' GAGGCGATGAATGGTGATCT 3'		
VEGFR1 – F	5' GACCCTCTTTTGGCTCCTTC 3'	5	<i>vegfr-1</i>
VEGFR1 – R	5' CAGTCTCTCCCGTGCAAAC 3'		
VEGFA – F	5' GGAGAGCAGAAGTCCCATGA 3'	5	<i>vegfa</i>
VEGFA – R	5' ACACAGGACGGCTTGAAGAT 3'		
Hey1 – F	5' CACCTGAAAATGCTGCACAC 3'	5	<i>hey1</i>
Hey1 – R	5' ATGCTCAGATAACGGGCAAC 3'		
Hey2 – F	5' TGCCAAGTTAGAAAAGGCTGA 3'	5	<i>hey2</i>
Hey2 – R	5' CACTCTCGGAATCCAATGCT 3'		
Cx37 – F	5' ACGGTCGTCCCCTCTACCT 3'	5	<i>connexin37</i>
Cx37 - R	5' GTCGAGTGTTCTGGACCTG 3'		
EPHB4 R2	5' GGTGTAGCCACCCTTCAGAG 3'	5	<i>eph-B4</i>

EPHB4 F2	5' GATCCTCACGGAATTCATGG 3'		
beta-actin Fwd	5' TGTTACCAACTGGGACGACA 3'	5	<i>beta-actina</i>
beta-actin Rev	5' GGGGTGTTGAAGGTCTCAA 3'		
Cola1 - F	5' TCAAGAGCCTGAGTCAGCAG 3'	5	<i>colagénio1</i>
Cola1 - R	5' TTGGTTAGGGTCGATCCAGT 3'		
Cola4 - F	5' CCCAGGGACCAAATTCTTT 3'	5	<i>colagénio</i>
Cola4 - R	5' GGGCATGGTGCTGAACTTAC 3'		
plexinD1 - F	5' CGCTACACACTCAACGAGGA 3'	5	<i>plexinD1</i>
plexinD1 - R	5' CCTGGAAGGACACGTTCAA 3'		
timp1 - F	5' CATGGAAGCCTCTGTGGAT 3'	5	<i>timp1</i>
timp1 - R	5' CTCAGAGTACGCCAGGGAAC 3'		
timp2 - F	5' GCATCACCCAGAAGAAGAGC 3'	5	<i>timp2</i>
timp2 - R	5' CTCTGTGACCCAGTCCATCC 3'		
timp3 - F	5' AGGGCCTCAATTACCGCTAC 3'	5	<i>timp3</i>
timp3 - R	5' TGATAGCCAGGGTACCCAAA 3'		
Unc5b - F	5' TCTGCACCTCCCTGGAGTAT 3'	5	<i>unc5b</i>
Unc5b - R	5' CCAAGTAGCCACCCAGAGTC 3'		
MMP2 F	5' CCCCTGATGTCCAGCAAGTA 3'	5	<i>mmp2</i>
MMP2 R	5' CTGCGATGAGCTTAGGGAAA 3'		
Mmp1 F	5' TATCCCCGCCTCATAGAAGA 3'	5	<i>mmp1</i>
Mmp1 R	5' TGGGCCCATGAAAAAGTAG 3'		
Fn1 F	5' GTTGTCTGACGCTGGCTTTA 3'	5	<i>fibronectinal</i>
Fn1 R	5' CCCACTTCTCTCCGATCTTG 3'		
Lama1 F	5' AGACACCAACGATCCCATT 3'	5	<i>laminina-a1</i>
Lama1 R	5'GGTCCAAGGACTGCACTTGT 3'		
Lamc1 F	5' AGGCCAAAACCTCTGTCAGC 3'	5	<i>laminina-c1</i>
Lamc1 R	5' AGGGAGCCTTCGATCTCATT 3'		
Lamb1-1 F	5' CAGAGCTGAGCTGTTGCTTG 3'	5	<i>laminina-b1-1</i>
Lamb1-1 R	5' GGGCCTTTTCTGCTTCTTCT 3'		
Mmp9 F	5' GGGTCTAGGCCAGAGGTAA 3'	5	<i>mmp9</i>
Mmp9 R	5' ACTCCTTATCCACGCGAATG 3'		
Coll4a1 F	5' AACTCAAGGCCAAGAGGTC 3'	5	<i>colagénio14-a1</i>
Coll4a1 R	5' AGGTCCAGGTACTCCAGGT 3'		
PECAM R2	5' TCTAACTTCGGCTTGGGAAA 3'	5	<i>pecam1</i>
PECAM F2	5' CAAGCAAAGCAGTGAAGCTG 3'		
EPHRIN2 R2	5' TACTTGAGCAGCAGCACCAC 3'	5	<i>ephrin-B2</i>
EPHRIN2 F2	5' TCCCTTTGTGAAGCCAAATC 3'		
BCL2 R	5' CAGTCTACTTCCTCCGCAATG 3'	5	<i>bcl2</i>
BCL2 F	5' CTCCCGATTTCATTGCAAGTT 3'		
EPHB4 R2	5' GGTGTAGCCACCCTTCAGAG 3'	5	<i>eph-B4</i>
EPHB4 F2	5' GATCCTCACGGAATTCATGG 3'		
GAPDH F	5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3'	5	<i>gapdh</i>
GAPDH R	5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'		
Robo4_Fwd	5' CGAGGACGCCATTCTAAAAC 3'	5	<i>robo4</i>
Robo4_Rev	5' CCAATCCAGCCGACTACTA 3'		
VE-Cadherin_Fwd	5' CTTCAAGCTGCCAGAAAACC 3'	5	<i>ve-caderina</i>
VE-Cadherin_Rev	5' ATTCGGAAGAATTGGCCTCT 3'		

II.3 – Condições de reacção de PCR

Programa 1:

95°C	95°C	60°C	72°C	72°C	4°C
3m	30s	30s	35s	3m	∞
40 Ciclos					

Programa 2:

95°C	95°C	60°C	72°C	72°C	4°C
3m	30s	30s	35s	3m	∞
35 Ciclos					

Programa 3:

95°C	95°C	60°C	72°C	72°C	4°C
4m	30s	45s	45s	5m	∞
35 Ciclos					

Programa 4:

95°C	95°C	60°C	72°C	72°C	4°C
3m	30s	30s	1m	1m	∞
40 Ciclos					